

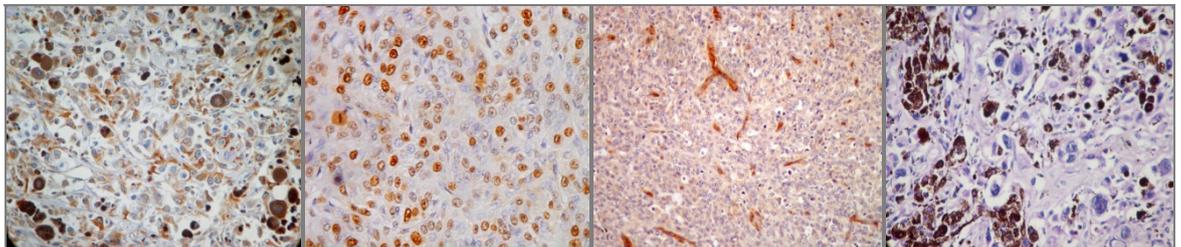


UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de:

DOCTORA EN CIENCIAS VETERINARIAS

**“NEOPLASIAS MELANOCÍTICAS EN CANINOS: EVALUACIÓN DE MARCADORES
INMUNOHISTOQUÍMICOS QUE CONTRIBUYEN A LA FORMULACIÓN DEL
DIAGNÓSTICO Y DEL PRONÓSTICO”**



Méd. Vet. CUITIÑO, María Cecilia

DIRECTORA: Prof. Dra. MASSONE, Adriana Raquel

CODIRECTOR: Prof. Dr. IDIART, Julio Roberto

LUGAR DE TRABAJO: CÁTEDRA DE PATOLOGÍA ESPECIAL, FCV, UNLP

MIEMBROS DEL JURADO:

Prof. Dr. BARBEITO, Claudio Gustavo

Prof. Dr. MARTÍN, Carlos Alberto

Prof. Dr. COLOMBO, Lucas

2011

AGRADECIMIENTOS

Parte de este trabajo se financió con Subsidios a Jóvenes Investigadores de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la UNLP.

Agradezco a todas aquellas personas que, directa o indirectamente, colaboraron con el desarrollo de este trabajo, en particular:

A mis directores, Dra. Adriana Massone y Dr. Julio Idiart, por su valiosa guía, su constante apoyo y su dedicación durante todos estos años.

A todos los integrantes del Servicio de Anatomía Patológica de la Cátedra de Patología Especial, en particular a las Dras. Adriana Massone y Alejandra Quiroga, quienes hicieron posible la disponibilidad de materiales.

Al personal técnico, especialmente a las histotecnólogas Carolina Aralda y Lorena Diaz, por su gran colaboración en la preparación del material.

A los colegas que contribuyeron con casos y que aportaron valiosa información sobre la evolución de sus pacientes.

Al Dr. Carlos Martín, por su contribución en la evaluación de los marcadores de endotelios.

Al Dr. Enrique Portiansky, por su asesoramiento en el procesamiento de las imágenes digitales.

A Mariángel Mauri, Profesora de Lengua Inglesa, por su constante e inestimable ayuda.

A mis padres, por el apoyo incondicional de siempre.

CITAS BIBLIOGRÁFICAS CORRESPONDIENTES A LAS PUBLICACIONES PARCIALES DEL
TRABAJO DE TESIS

Publicaciones en revistas

Resumen

- Cuitiño MC; Massone AR.; Riso MA.; Idiart JR. immunohistochemical quantification of nuclear cell proliferating antigen (PCNA) in canine melanocytic tumors: number of randomly selected fields needed to homogenize its variance. Biocell. 2006; 30 (3): 508.
- Cuitiño MC; Massone AR.; Riso MA.; Idiart JR. Expression of nuclear cell proliferating antigen (PCNA) as criterion for differentiation between benign and malignant melanocytic tumors in dogs Biocell. 2006; 30 (3): 508.

Trabajo completo

- Cuitiño MC; Massone AR; Idiart JR. Estudio retrospectivo en neoplasias melanocíticas caninas: aspectos epidemiológicos. Analecta Veterinaria (VE) 2006; 26 (2): 18-24 (7 pantallas). Recuperable de <http://www.fcv.unlp.edu.ar/analecta>.
- Cuitiño MC, Massone, Zufriategui L, Zapata G, Idiart JR. Melanoma de alto potencial metastásico en una perra de tres años. Rev Med Vet (B. Aires). 2008; 89 (3): 108-110.

Publicaciones de resúmenes en actas de congresos

- Cuitiño MC, Aralda C, Diaz LI. Efecto de la decoloración de la melanina en la inmunomarcación de neoplasias melanocíticas caninas. XI Congreso Argentino de Ciencias Morfológicas. Córdoba, mayo de 2008 (poster).

- Cuitiño MC, Massone AR, Idiart JR. Expresión de Ki67 en neoplasias melanocíticas benignas y malignas en caninos: estudios preliminares. XIV ENAPAVE. Aguas de Lindoia, San Pablo, Brasil. Octubre de 2008 (poster).

- Cuitiño MC; Massone AR; Idiart JR. Neoplasias melanocíticas cutáneas en caninos: inmunomarcación de vimentina, proteína S100 y melan A. Séptima Reunión Argentina de Patología Veterinaria. Buenos Aires, julio de 2010 (poster).

- Cuitiño MC; Madariaga G; Massone AR; Idiart JR. Angiogénesis en neoplasias melanocíticas cutáneas en caninos: estudios inmunohistoquímicos preliminares. XII Congreso de la Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata y 9º Jornadas de Educación. La Plata, septiembre de 2010 (poster).

- Cuitiño MC; Madariaga G; Massone AR; Idiart JR. Inmunomarcación de PCNA y Ki67 en neoplasias melanocíticas cutáneas en caninos. XII Congreso de la Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata y 9º Jornadas de Educación. La Plata, septiembre de 2010 (poster).

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN	4
Neoplasias melanocíticas. Consideraciones generales	5
Neoplasias melanocíticas en caninos	7
- Patogenia	7
- Hallazgos macroscópicos	8
- Hallazgos microscópicos	9
- Inmunohistoquímica aplicada al diagnóstico	11
- Inmunohistoquímica aplicada al pronóstico	17
OBJETIVOS	24
HIPÓTESIS	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Selección de los casos	26
Estudio histopatológico	26
Estudios inmunohistoquímicos cualitativos	27
Estudios inmunocitoquímicos	28
Estudios inmunohistoquímicos cuantitativos	28
Estudio de supervivencia	30
Análisis estadístico	32

RESULTADOS	34
Estudio histopatológico. Aspectos clínicos y de la reseña	35
Estudios inmunohistoquímicos cualitativos	50
- Vimentina	50
- Proteína S100	56
- Melan A	64
- Tirosinasa	74
Estudios inmunocitoquímicos	77
Estudios inmunohistoquímicos cuantitativos	78
- Proliferación celular: IP-PCNA y IP-Ki67	78
- Vascularización: AE y DMV	84
- Invasión: MMP-2	89
Estudio de supervivencia	90
- Aspectos clinicopatológicos	90
- Vimentina, proteína S100 y melan A	98
- IP-PCNA y IP-Ki67	100
- AE y DMV	103
DISCUSIÓN	104
Estudio histopatológico. Aspectos clínicos y de la reseña	105
Estudios inmunohistoquímicos cualitativos	113
Estudios inmunohistoquímicos cuantitativos	128
Estudio de supervivencia	138

CONCLUSIONES ----- 147

BIBLIOGRAFÍA ----- 151

ANEXOS----- 178

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AE: área endotelial

ANOVA: análisis de varianza

CDKs: quinasas dependientes de ciclinas

CDKI: inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas

c-erb-b2: protooncogen caracterizado a partir de la eritroblastosis aviar

CMA: campos de mayor aumento

c-myc: protooncogen caracterizado a partir de la mielocitomatosis aviar

CTL: linfocitos citotóxicos

DAB: diaminobencidina

DMV: densidad de microvasos

ESM: error estándar de la media

FKH1: anticuerpo monoclonal generado contra antígenos de la línea celular KH de melanoma humano

Gp100: glicoproteína 100

H&E: hematoxilina y eosina

HMB-45: marcador de la glicoproteína premelanosomal 100

HMSA-1/HMSA-5: antígeno 1 asociado a melanomas humanos, antígeno 5 asociado a melanomas humanos

HP: histopatológico

IBF9: anticuerpo monoclonal generado a partir de líneas celulares de melanoma canino

IM: inmunomarcación

IP: índice de proliferación

Ki67: antígeno de proliferación celular Ki67

LSAB: biotina estreptavidina marcada

m: meses

MART-1: antígeno de melanoma reconocido por células T

MCAM/MUC18: molécula de adhesión celular específica de melanocitos

MITF: factor de transcripción asociado a la microftalmia

MMP-2: metaloproteinasa 2 de la matriz

MMPs: metaloproteinasas de la matriz

n: tamaño muestral

NC: no consignado

NE: no evaluado

NKIC3: anticuerpo monoclonal dirigido contra un antígeno derivado de una proteína de membrana de vesículas citoplasmáticas de melanocitos

NM: neoplasias melanocíticas

NMNC: neoplasias melanocíticas no clasificadas

NSE: enolasa específica de neuronas

Obj.: objetivo

p: probabilidad

P16-INK4a: proteína nuclear de 16 KDa codificada por el gen INK4a

P21-WAF1: proteína nuclear de 21 KDa codificada por el gen WAF1

p27-KIP1: proteína nuclear de 27 KDa codificada por el gen KIP1

PBS: buffer de fosfato

PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular

PNL2: anticuerpo monoclonal generado contra una proteína recombinante derivada del receptor de la somatostatina humana

PTEN: gen homólogo de fosfatasa y tensina

ras: familia de protooncogenes caracterizada a partir del sarcoma de la rata

TIMPs: inhibidores de metaloproteinasas de la matriz

TP53: gen que codifica una proteína nuclear de 53 KDa

TRP-1/TRP-2: proteína 1 relacionada con la tirosinasa, proteína 2 relacionada con la tirosinasa

UDE: unión dermoepidérmica

χ^2 : chi cuadrado

-: negativo

+: positivo

\pm : más menos

<: menor que

>: mayor que

\geq : mayor o igual que

\leq : menor o igual que

NEOPLASIAS MELANOCÍTICAS EN CANINOS: EVALUACIÓN DE MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS QUE CONTRIBUYEN A LA FORMULACIÓN DEL DIAGNÓSTICO Y DEL PRONÓSTICO

Palabras clave: neoplasias melanocíticas, canino, inmunohistoquímica, diagnóstico, pronóstico

Resumen

Con el objetivo de aplicar la inmunohistoquímica al diagnóstico y al pronóstico de las neoplasias melanocíticas caninas se estudiaron 127 casos. Se realizó la inmunomarcación de vimentina, proteína S100, melan A, tirosinasa, PCNA, Ki67, factor de von Willebrand y MMP-2. Se establecieron índices de proliferación (IP-PCNA y IP-Ki67), el área endotelial y la densidad de microvasos (factor de von Willebrand), se evaluó la utilidad del marcador de invasión MMP-2 y se analizó un grupo de pacientes con datos de supervivencia. Los melanocitomas y los melanomas cutáneos fueron igualmente frecuentes. Las neoplasias melanocíticas orales fueron melanomas en su mayoría. El 3% de los casos presentó características histológicas “intermedias” entre melanocitomas y melanomas. La proteína S100 resultó especialmente útil para la identificación de neoplasias melanocíticas amelánicas. La positividad a melan A fue inversa al grado de melanización. Su utilidad en la identificación de neoplasias melanocíticas amelánicas resultó limitada. La positividad a tirosinasa fue baja. No se observó positividad a MMP-2. El 75% de las neoplasias melanocíticas cutáneas exhibió comportamiento benigno. El 50% de los melanomas cutáneos presentó comportamiento benigno tras la exéresis quirúrgica. En las neoplasias melanocíticas orales, la muerte relacionada con la neoplasia dentro de los 6 meses

posteriores al diagnóstico fue frecuente. La localización de la neoplasia, la ulceración, la actividad en la unión dermoepidérmica, el índice mitótico, el patrón citoplasmático de inmunomarcación de melan A y el IP-PCNA resultaron de valor pronóstico en las neoplasias melanocíticas cutáneas. El índice mitótico fue la característica que mejor se correlacionó con la supervivencia en estas últimas; el hallazgo de 3 o más mitosis en 10 campos de mayor aumento fue indicativo de malignidad. En las neoplasias melanocíticas orales, sólo el tamaño de la neoplasia y el IP-Ki67 exhibieron valor pronóstico. El área endotelial y la densidad de microvasos no se relacionaron con la supervivencia.

CANINE MELANOCYTIC TUMORS: IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC MARKERS

Key words: melanocytic tumors, canine, immunohistochemistry, diagnosis, prognosis

Summary

The aim of this study was to determine immunohistochemical markers of diagnostic and prognostic significance in canine melanocytic tumors. One hundred and twenty seven melanocytic tumors were studied. Immunostaining of vimentin, S100 protein, melan A, tyrosinase PCNA, Ki67, von Willebrand factor and MMP-2 was performed. Proliferation indices (PCNA-PI and Ki67-PI), endothelial area and microvessel density (von Willebrand factor) were established. The usefulness of the invasion marker MMP-2 was examined. A subset of patients with survival data was analyzed. Cutaneous melanocytomas and melanomas were equally frequent. Oral melanocytic tumors were almost all melanomas. Three percent of melanocytic tumors displayed "intermediate" histological characteristics between melanocytomas and melanomas. S100 protein showed to be especially useful to

identify amelanotic melanocytic tumors. Melan A positivity was inverse to the degree of pigmentation. For this reason, its usefulness in the identification of amelanotic melanocytic tumors is limited. Very few cases were positive to tyrosinase. MMP-2 immunostaining was negative. Seventy five percent of cutaneous melanocytic tumors exhibited benign behavior; fifty percent of cutaneous melanomas had a benign course after surgical excision. In oral melanocytic neoplasms, tumor related death within 6 months of diagnosis was frequent. Location of the tumor, ulceration, junctional activity, mitotic index, cytoplasmic staining pattern of melan A, and PCNA-PI had prognostic significance in cutaneous melanocytic tumors. Among these characteristics, mitotic index showed the best correlation with tumor behavior; three or more mitosis per 10 high power fields were indicative of malignancy. Only tumor size and Ki67-PI had prognostic significance in oral MT. Endothelial area and microvessel density did not show any relationship with survival.

INTRODUCCIÓN

NEOPLASIAS MELANOCÍTICAS, CONSIDERACIONES GENERALES

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. Actualmente se considera que entre el 15 y el 20% de los animales adultos que reciben atención médica padece procesos neoplásicos. Así, la oncología veterinaria ha surgido como una disciplina compleja y de interés creciente, cuyo propósito es resolver los distintos problemas que plantean los pacientes que padecen una enfermedad tumoral.

La aparición de cáncer espontáneo en las especies domésticas posibilita su utilización como modelos animales para el estudio de diferentes neoplasias en el hombre. Las ventajas de dicho modelo animal, particularmente caninos que desarrollan cáncer espontáneo, han sido revisadas por Knapp y Waters en el año 1997 e incluyen: 1) similitudes entre caninos y humanos en el aspecto histológico, el comportamiento biológico y la respuesta a la terapia de tipos específicos de tumores, 2) similitud entre ambas especies en el metabolismo de drogas, 3) menor cantidad de limitaciones en la prueba de nuevas terapias debido a que, en muchos tipos de cáncer canino, no se ha establecido aún una terapia apropiada, 4) el tiempo de vida no demasiado prolongado de los caninos, lo que permite la finalización de los estudios clínicos oportunamente, 5) el hecho de que los caninos compartan el ambiente con sus propietarios, en condiciones similares de exposición al agua, insecticidas, humo de cigarrillo, etc, 6) el tamaño corporal

de los caninos, lo que permite la realización de procedimientos médicos poco factibles en ratones, 7) el concepto de que nuevas estrategias de intervención desarrolladas mediante estudios *in vitro* o en animales de laboratorio puedan ser probadas *in vivo* en caninos que han desarrollado tumores espontáneos (1).

De cualquier modo, todo estudio comparativo desarrollado en mascotas, beneficia claramente a los animales y al hombre.

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. Son comunes en caninos y equinos y raras en otras especies. Generalmente se presentan como neoplasias cutáneas, orales y oculares, aunque también pueden verse en otros tejidos que contienen melanocitos (meninges, vasos sanguíneos, corazón, glándulas adrenales y huesos) (2,3).

En años recientes se ha observado un continuo aumento en la incidencia de NM en el hombre en todo el mundo. En el año 2005, "*The Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program*" comunicó un incremento en el diagnóstico de melanoma cutáneo en habitantes de Estados Unidos de Norteamérica de más del 600% desde 1950 hasta 2000 (4,5). 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 (6).

NEOPLASIAS MELANOCÍTICAS EN CANINOS

Patogenia

La transformación de melanocitos normales a melanocitos neoplásicos es mediada por una serie de pasos entre los cuales se encuentran iniciación, promoción y transformación. La génesis del melanoma humano es atribuida a la combinación una predisposición genética y la exposición a la radiación ultravioleta (7). Tanto la inestabilidad genética como la proliferación celular defectuosa y acelerada se identificaron como las primeras fases moleculares en el desarrollo y la progresión del melanoma (7,8). La evolución de estas fases parece ser el resultado de la desregulación de dos grupos de genes bien definidos; los genes supresores de tumores y los protooncogenes (7). Aunque es poco lo que se conoce acerca de la iniciación de estas neoplasias en medicina veterinaria, estudios recientes han comenzado a dilucidar el papel de genes reguladores del crecimiento en el desarrollo de esta enfermedad (7, 9, 10). Mientras que la mutación en la familia del gen ras se encuentra entre las más comúnmente halladas en melanomas humanos, éste parece ser un evento raro en las NM caninas (11), al igual que la mutación del gen TP53 (10). Entre los oncogenes que podrían estar involucrados en la génesis de las NM caninas se han propuesto los protooncogenes c-erb-b2 y c-myc (12), así como los genes supresores de tumores p21^{WAF1} (13 y 9), p16^{INK4a} y PTEN (9).

Incidencia. Predisposición etaria, racial y por sexo. Localizaciones más frecuentes

Las NM en caninos son relativamente comunes, representando entre el 4 y el 7% de los tumores en general (14). Se presentan con mayor frecuencia en caninos mayores de 10 años de edad (rango de 1 a 17) (3, 15). La frecuencia de NM parece ser más alta en animales de piel y mucosas pigmentadas (2, 3, 15, 16). 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 (3, 15, 16).

Los sitios más comúnmente afectados son, en orden decreciente, la piel, la mucosa oral y el ojo (2, 3, 6, 17). Dentro de las neoplasias que se originan en la mucosa oral, el melanoma se considera la más frecuente (18). Las NM cutáneas representan del 4 al 20% de los tumores de piel en general (3, 19). En las NM orales, la encía y la mucosa labial se citan como las localizaciones más comunes (3, 15, 17, 20, 21), mientras que en la piel lo son la cara (especialmente los párpados), el tronco y las extremidades (sobre todo los dedos y el lecho ungular) (3, 6, 14, 16).

Hallazgos macroscópicos

El aspecto de las NM varía considerablemente en función de su localización. Pueden observarse desde pequeñísimas máculas negras hasta grandes masas de crecimiento rápido con grados variables de pigmentación (coloración parda oscura, gris o negra) o totalmente depigmentadas. Las lesiones cutáneas pueden ser cupuliformes, nódulos sésiles, polipoides, con forma de placa o incluso masas lobuladas. Las NM benignas pueden presentar entre 0,5 a 4 cm de diámetro. La ulceración en ellas es poco común. Las NM malignas pueden llegar a superar los 10 cm de diámetro, aunque la

mayoría de las lesiones tiene de 1 a 3 cm. Aquellas de gran tamaño suelen estar ulceradas (2, 3, 16, 22). Las NM orales suelen ser halladas accidentalmente durante el examen odontológico. Aparecen como masas únicas, sésiles y generalmente ulceradas. Los signos clínicos comienzan cuando la neoplasia alcanza los 3 a 4 cm de diámetro. La consistencia suele ser firme, al menos que la necrosis y la infección secundaria reblandezcan el tejido. La superficie de corte frecuentemente exhibe focos de coloración negruzca alternados con áreas parduscas, grisáceas o blanquecinas (3, 15, 18).

Hallazgos microscópicos

En el pasado, el término “melanoma” ha sido empleado de diferentes formas en los sistemas de nomenclatura de las NM caninas. Algunos autores han aplicado el término “melanoma” a proliferaciones benignas y malignas, mientras que otros han restringido su uso sólo para referirse a proliferaciones malignas. Actualmente, de acuerdo con la descripción y clasificación propuesta por la OMS, las NM malignas son denominadas melanomas y las NM benignas, melanocitomas (21, 23, 24).

Algunos autores, para hacer referencia a la localización histológica precisa de las NM, utilizan los términos definidos a continuación.

1) de la unión (“junctional”), se refiere a la proliferación de melanocitos en la epidermis o en la unión dermoepidérmica (esa proliferación de melanocitos en la zona de la unión también se ha denominado “actividad de la unión dermoepidérmica”), 2) dérmico, que indica que el tumor se encuentra confinado a la dermis sin compromiso de la epidermis, y 3) compuesto, que indica que existe compromiso tanto dérmico como epidérmico (3, 16, 23).

La morfología de las células de las NM es muy variable y suele haber varios tipos celulares en la misma masa. De la misma manera, la cantidad de pigmento en el citoplasma de las células varía considerablemente; algunas carecen de melanina visible. Los tipos celulares más frecuentes en estas neoplasias suelen ser epitelioide, fusiforme y una mezcla (mixto), aunque también suelen exhibir células redondas a poligonales y globosas (2, 3, 15, 18, 21, 23). Las células epitelioides suelen presentar un citoplasma rosado pálido, escasamente teñido, de bordes poco definidos, con núcleos grandes y nucléolos evidentes. Suelen disponerse formando nidos, sábanas o capas (3, 16). Las células fusiformes pueden mostrar delgadas prolongaciones citoplasmáticas, con citoplasmas claros y pobremente definidos. Se disponen en pequeños nidos, haces o espirales, que recuerdan a estructuras neurales. Ambas pueden o no contener gránulos de pigmento de color negro, negro azulado o negro verdoso. Pueden dar a la célula un aspecto granular o bien “pulverulento” homogéneo de color grisáceo. Las células globosas (*balloon cells*) son redondas de abundante citoplasma claro y finamente granular en el cual los gránulos de melanina son difíciles de hallar (2, 3, 16, 18, 23).

La diferenciación entre melanocitoma y melanoma puede resultar compleja. La simetría y los márgenes tumorales bien definidos son indicadores de una lesión benigna. A pesar de que las células en los melanocitomas pueden presentar núcleos grandes y nucléolos evidentes, la uniformidad nuclear es una característica de estas neoplasias (16). En las NM cutáneas, la característica histológica más confiable para la diferenciación entre melanocitomas y melanomas es el índice mitótico; el hallazgo de tres o más mitosis en la observación diez campos de 400 aumentos es indicativo de malignidad (3, 6, 16, 17, 23). Entre las características citológicas de malignidad se incluyen la presencia de grandes

núcleos, variaciones en el tamaño y la forma nuclear, hipercromasia, nucléolos múltiples, grumos anormales de cromatina y mitosis atípicas (3, 21, 23). La presencia de melanocitos solitarios o en nidos en los estratos superficiales de la epidermis, así como un componente infiltrativo en la dermis y la hipodermis, son también considerados indicadores de malignidad (3, 16, 23).

Algunos autores describen con gran detalle distintas variantes de las NM caninas, especialmente de las NM cutáneas. Entre ellas pueden citarse melanocitomas y melanomas dermales y compuestos, melanocitomas y melanomas de células globosas, melanomas de células fusiformes y melanomas desmoplásicos (16).

Inmunohistoquímica aplicada al diagnóstico

La diversidad de tipos histopatológicos observada en NM caninas es menor que la descrita en la literatura médica. Debido a que en medicina veterinaria la lesión denominada “nevo displásico” no es reconocida como una entidad específica, el patólogo veterinario no se enfrenta con el problema de diferenciar nevos displásicos de melanomas *in situ* o melanomas invasivos, los cuales presentan diferente pronóstico.

Generalmente, el estudio histopatológico convencional es suficiente para identificar y clasificar adecuadamente las NM caninas. Sin embargo, al igual que lo que sucede con las NM humanas, el diagnóstico puede resultar complejo cuando estas neoplasias son pobremente diferenciadas (3, 15, 23, 25, 26). Las NM exhiben grados de melanización variables y suelen ser completamente amelánicas. Otro factor que dificulta su identificación es la amplia variedad de aspectos histológicos que pueden presentar (3, 15, 27). Las NM cutáneas escasamente pigmentadas deben diferenciarse de otras

neoplasias cutáneas de células fusiformes y redondas. Entre ellas se citan tumores de la vaina de los nervios periféricos, fibrosarcomas, plasmacitomas, mastocitomas poco diferenciados, sarcomas histiocíticos y linfomas (16). Las NM orales pueden confundirse con carcinomas poco diferenciados, fibrosarcomas, linfomas y tumores osteogénicos (15). Sumado a ello, al igual que en las NM humanas, un pequeño porcentaje de las NM caninas suele presentar características histológicas “intermedias”, comunes a NM benignas y malignas. Por lo tanto, cuando el origen melanocítico es claro, aún pueden encontrarse dificultades en la diferenciación entre NM benignas y malignas (16, 27, 28).

Como es bien conocido, el diagnóstico asertivo de la neoplasia reviste fundamental importancia en la elección del tratamiento adecuado, así como para la formulación del pronóstico. En tales circunstancias, la evaluación de la expresión de antígenos mediante técnicas de inmunohistoquímica en cortes de tejido o en extendidos para estudios citológicos resulta de gran ayuda. (29, 30, 31, 32, 33).

Las técnicas de inmunohistoquímica son extensamente usadas en medicina humana como complemento de la histopatología convencional, tanto para la identificación de NM escasamente diferenciadas como para la diferenciación entre NM malignas y benignas (25, 27, 34, 35).

En medicina veterinaria, las técnicas de inmunohistoquímica con fines diagnósticos han comenzado a aplicarse con regularidad sólo en forma relativamente reciente. En patología oncológica, las áreas en las cuales estas técnicas han ganado mayor aplicación han sido la fenotipificación de poblaciones linfoides y la inmunomarcación de filamentos intermedios y de marcadores neurales (36). Las NM no

representan una excepción a estas generalidades, ya que los marcadores más utilizados hasta el presente para la dilucidación de su histogénesis han sido la vimentina y la proteína S100. Algunos de los múltiples marcadores de diferenciación melanocítica disponibles para su uso en NM humanas se encuentran aún en investigación en las NM caninas. Estos últimos son, en general, específicos de células de la estirpe melanocítica. El marcador melanocítico ideal debería combinar una alta sensibilidad (reconocer células melanocíticas en todas las etapas del desarrollo y de la progresión tumorales) con una alta especificidad (ausencia de expresión en células no melanocíticas) (34).

La vimentina es una proteína constituyente del citoesqueleto, específica de células mesenquimáticas. La proteína S100 es una proteína fijadora de calcio que se encuentra presente en células derivadas del neuroectodermo y sus correspondientes neoplasias. Fue aislada por primera vez de cerebro bovino y debe su denominación a su solubilidad en solución en sulfato de amonio saturado (37, 38). Si bien se asume que la especificidad de ambos marcadores es limitada, su sensibilidad es alta, por lo que su aplicación se recomienda en conjunto con, al menos, un marcador de diferenciación melanocítica (15, 27, 39, 40). Más aún, la proteína S100 ha mostrado ser uno de los escasos marcadores que retiene su alta sensibilidad en el caso particularmente problemático de los melanomas desmoplásicos y de células fusiformes humanos (40, 41, 42, 43, 44).

La enzima enolasa específica de neuronas (*neuron specific enolase, NSE*) es una proteína glicolítica que se expresa en neuronas y células de origen neuroectodérmico (38). La utilidad de anticuerpos “anti” NSE se ha estudiado escasamente en las NM caninas y con resultados variables (15, 39, 45).

El anticuerpo monoclonal HMB-45, utilizado de rutina en el diagnóstico de NM humanas, producido contra glicoproteína 100 (gp100) una proteína citoplasmática premelanosomal, fue uno de los primeros marcadores de diferenciación melanocítica en descubrirse (27, 44, 46, 47). Además de su alta sensibilidad y especificidad, se ha sugerido su potencial para la diferenciación entre nevos melanocíticos y melanomas (40, 48). En las NM caninas se ha comunicado el hallazgo de un gran porcentaje de casos positivos a HMB-45 pero sólo luego de un pretratamiento del tejido con permanganato de potasio y ácido oxálico (49), aunque no se han realizado estudios adicionales al respecto.

Melanoma antigen recognized by T-cells-1 (MART-1) y Melan A son sinónimos para la denominación de una proteína citoplasmática de diferenciación melanocítica, reconocida por linfocitos T citotóxicos. Coulie y col. y Kawakami y col. (50, 51), independientemente uno de otro, clonaron el mismo gen/antígeno, a partir de lo cual se desarrollaron dos anticuerpos monoclonales. El clon "anti" Melan A se llamó A103, y el clon MART-1, M2-7C10. Ambos marcadores exhiben alta sensibilidad para la identificación de melanocitos intraepidérmicos normales, así como para la mayoría de los nevos melanocíticos y melanomas (52, 53, 54, 55, 56). Al igual que la mayoría de los marcadores de diferenciación melanocítica, la inmunomarcación obtenida con Melan A/MART-1 en melanomas desmoplásicos y de células fusiformes es de escasa a nula (27, 54, 56). En medicina veterinaria, melan A es uno de los marcadores que más se ha estudiado en los últimos años. Aunque se ha confirmado su alta especificidad para el diagnóstico de las NM caninas, los resultados acerca de su sensibilidad varían considerablemente entre los distintos estudios (15, 39, 57, 58, 59, 60, 61).

La tirosinasa es una enzima clave para la síntesis de melanina en melanocitos, extensamente usada en el diagnóstico de NM humanas, dado que se la considera un marcador muy sensible (por encima del 85% de sensibilidad en tipos amelanóticos) y altamente selectivo (27, 33, 34, 40). Existen resultados contradictorios acerca de su utilidad en las NM caninas (15, 61). Asimismo, otras enzimas involucradas con el proceso de la melanogénesis son las proteínas relacionadas con la tirosinasa 1 y 2 (*tyrosinase related protein 1 y 2, TPR-1 y TPR-2*) (34). A pesar de que muchas enzimas relacionadas con la melanogénesis pueden estar ausentes en NM amelánicas, la TRP-2 parece conservarse en muchos melanomas amelánicos (62). De la escasa información que existe sobre su utilidad en las NM caninas puede decirse que la proporción de neoplasias amelánicas inmunomarcadas es sólo ligeramente superior a la observada con melan A (58). Por otra parte, en un estudio reciente realizado en NM orales, los autores concluyeron que, tanto TRP-1 y TRP-2, son marcadores altamente sensibles y específicos para el diagnóstico de las NM orales (60).

El factor de transcripción asociado a la microftalmia (*microphthalmia transcription factor, MITF*) es una proteína nuclear crítica para el desarrollo embriológico y la viabilidad postnatal de los melanocitos y otros tipos celulares (63). La isoforma MITF-M, presente exclusivamente en células de la estirpe melanocítica, ha sido la más estudiada por su participación en la melanogénesis. Si bien los primeros estudios comunicaron una especificidad de los anticuerpos (D5 y C5) casi del 100% (63, 64), estudios posteriores demostraron una especificidad intermedia, debido a la presencia de otras isoformas en células y tejidos no melanocíticos (42,65, 66). La inmunomarcación observada con D5 en histiocitos y células cebadas es de particular interés dado que puede complicar la

diferenciación entre melanomas y neoplasias histiocíticas y, del mismo modo, la identificación de micrometástasis de melanoma en linfonódulos (56 y 44). En un estudio reciente en NM orales amelánicas en caninos, MITF exhibió alta sensibilidad pero fue menos específico que otros marcadores evaluados, dado que se detectó positividad en sarcomas de células fusiformes (60).

PNL-2 es un anticuerpo monoclonal que se ha descrito en forma relativamente reciente (67). La naturaleza del epítope reconocido por este anticuerpo aún se desconoce. Su sensibilidad en melanomas primarios y metastásicos parece ser similar a la HMB-45 y melan A y se ha detectado positividad a PNL-2 en escasos tejidos no melanocíticos (56). Muy recientemente ha comenzado a evaluarse la utilidad del anticuerpo monoclonal PNL-2 en las NM caninas. El mismo ha mostrado ser altamente específico para estas neoplasias y se ha observado una gran proporción de casos positivos en melanomas amelánicos (59, 60, 61).

Además de los anteriores, existen otros anticuerpos cuyo uso en la rutina diagnóstica de las NM humanas no ha tenido gran difusión. Entre ellos podría mencionarse el anticuerpo monoclonal HMSA-1, que fue desarrollado a partir de fracciones celulares (melanosomas) de melanomas humanos. HMSA-1 es específico para melanomas, incluyendo los amelanóticos y nevos displásicos (68,69). Otros anticuerpos monoclonales como FKH1 y NKIC3 demostraron reaccionar con melanomas y nevos melanocíticos en el hombre (70). Sin embargo, la selectividad de NKIC3 ha sido cuestionada por algunos autores (40). De ellos, sólo se han comunicado resultados de la aplicación de HMSA-1 y HMSA-5 en medicina veterinaria. Los mismos reaccionarían con

un 60 a 69% de melanomas caninos, aumentando esta proporción al 80% si se utilizan en combinación (71), aunque no se ha continuado con su estudio, como sí ha sucedido con muchos de los anteriormente citados.

Otro marcador sobre el cual no se han desarrollado estudios posteriores es IBF9, un anticuerpo monoclonal que fue producido específicamente para reaccionar con melanomas caninos. La selectividad del anticuerpo fue evaluada mediante su aplicación en diferentes tumores y sólo se observó reacción en carcinomas de células escamosas, épulis y tumores de células basales. Tampoco se observó marcación en fibrosarcomas, neoplasias que pueden ser confundidas con NM indiferenciadas (72).

En la actualidad, especialmente en medicina humana, continúan los esfuerzos para determinar nuevos marcadores de diferenciación melanocítica para su aplicación diagnóstica (27, 73, 74, 75,).

Inmunohistoquímica aplicada al pronóstico

Desde hace algunas décadas se asume que existen ciertos aspectos clínicos y morfológicos de las NM caninas relacionados con el pronóstico de las mismas. En cuanto a los aspectos clínicos, la localización de las neoplasias se considera un importante indicador pronóstico. Por ejemplo, las localizaciones oral y subungular se asocian a comportamientos malignos (2, 3, 15, 16, 18, 22). Dentro de los aspectos morfológicos, la presencia de melanocitos solitarios o en nidos en los estratos superficiales de la epidermis, así como un componente infiltrativo en la dermis y la hipodermis, son generalmente indicadores de malignidad (23). Lo mismo sucede con el hallazgo de 3 mitosis o más en la observación de diez campos de 400 aumentos (6, 16, 17, 23, 76). El

tamaño del tumor, el grado de pigmentación y la presencia de necrosis, ulceración o inflamación son, todavía, de valor pronóstico dudoso en animales (3, 6, 17, 77).

A pesar de que muchos de los mencionados criterios resultan válidos en una parte de los casos, desde hace años se documentan variaciones en el comportamiento de las NM, independientemente de su localización o de su aspecto histológico. Uno de los primeros estudios al respecto fue realizado por Bostock en 1979 (76). Sobre un total de 104 NM, el autor observó que el 43% de las lesiones orales y el 8% de las lesiones cutáneas histológicamente benignas causaron la muerte de los pacientes afectados. En años recientes, el surgimiento de nuevos estudios ha enriquecido la información acerca de este aspecto. A partir de la bibliografía disponible se puede apreciar la falta de consenso entre los distintos autores acerca de los criterios anatómicos e histológicos que clásicamente se han considerado indicadores pronósticos, especialmente sobre aquellos difundidos y validados a través de boletines oficiales y libros de texto (17, 78). Un estudio reciente demostró que el 95% de los casos de un subgrupo de NM orales denominadas “bien diferenciadas”, permaneció vivo al menos tres años luego de la exéresis quirúrgica de la neoplasia (78). Asimismo, en un estudio similar, Spangler y col. encontraron que si bien el 92% de las NM orales se clasificó como maligno, sólo el 59% de ellas exhibió tal comportamiento, mientras que, del 39% de las NM cutáneas que se clasificó como maligno, sólo el 12% de las mismas se comportó como tal (17).

La necesidad de mejorar la predicción acerca del resultado de la enfermedad promueve el estudio de nuevos indicadores pronósticos que, en asociación con determinadas variables clinicopatológicas, contribuyan a tal fin. En este marco, en

medicina veterinaria, una de las áreas que más ha crecido en los últimos años ha sido la investigación de la expresión de proteínas celulares mediante técnicas de inmunohistoquímica, no sólo mejorando la precisión diagnóstica sino también aportando valiosa información pronóstica (36, 79).

En esta búsqueda de indicadores pronósticos adicionales han comenzado a estudiarse en diversas neoplasias caninas marcadores de proliferación celular, reguladores del ciclo celular, proteínas de la matriz extracelular y moléculas de adhesión, marcadores de angiogénesis y otros reguladores del crecimiento tumoral como los vinculados con la apoptosis (79).

La desregulación de la proliferación celular es una de las características del desarrollo tumoral. La expresión de varias proteínas relacionadas con el ciclo celular se modifica durante progresión de las NM.

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) fue originalmente caracterizado como un polipéptido auxiliar esencial de ADN polimerasas y como un componente fundamental del replisoma eucariótico. Estudios posteriores demostraron que esta proteína interactúa con múltiples moléculas que se encuentran implicadas en diferentes vías metabólicas, incluyendo el procesamiento de los fragmentos de Okazaki, reparación del ADN, síntesis translesional de ADN, metilación del ADN, remodelación de la cromatina y regulación del ciclo celular (80).

Ki67 es una proteína nuclear asociada al ciclo celular que se expresa tardíamente en la fase G1 y en las fases S, G2 y M, pero no en las fases G0 y G1 temprana (81).

Ambos marcadores de proliferación celular fueron evaluados en un pequeño grupo de estudios retrospectivos en caninos, detectándose diferencias significativas en el porcentaje de células inmunorreactivas entre NM benignas y malignas. Hasta el momento, sólo la expresión de KI67 (MIB-1) se ha vinculado con la supervivencia de los pacientes con NM (6, 77, 82, 83, 84)

Las ciclinas regulan el ciclo celular en asociación con quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Estas últimas, a su vez, se encuentran bajo la regulación de inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas (CKIs), tales como p16^{INK4a}, p21^{WAF1} y p27^{KIP1}. Las mismas regulan la progresión del ciclo celular promoviendo su detención o la apoptosis (9, 13). Niveles elevados de p16^{INK4a} mostraron efectos protectores en relación a la mortalidad en melanoma humano (48).

TP53 es un gen de la respuesta celular al estrés, que codifica para la síntesis de una fosfoproteína nuclear oncosupresora de 53 kDa, involucrada en la preservación de la estabilidad genómica y la inducción de apoptosis en respuesta a un daño genotóxico (85). La alteración en la función de la proteína p53 se ha correlacionado con transformación celular *in vitro* y el desarrollo de neoplasias *in vivo*. Aproximadamente el 50% de las neoplasias humanas presenta mutaciones en este gen (86).

En las NM caninas se ha observado la pérdida de la función de algunas de las proteínas antes mencionadas, especialmente p16^{INK4a} y p53. Sin embargo, como las anomalías en su expresión o en su localización subcelular se detectaron con igual frecuencia en NM benignas y malignas, aún se desconoce su potencial rol pronóstico (9).

La expresión de proteína p53 (variante mutada) en asociación con el índice mitótico en NM caninas fue estudiada por Roels y col. y los resultados indicarían que su expresión en estas neoplasias en caninos es infrecuente y que no existe asociación significativa entre dichos parámetros y el tiempo de supervivencia de los pacientes (10).

La degradación de membranas basales y la remodelación de la matriz extracelular, pasos fundamentales en el proceso de metástasis, son llevadas a cabo por enzimas proteolíticas, entre las que se encuentran las metaloproteinasas de la matriz (MMPs), reguladas por sus inhibidores (TIMPs). Las MMPs constituyen una familia compleja de endopeptidasas dependientes de zinc. Son expresadas no sólo en células tumorales sino también en células estromales, indicando que las proteínas derivadas del estroma pueden favorecer la progresión de las NM. Las MMPs interactúan con una amplia variedad de proteínas; tal es el caso de moléculas de adhesión, factores de crecimiento, mediadores de angiogénesis y de apoptosis (87).

Estudios recientes han demostrado que la expresión de colagenasa tipo IV (MMP-2) sería importante en la diseminación de NM humanas. La expresión de esta proteína se ha sido relacionada con la ocurrencia de metástasis. Una alta expresión de MMP-2 indicaría un pronóstico desfavorable (88, 89, 90).

Si bien la expresión de diversas metaloproteinasas ha comenzado a estudiarse mediante estudios inmunohistoquímicos en distintas neoplasias caninas, especialmente mamarias (91,92), aún no se han comunicado resultados al respecto en las neoplasias melanocíticas.

La angiogénesis se considera un proceso crítico en la progresión y diseminación de las neoplasias. En medicina humana, diversos estudios inmunohistoquímicos han contribuido a establecer la importancia de la densidad de microvasos como indicador pronóstico en algunas neoplasias (93), aunque su importancia en melanomas sigue siendo controvertida (94, 95, 96, 97, 98, 99).

La angiogénesis tumoral también ha sido, aunque en menor medida, objeto de investigación en algunas neoplasias caninas. En este contexto, los resultados de diversos estudios inmunohistoquímicos realizados en carcinomas mamarios y mastocitomas sugieren un posible rol pronóstico de la misma en estas neoplasias (100, 101, 102, 103). En el caso particular de las NM, según nuestro conocimiento, sólo ha sido publicado hasta el momento un trabajo de Mukaratirwa y col. al respecto. En el mencionado trabajo, los autores hallaron una mayor densidad de microvasos en NM malignas con pronóstico desfavorable (104).

Al contrario de lo que sucede en oncología veterinaria, son cientos los marcadores tisulares que se encuentran en estudio con fines pronósticos en las NM humanas (48, 105). De ellos, los que han mostrado resultados prometedores al presente han sido los marcadores de proliferación celular Ki67 y PCNA, los reguladores del ciclo celular p16^{INK4a} y p27^{KIP1} así como las proteínas relacionadas con invasión tisular y metástasis MCAM/MUC18 (*melanocytic specific cellular adhesion molecule*) y MMP-2 (*matrix metalloproteinase 2*).

A pesar de la rápida evolución del conocimiento sobre el significado biológico de los extremadamente diversos marcadores moleculares en medicina humana, aún es poco lo que se conoce acerca del ello en oncología veterinaria.

Afortunadamente, el interés y los esfuerzos por enriquecer el conocimiento en nuestra área son crecientes.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Aplicar las técnicas de inmunohistoquímica al diagnóstico diferencial de NM caninas y establecer parámetros de valor pronóstico.

Objetivos particulares

- Determinar marcadores inmunohistoquímicos aplicables al diagnóstico diferencial de NM benignas, malignas e indiferenciadas.
- Evaluar la expresión de marcadores de proliferación celular en NM y su relación con indicadores histopatológicos de malignidad.
- Evaluar la expresión de marcadores de noviformación vascular y de invasión y su asociación con la progresión de las NM.
- Relacionar entre sí las variables antes mencionadas y evaluar su asociación con la supervivencia de los pacientes con NM.

HIPÓTESIS

- La evaluación de la expresión de antígenos mediante técnicas de inmunohistoquímica en NM caninas contribuye a la formulación del diagnóstico y aporta datos de valor pronóstico.

MATERIALES Y MÉTODOS

SELECCIÓN DE LOS CASOS

Se llevó a cabo la búsqueda de los casos de archivo de neoplasias melanocíticas (NM) caninas ingresados al Servicio de Anatomía Patológica de la Cátedra de Patología Especial durante el período 1995-2006. A ello se sumaron los casos protocolizados en forma prospectiva durante los años 2007, 2008 y primer trimestre de 2009.

Para incluir los casos en el estudio se consideraron la disponibilidad de materiales y la información acerca de los siguientes aspectos clínicos y de la reseña: raza, edad, sexo, localización anatómica, tamaño (diámetro mayor) y ulceración (presencia o ausencia).

Se incluyeron 127 casos, los que fueron agrupados según su localización anatómica en NM cutáneas (83) y NM orales (44).

ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Se aplicó la clasificación propuesta por la OMS (1998), utilizando cortes histológicos coloreados con H&E y, en algunos casos, con la coloración de Fontana Masson. Durante la observación microscópica se registraron el diagnóstico histopatológico (melanocitoma, melanoma), el tipo celular predominante (epiteliode, fusiforme, mixto, globoso, redondo), el grado de pigmentación mediante una escala subjetiva de 1 a 4 (1= pigmento no evidenciable o evidenciable mediante coloraciones especiales, 2= escasa cantidad de pigmento presente sólo en algunas células, 3= gran cantidad de pigmento presente sólo en algunas células y 4= gran cantidad de pigmento presente en la mayoría de las células), el índice mitótico desde 0 hasta 3 o más mitosis en

la observación de 10 campos de mayor aumento (400x, 0,22 mm²), y, en las NM cutáneas, la actividad en la unión dermoepidérmica (presente o ausente).

Los datos fueron tabulados y se determinó la distribución de frecuencias para cada una de las variables analizadas.

ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS CUALITATIVOS

Se utilizó un total de 121 neoplasias (36 melanocitomas, 42 melanomas cutáneos y 43 melanomas orales). Dado el interés por caracterizar la inmunomarcación en NM benignas y malignas, se excluyeron las NM no clasificadas. Para la inmunomarcación (IM) se utilizó la técnica de peroxidasa (anexo II) y el kit de detección LSAB2[®] System HRP (Dako) con revelado mediante diaminobencidina (DAB, Dako). Los anticuerpos utilizados fueron: vimentina (RTU-VIM-V9, Novocastra), proteína S100 (RTU-S100p, policlonal en conejo, Novocastra), melan A (RTU-Melan A, clon A 103, Novocastra) y tirosinasa (clon T311, Dako, 1/25). En los controles negativos se reemplazó el anticuerpo primario por PBS (buffer salino de fosfato, anexo V). Los protocolos de recuperación antigénica empleados en cada caso se incluyeron en el anexo II. Con posterioridad a la IM se realizó la decoloración de la melanina mediante la técnica del agua oxigenada (anexo III).

Se realizó la evaluación cualitativa de la IM, registrando el porcentaje de NM positivas, así como las siguientes características de la misma: distribución en el corte (homogénea, heterogénea), intensidad (fuerte, moderada, débil), localización celular (citoplasmática, nuclear, ambas) y patrón celular de la reacción (difuso, polar, ambos).

ESTUDIOS INMUNOCITOQUÍMICOS

Se trabajó con extendidos realizados por los métodos tradicionales de toma de muestras para citología. Los mismos se obtuvieron de casos de NM positivas a los marcadores a evaluar, en ocasiones en que se realizaron estudios post mórtem o bien a partir de masas extirpadas quirúrgicamente. Los preparados se procesaron dentro de la primera semana después de obtenidos. Para la IM se utilizó la técnica de peroxidasa y el kit de detección LSAB2[®] System HRP (Dako) con revelado mediante diaminobencidina (DAB, Dako). Los anticuerpos utilizados fueron: vimentina (RTU-VIM-V9, Novocastra), proteína S100 (RTU-S100p, policlonal en conejo, Novocastra), melan A (RTU-Melan A, clon A 103, Novocastra). En los controles negativos se reemplazó el anticuerpo primario por PBS. La técnica de inmunocitoquímica utilizada se presenta en el anexo IV.

ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS CUANTITATIVOS

Las neoplasias fueron seleccionadas para su inclusión en esta parte del estudio de acuerdo con la disponibilidad la cantidad de tejido requerida para la cuantificación de la IM en cada caso. Se utilizaron 114 neoplasias para PCNA (71 NM cutáneas y 43 NM orales), 112 para Ki67 (69 NM cutáneas y 43 NM orales) y 119 para factor de von Willebrand (76 NM cutáneas y 43 NM orales). Para el caso de MMP-2, se seleccionaron 11 NM (5 NM cutáneas y 6 NM orales), incluyendo la neoplasia primaria y sus metástasis en tres de los casos.

Algunos casos debieron ser excluidos debido a la desintegración del tejido durante la recuperación antigénica (especialmente en el procesamiento con Ki67). Para la IM se

utilizó la técnica de peroxidasa (anexo II) y el kit de detección LSAB2[®] System HRP (Dako) con revelado mediante diaminobencidina (DAB, Dako). Los anticuerpos utilizados fueron: PCNA (clon PC10, Dako, 1/50), Ki67 (clon MIB-1, Dako 1/100), factor de von Willebrand (policlonal en conejo, Dako, 1/100) y MMP-2 (clon 75-7F7, Calbiochem, 1/100). En los controles negativos se reemplazó el anticuerpo primario por PBS. Los protocolos de recuperación antigénica empleados en cada caso se presentan en el anexo II. Con posterioridad a la IM se realizó la decoloración de la melanina mediante la técnica del agua oxigenada (anexo III).

Para la cuantificación de la IM de PCNA y Ki67 se utilizaron imágenes digitales obtenidas mediante una cámara digital (Nikon COOLPIX 4300) montada en un microscopio (Nikon ECLIPSE 50i.). Se seleccionaron las áreas de marcación más intensa y se obtuvieron microfotografías de alta resolución a 400 aumentos de, al menos, 5 campos. Mediante el uso del programa Image J 1.43e (National Institutes of Health, USA), se estimaron los siguientes parámetros: a) área nuclear total, correspondiente al área representada por núcleos celulares (positivos o negativos), b) área nuclear positiva a PCNA y c) área nuclear positiva a Ki67. Los índices de proliferación (IP) para ambos marcadores (IP-PCNA, IP-Ki67) se obtuvieron expresando el área nuclear positiva como porcentaje del área nuclear total.

Para la cuantificación de la IM de factor de von Willebrand se seleccionaron las áreas de marcación más intensa ("hot spots") y se obtuvieron microfotografías de 3 campos a 200 aumentos, a partir de las cuales se estimaron el área endotelial (AE) y la densidad de microvasos (DMV). La primera se estableció mediante el método propuesto

por Leme y col. (106), midiendo el área inmunopositiva en forma automática, utilizando el programa Image J 1.43e (National Institutes of Health, USA). La misma se expresó como porcentaje del área total. Para la estimación de la DMV se empleó el método propuesto por Weidner y col. (93), utilizando microfotografías con una superficie de 0,29 mm². Además de los vasos bien definidos, se consideraron como vasos individuales y contables las células endoteliales aisladas o en grupos que aparecían separados de vasos adyacentes, con o sin luz o glóbulos rojos. La DMV se expresó como la cantidad de microvasos por mm².

ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA

Se incluyeron en esta parte del estudio todos aquellos casos en los que se dispuso de información acerca de la evolución del paciente luego del tratamiento quirúrgico, así como del tiempo de supervivencia, evaluado durante un período de un año.

El grupo mayoritario se obtuvo a partir de los casos protocolizados en forma prospectiva durante los años 2007, 2008 y primer trimestre de 2009. Se seleccionó un grupo de pacientes en los cuales fue posible la realización de controles periódicos durante un periodo de, al menos, un año. Los citados controles estuvieron a cargo de médicos veterinarios clínicos (en contacto permanente con el Servicio de Anatomía Patológica de la Cátedra de Patología Especial) y consistieron en un examen físico, a fin de constatar posibles recidivas o la ocurrencia de metástasis, así como de registrar la causa y la fecha de muerte (en los casos en que ésta ocurrió). En algunos casos fue posible la realización, además, de un examen radiográfico de tórax.

Los casos en los que no pudo conocerse la causa de la muerte fueron excluidos. Se consideró muerte relacionada con la neoplasia a aquella ocurrida naturalmente o mediante la eutanasia, debido a la invasión local o a la diseminación metastásica de la enfermedad, con deterioro evidente de la calidad de vida del paciente. La constatación de la presencia de metástasis se realizó radiográfica o ecográficamente, o bien mediante el examen post mórtem.

En los casos ingresados con anterioridad al año 2007, se obtuvieron los datos de interés, a partir de los registros de los médicos veterinarios clínicos a cargo de cada paciente.

El tiempo de supervivencia se definió como el lapso transcurrido entre el diagnóstico histopatológico y la muerte del paciente o la finalización del período de seguimiento.

A los efectos del análisis, los pacientes fueron divididos en tres grupos de supervivencia:

Pacientes con supervivencia larga: aquellos que permanecieron vivos al finalizar el período de seguimiento o que murieron luego de los 8 meses de formulado el diagnóstico.

Pacientes con supervivencia intermedia: aquellos que murieron entre los 4 y los 8 meses posteriores a la formulación del diagnóstico.

Pacientes con supervivencia corta: aquellos que murieron antes de los 4 meses de formulado el diagnóstico.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A fin de evaluar la asociación entre variables cualitativas (características clinicopatológicas y de la inmunomarcación cualitativa), se utilizó la prueba de X^2 , aplicando la corrección de Yates cuando el 25% de las frecuencias esperadas fue inferior a 5. En el caso de variables cualitativas ordinales (grado de melanización) se utilizó la prueba de X^2 de tendencia lineal. En el caso de grupos pequeños de variables, en los que no se verificaron los requisitos de las frecuencias esperadas de la prueba de X^2 , se utilizó la prueba exacta de Fisher. Las tablas de 2 x 3 se transformaron en tablas de 2 x 2, unificando grupos de variables (intensidad de marcación fuerte vs moderada-débil, patrón citoplasmático de la reacción difuso vs polar). No se analizaron los grupos de variables que no se ajustaron a los supuestos de las pruebas mencionadas ni tampoco aquellos cuyas frecuencias observadas fueron similares entre sí.

Para la comparación de las medias de dos o más grupos de las variables cuantitativas (índices de proliferación, AE y DMV) se utilizaron las pruebas de Student y ANOVA. En los casos en que los datos no superaron la prueba de normalidad (Shapiro-Wilk), se utilizaron las pruebas no paramétricas de Mann-Whitney y Kruskal Wallis. La correlación entre variables se evaluó mediante la prueba de Spearman.

Para la estimación de la probabilidad de supervivencia se utilizó el método de Kaplan-Meier. Los pacientes que permanecieron vivos al finalizar el período de seguimiento, o que murieron por causas no relacionadas con la neoplasia, se consideraron censurados. Las diferencias en la probabilidad de supervivencia entre los grupos se evaluaron mediante la prueba del logaritmo del rango (log-rank test).

Los resultados se consideraron significativos en un nivel del 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO, ASPECTOS CLÍNICOS Y DE LA RESEÑA

Las NM cutáneas fueron más frecuentes que las NM orales. Las primeras representaron el 65% (83/127) del total de las neoplasias estudiadas y las segundas, el 35% (44/127) restante.¹

El 46% (38/83) de las NM cutáneas estuvo representado por melanocitomas, el 51% (42/83) por melanomas y el 3% (3/83) restante por NM que no pudieron ser incluidas en alguno de los grupos anteriores mediante las técnicas convencionales (NM no clasificadas). El 98% (43/44) de las NM orales correspondió a melanomas y el 2% (1/44) restante a NM no clasificadas.

Los animales mestizos fueron los más comúnmente afectados (figuras 1 y 2). Las razas Ovejero Alemán y Rottweiler presentaron una frecuencia mayor de NM que el resto de las razas consignadas en el estudio. En esta última, además, el 90% de las neoplasias fue maligno. En el caso particular de las NM cutáneas, resultó llamativa la cantidad de animales de la raza Doberman, no registrándose NM orales en esta raza. Contrariamente, las razas Cocker Spaniel y Pequinés mostraron una proporción de NM orales claramente mayor respecto de las NM cutáneas.

¹ Los datos fuente del trabajo completo se presentan en el anexo VI.

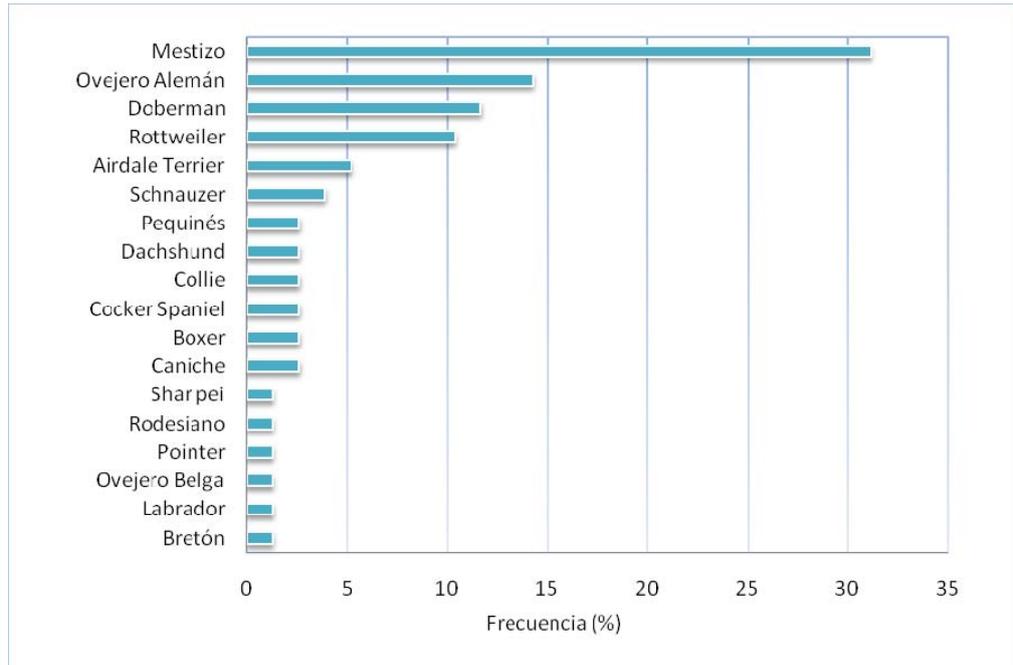


Figura 1. Distribución de las NM cutáneas según la raza.

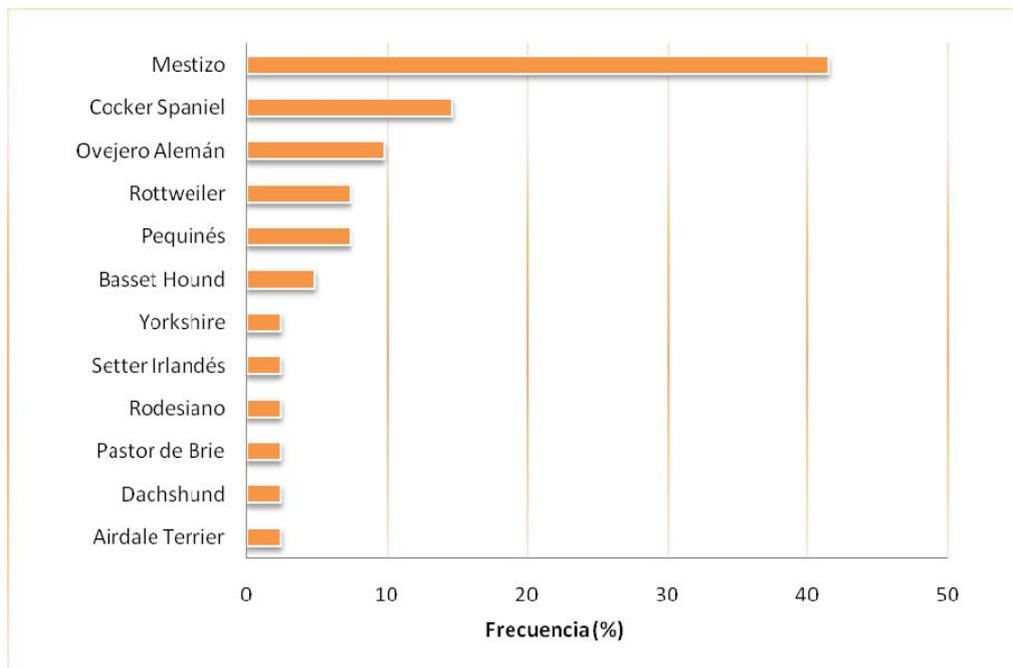


Figura 2. Distribución de las NM orales según la raza.

En las NM cutáneas, la cantidad de hembras y machos afectados fue similar, aunque los machos mostraron mayor frecuencia de melanomas (62%; 23/42) y las hembras de melanocitomas (55 %; 23/37). En lo que respecta a las NM orales (melanomas), los machos resultaron más frecuentemente afectados que las hembras (58%; 25/43).

La edad promedio de presentación de las NM cutáneas fue de 8,7 años (mínimo=2; máximo=16). Esta fue similar en melanocitomas y en melanomas. El 50% de los casos se presentó en animales de entre 7 y 11 años. En las NM orales, la edad promedio de presentación fue ligeramente superior; 10,6 años (mínimo=4; máximo=19). Asimismo, el 50% de los casos se presentó en animales de entre 9 y 13 años.

Los hallazgos relacionados con la localización de las NM se muestran en las figuras 3 y 4.

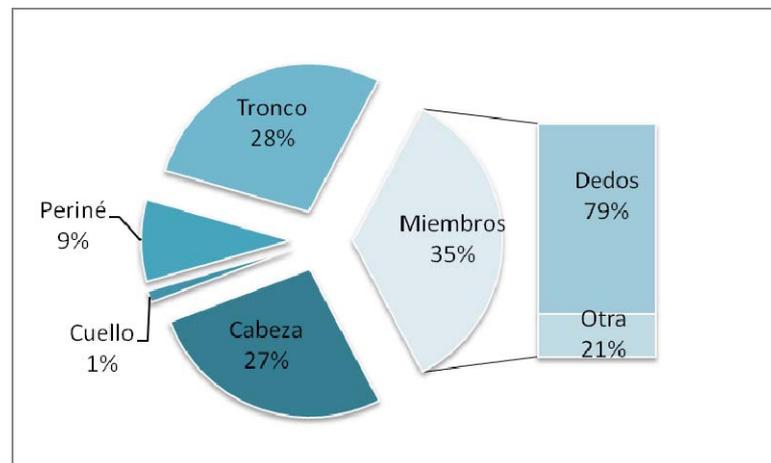


Figura 3. Distribución de las NM cutáneas según su localización.

Cabe destacar que el 83% (19/23) de las neoplasias digitales fueron melanomas.

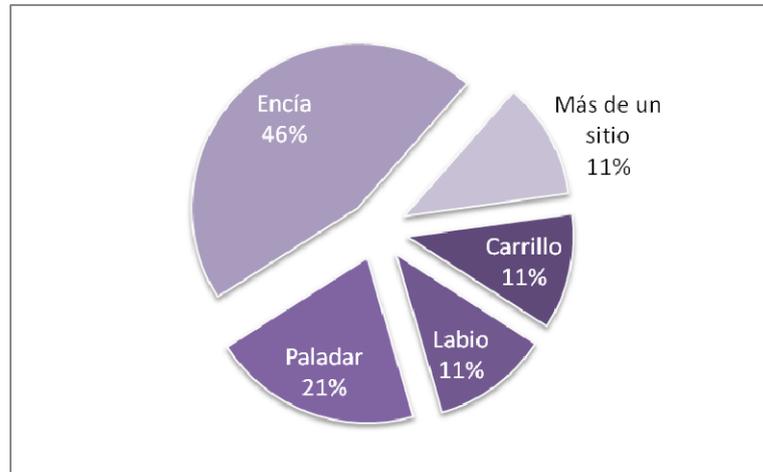


Figura 4. Distribución de las NM orales según su localización.

Ambas encías, maxilar y mandibular, resultaron comprometidas. Las neoplasias localizadas en más de un sitio causaron la afección conjunta de las encías, el paladar y los carrillos.

El diámetro mayor de las neoplasias (consignado sólo en el 70% de los casos) fue, en promedio, de 2,7 cm en las NM cutáneas y de 4,3 cm en las NM orales.

Se consignó la presencia de ulceración en el 24% (20/83) de las NM cutáneas estudiadas, (especialmente en melanomas) y en el 29% (10/44) de las NM orales. Cabe mencionar que en dos de los casos de melanoma cutáneo (ambos localizados en escroto), la ulceración fue la única manifestación de la neoplasia.

En lo que respecta a las características histopatológicas, la actividad en la unión dermoepidérmica se presentó en el 64% (23/36) de los melanocitomas y en el 30%

(10/33) de los melanomas cutáneos. En el 17% (14/83) de los casos no fue posible realizar dicha evaluación.

La distribución de los tipos celulares en las NM se muestra en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Distribución de tipos celulares en las NM cutáneas

Tipo celular	Melanocitomas		Melanomas		NMNC		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Epitelioide	10	26	15	37	2	67	27	33
Fusiforme	10	26	9	21	1	33	20	24
Mixto	18	48	17	40	-	-	35	42
Globoso	-	-	1	2	-	.	1	1
Total	38	100	42	100	3	100	83	100

NMNC: neoplasias melanocíticas no clasificadas.

Tabla 2. Distribución de tipos celulares en las NM orales

Tipo celular	Melanomas		NMNC		Total	
	n	%	n	%	n	%
Epitelioide	14	32	-	-	14	32
Fusiforme	11	26	-	-	11	25
Mixto	16	37	-	-	16	36
Redondo	2	5	-	-	2	5
Globoso	0	0	1	100	1	2
Total	43	100	1	100	44	100

NMNC: neoplasias melanocíticas no clasificadas.

La distribución de los grados de melanización en las NM se muestra en las tablas 3 y 4.

Tabla 3. Distribución de grados de melanización en las NM cutáneas

Melanización Grados	Melanocitomas		Melanomas		NMNC		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
1	2	5	4	10	-	-	6	7
2	4	11	9	21	-	-	13	16
3	12	32	19	45	2	67	33	40
4	20	52	10	24	1	33	31	37
Total	38	100	42	100	3	100	83	100

NMNC: neoplasias melanocíticas no clasificadas.

Tabla 4. Distribución de grados de melanización en las NM orales

Melanización Grados	Melanomas		NMNC		Total	
	n	%	n	%	n	%
1	12	28	1	100	13	30
2	6	14	-	-	6	14
3	20	47	-	-	20	45
4	5	11	-	-	5	11
Total	43	100	1	100	44	100

NMNC: neoplasias melanocíticas no clasificadas.

El índice mitótico en las NM se muestra en las tablas 5 y 6.

Tabla 5. Índice mitótico en las NM cutáneas

Índice mitótico (mitosis/10CMA)	Melanocitomas		Melanomas		NMNC		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<3	38	100	19	45	3	100	60	72
≥3	-	-	23	55	-	-	23	28
Total	38	100	42	100	3	100	83	100

NMNC: neoplasias melanocíticas no clasificadas. CMA: campos de mayor aumento.

Tabla 6. Índice mitótico en las NM orales

Índice mitótico (mitosis/10CMA)	Melanomas		NMNC		Total	
	n	%	n	%	n	%
<3	16	37	1	100	17	39
≥3	27	63	-	-	27	61
Total	43	100	1	100	44	100

NMNC: neoplasias melanocíticas no clasificadas. CMA: campos de mayor aumento.

En las figuras 5 a 10 se ilustran algunas de las características microscópicas descritas en las NM cutáneas y orales.

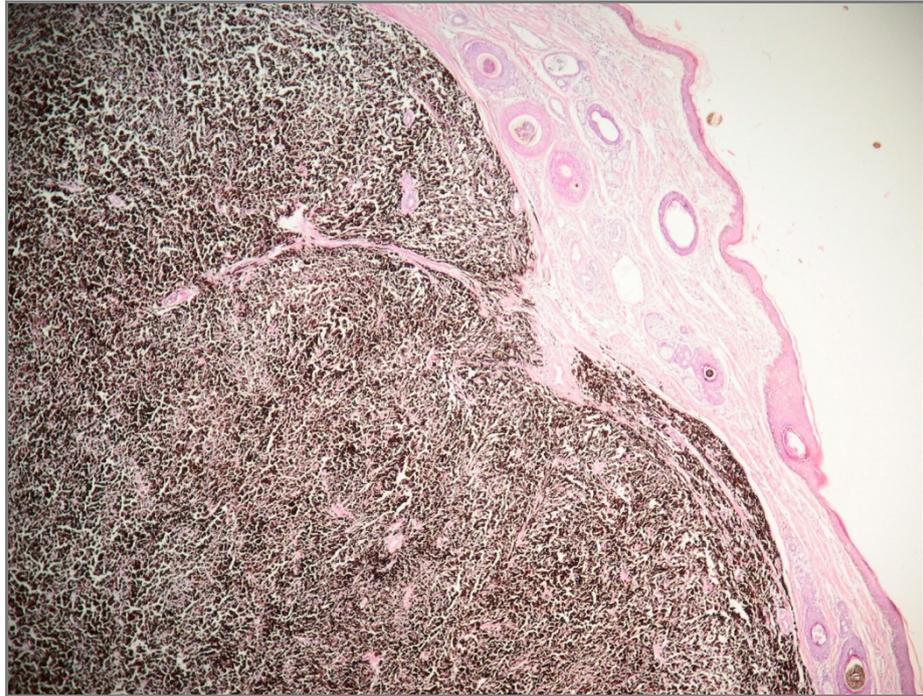


Figura 5. Melanocitoma de tipo celular mixto con melanización de grado 4. H & E (obj. 4x).

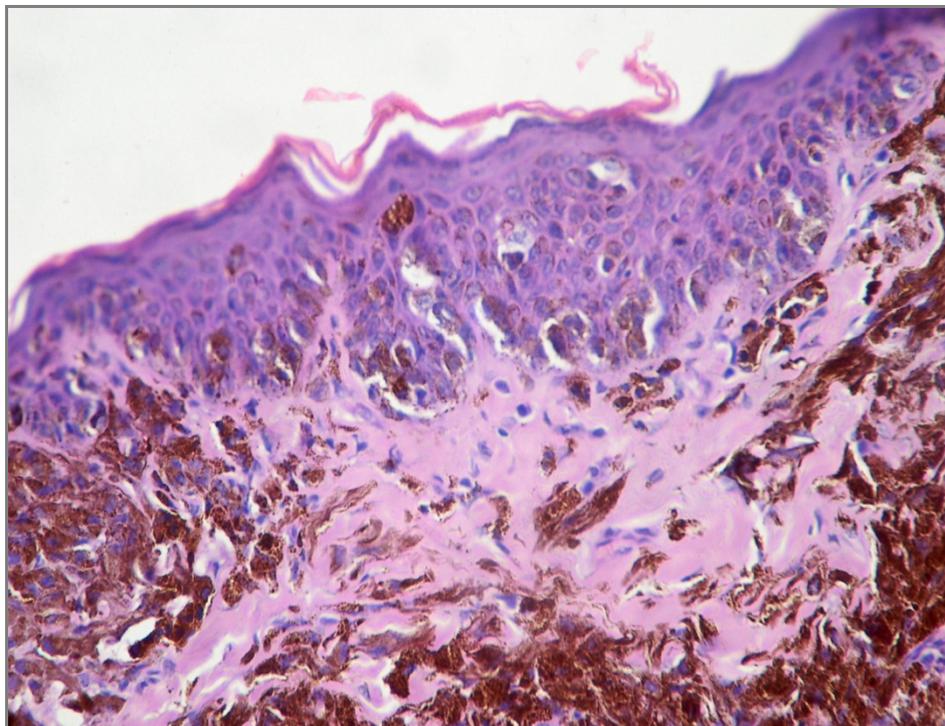


Figura 6. Melanocitoma de células fusiformes, con actividad en la unión dermoepidérmica y melanización de grado 4. H & E (obj. 20x).

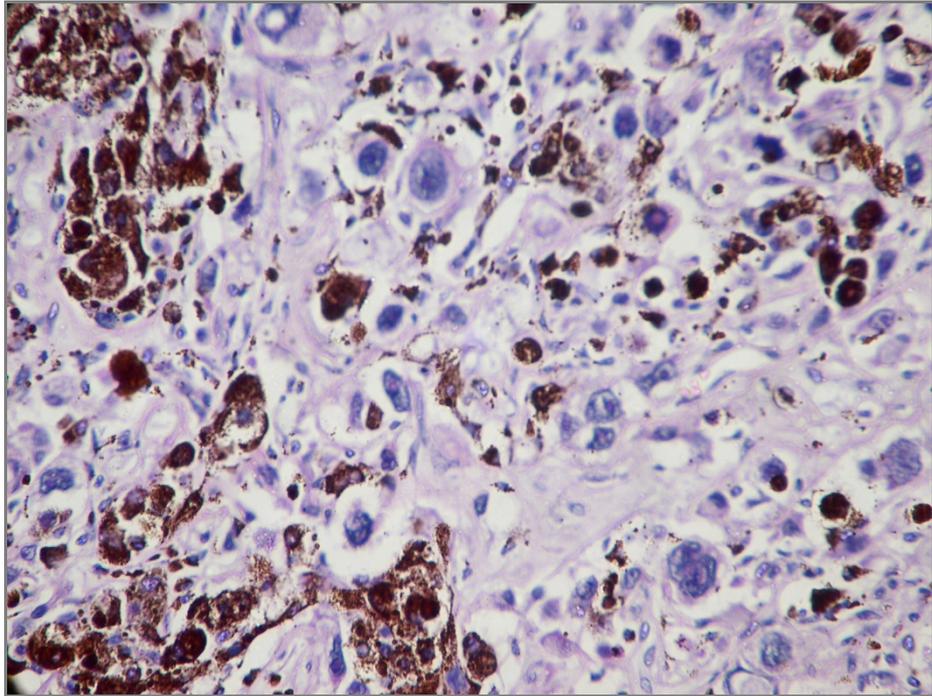


Figura 7. Melanoma de células epitelioides con melanización de grado 3. Marcado pleomorfismo celular. H & E (obj. 100x).

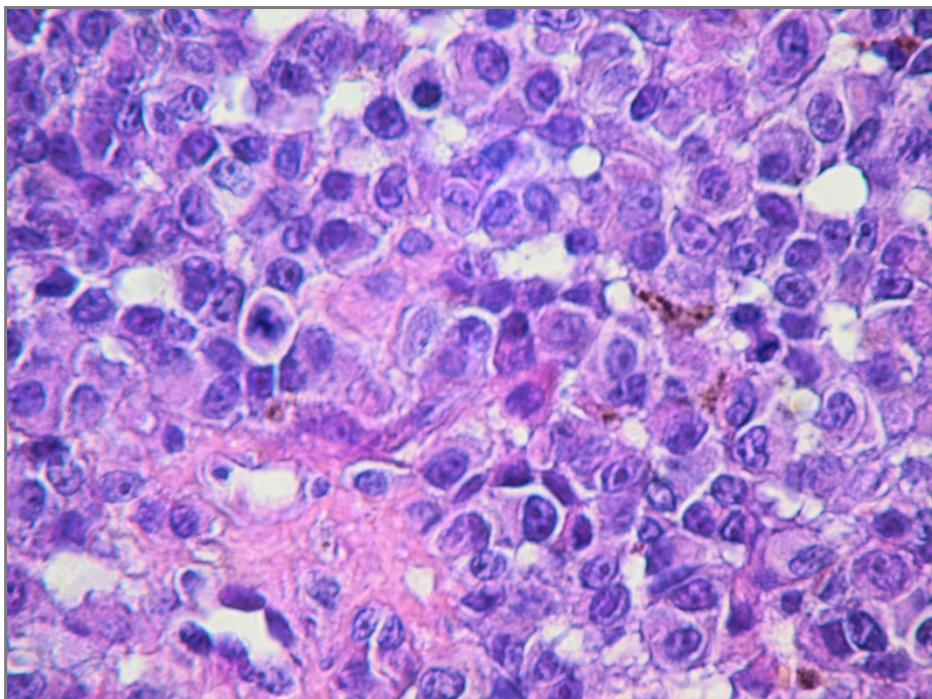


Figura 8. Melanoma de células epitelioides con melanización de grado 2. Anisocariosis y figuras mitóticas. H & E (obj. 100x).

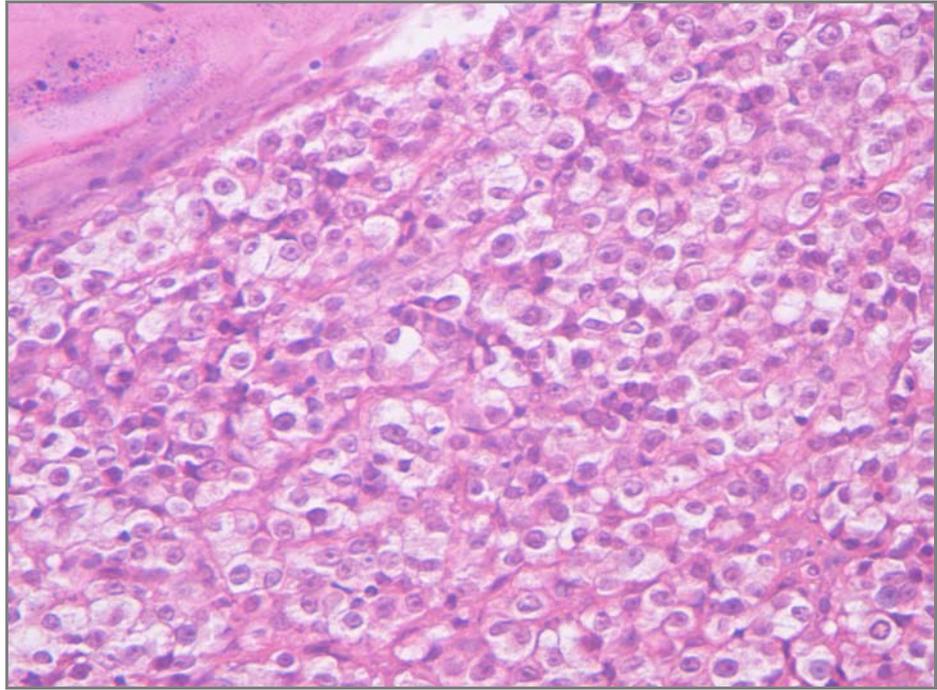


Figura 9. Melanoma cutáneo de células globosas. No se observa melanina. H & E (obj. 40x).

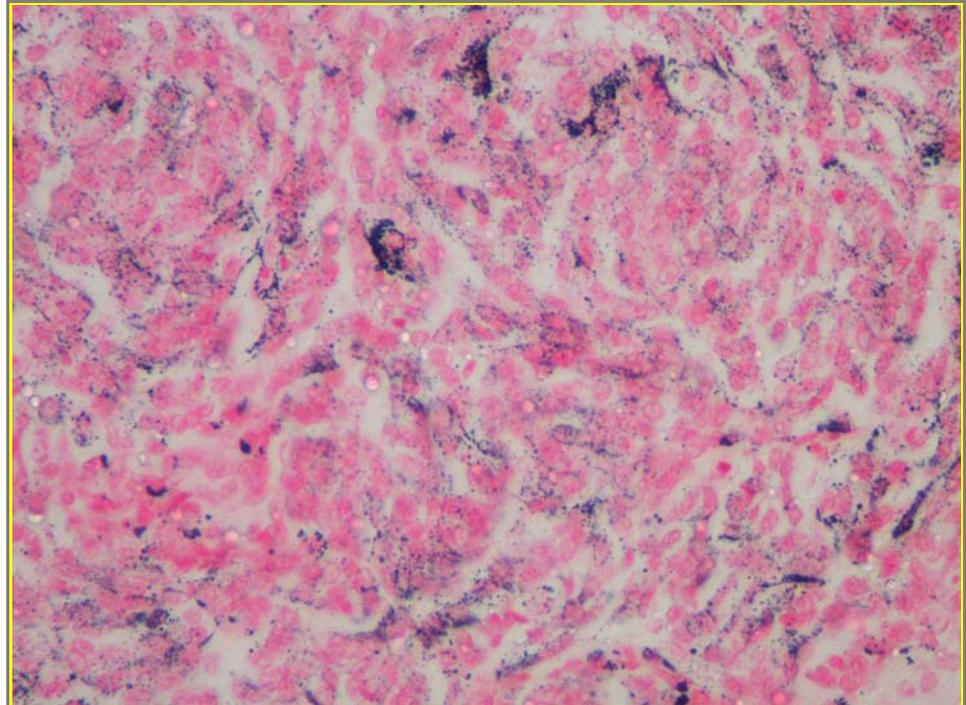


Figura 10. Melanoma de células fusiformes con melanización de grado 1. Fontana Masson (obj. 20x).

La relación entre el tipo celular, el grado de melanización y el índice mitótico en las NM se muestra en las figuras 11 a 16.

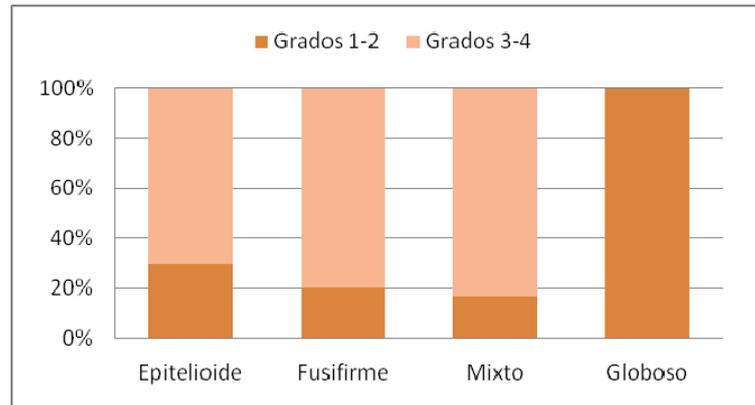


Figura 11. Grado de melanización según el tipo celular en las NM cutáneas.

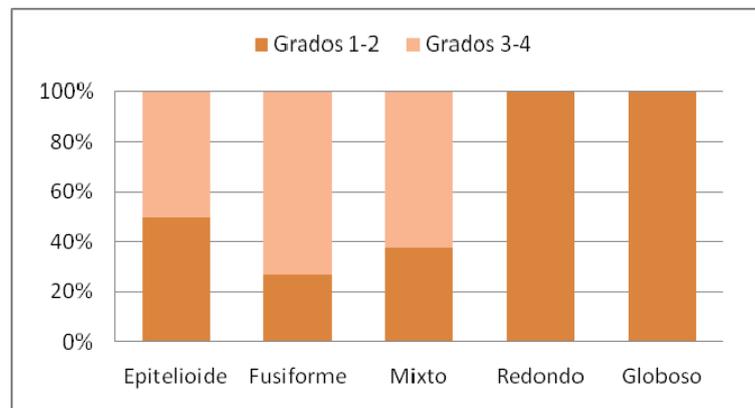


Figura 12. Grado de melanización según el tipo celular en las NM orales.

Las diferencias observadas en la distribución de los grados de melanización de acuerdo con el tipo celular en las NM cutáneas no fueron significativas ($p > 0,522$). Esta

relación se analizó por separado en melanocitomas y melanomas, observándose sólo ligeras variaciones entre ambos. Lo mismo ocurrió en las NM orales ($p=0,564$) (los tipos celulares redondo y globoso se excluyeron de la prueba estadística dada su escasa cantidad).

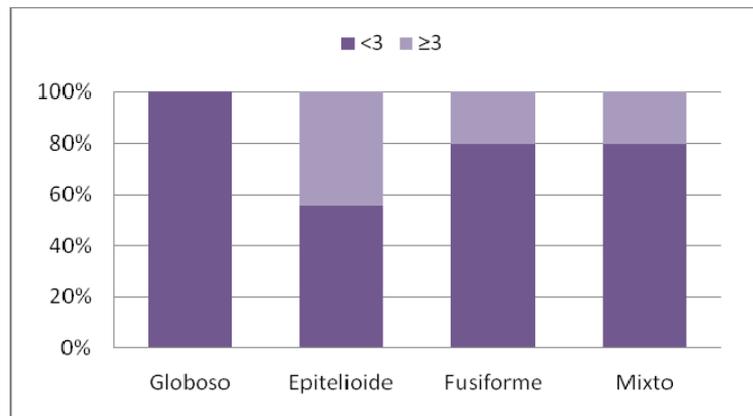


Figura 13. Índice mitótico según el tipo celular en las NM cutáneas.

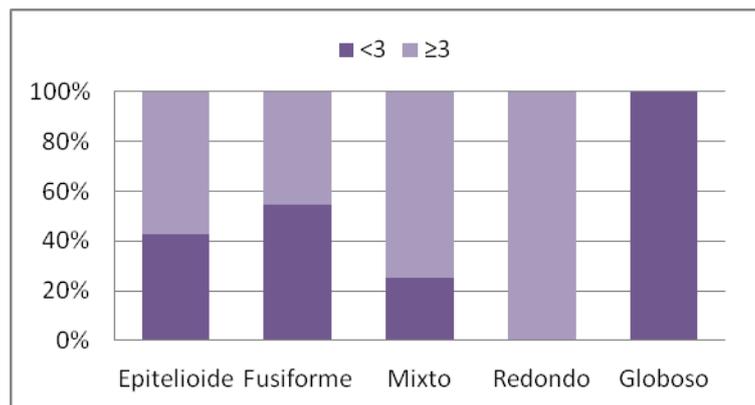


Figura 14. Índice mitótico según el tipo celular en las NM orales.

El tipo celular y el índice mitótico también resultaron independientes, tanto en las NM cutáneas ($p=0,068$) como en las NM orales ($p=0,144$) (los tipos celulares minoritarios, globoso y redondo, se desestimaron en las pruebas estadísticas dada su escasa cantidad).

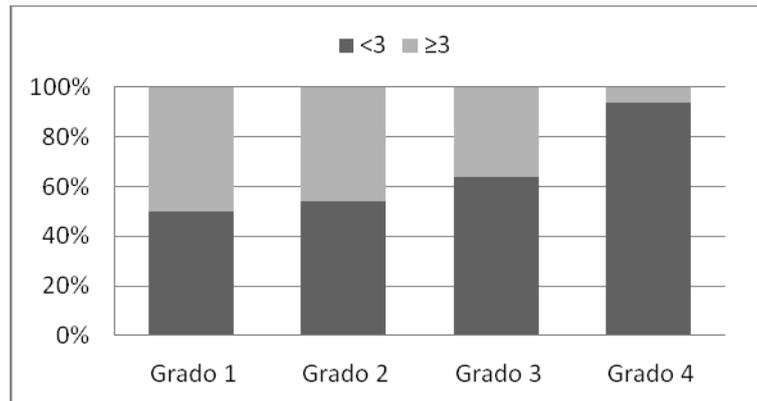


Figura 15. Índice mitótico según el grado de melanización en las NM cutáneas.

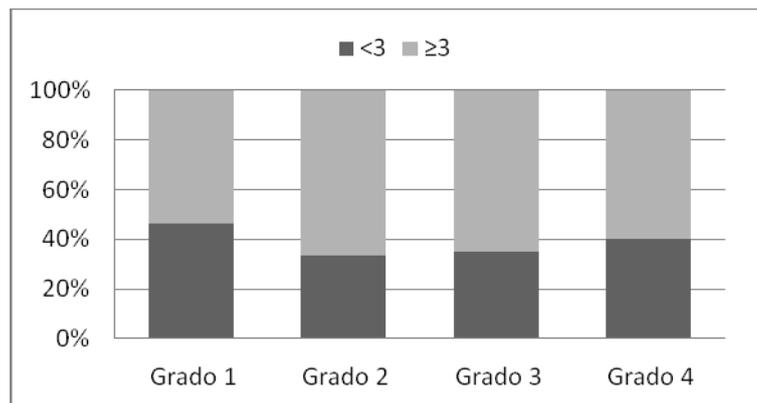


Figura 16. Índice mitótico según el grado de melanización en las NM orales.

Se encontró una disminución significativa en la frecuencia del hallazgo de 3 o más mitosis en 10 CMA en función del aumento del grado de melanización en las NM cutáneas ($p=0,001$). Esta disminución se manifestó en forma más marcada en las neoplasias de melanización de grado 4. Contrariamente, el índice mitótico resultó independiente del grado de melanización en las NM orales ($p=0,964$).

Por otro lado, se analizó la relación del diagnóstico histopatológico en las NM cutáneas (melanocitomas y melanomas) con las características clinicopatológicas (tabla 7). Se encontró al primero estrechamente relacionado con la localización de la neoplasia, su diámetro mayor, la actividad en la unión dermoepidérmica, el grado de melanización y el índice mitótico.

Tabla 7. Relación del diagnóstico histopatológico (melanocitoma y melanoma) con las características clinicopatológicas en las NM cutáneas

	Melanocitomas		Melanomas		p
	n	%	n	%	
Sexo					
Macho	14	38	23	62	0,184
Hembra	23	55	19	45	
NC (1)					
Edad					
≤ 8	21	50	21	50	0,620
≥ 9	16	44	20	56	
NC (2)					
Localización					
Digital	3	14	19	86	<0,001
Otra	35	60	23	40	
Diámetro mayor					
≤ 2	22	67	11	33	0,004
> 2	6	27	16	73	
NC (25)					
Ulceración					
Presencia	6	32	13	68	0,111
Ausencia	32	57	29	43	
Actividad en la UDE					
Presencia	23	70	10	30	0,005
Ausencia	13	36	23	64	
NE (11)					
Tipo celular					
Epitelioide	10	40	15	60	0,590
Fusiforme	10	53	9	47	
Mixto	18	51	17	49	
Globoso*	0	0	1	100	
Melanización					
Grado 1	2	33	4	67	0,019**
Grado 2	4	31	9	69	
Grado 3	12	39	19	61	
Grado 4	20	67	10	33	
Índice mitótico (mitosis/10CMA)					
< 3	38	67	19	33	<0,001
≥ 3	0	0	23	100	

NC: no consignado. UDE: unión dermoepidérmica. NE: no evaluable. CMA: campos de mayor aumento.

*No incluido en la prueba estadística. **X² de tendencia lineal.

ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS CUALITATIVOS

Vimentina

De total de NM cutáneas analizadas, el 97% de los melanocitomas (35/36) y el 95% de los melanomas (40/42) fueron positivos a vimentina. Las características de la IM fueron similares en melanocitomas y melanomas, por lo que los resultados se muestran en el conjunto de las NM cutáneas. Dichas características se presentan en la tabla 8.

Tabla 8. Características de la IM de vimentina en las NM cutáneas

	NM cutáneas (n=75)	
	n	%
Distribución		
Homogénea	63	84
Heterogénea	12	16
Intensidad		
Fuerte	44	59
Moderada	25	33
Débil	6	8
Patrón		
Difuso	74	99
Difuso/polar	1	1

En las NM orales, el 98% (42/43) fue positivo a vimentina. Las características de la IM fueron similares a aquellas observadas en las NM cutáneas, a excepción de la ausencia, en este caso, de la marcación de intensidad débil (tabla 9).

Tabla 9. Características de la IM de vimentina en las NM orales

Vimentina	NM orales (n=42)	
	n	%
Distribución		
Homogénea	37	88%
Heterogénea	5	12%
Intensidad		
Fuerte	27	64%
Moderada	15	36%
Débil	0	0%
Patrón		
Difuso	42	100%
Difuso/polar	0	0%

En la figura 17 se ilustran algunas de las características de la IM de vimentina.

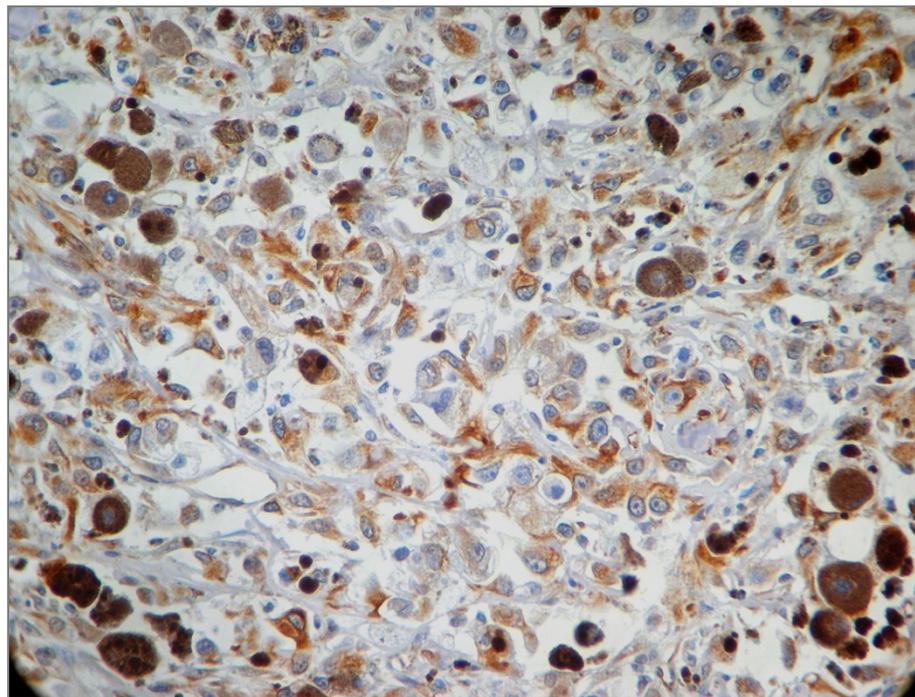


Figura 17. IM de vimentina en melanocitoma, sin decoloración de la melanina. La IM es citoplasmática y de intensidad fuerte (obj. 40x).

La relación entre la intensidad de marcación de vimentina y su distribución en las NM cutáneas y orales se muestra en las figuras 18 y 19. Estas características fueron similares en melanocitomas y melanomas cutáneos, por lo que se analizaron en conjunto.

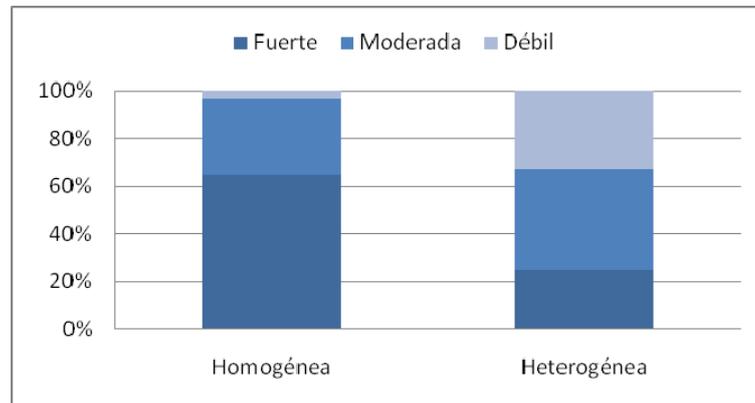


Figura 18. Intensidad según distribución de la IM de vimentina en las NM cutáneas.

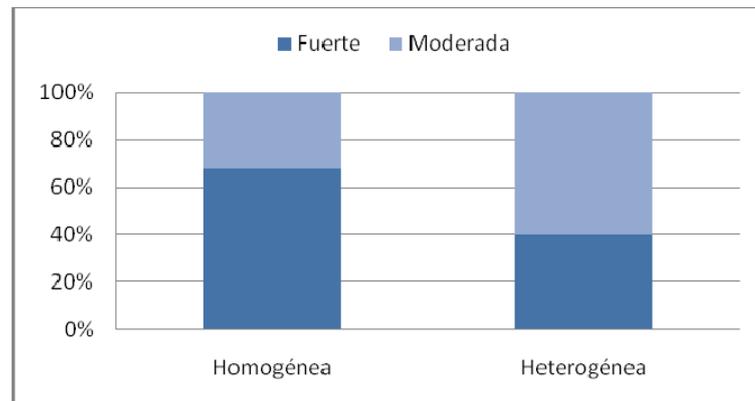


Figura 19. Intensidad según distribución de la IM de vimentina en las NM orales.

En las NM cutáneas, la intensidad de marcación difirió significativamente entre los dos tipos de distribución ($p < 0,001$). La IM homogénea fue de fuerte a moderada en la mayoría de los casos. Contrariamente, la marcación heterogénea fue, en su mayoría, de moderada a débil.

La intensidad de marcación de vimentina y su distribución fueron independientes en las NM orales ($p>0,05$).

La relación entre la intensidad de la IM de vimentina y las características histopatológicas en las NM cutáneas y orales se muestra en las figuras 20 a 25. Melanocitomas y melanomas cutáneos se analizan en conjunto dado que no mostraron diferencias al respecto.

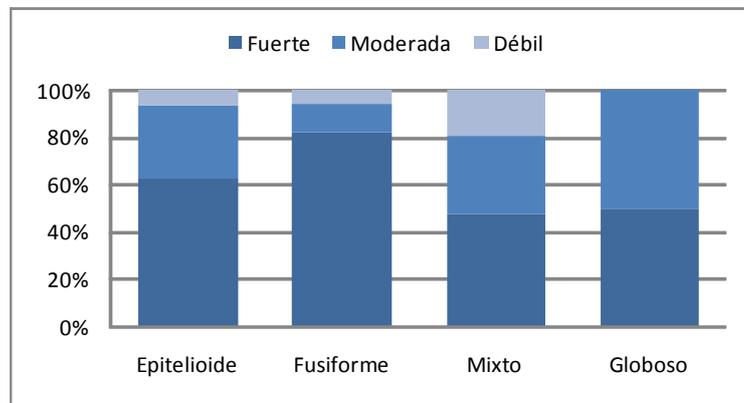


Figura 20. Intensidad de la IM de vimentina según el tipo celular en las NM cutáneas.

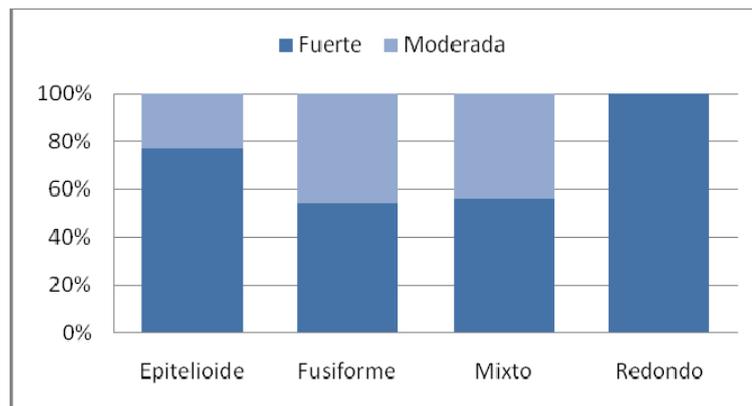


Figura 21. Intensidad de la IM de vimentina según el tipo celular en las NM orales.

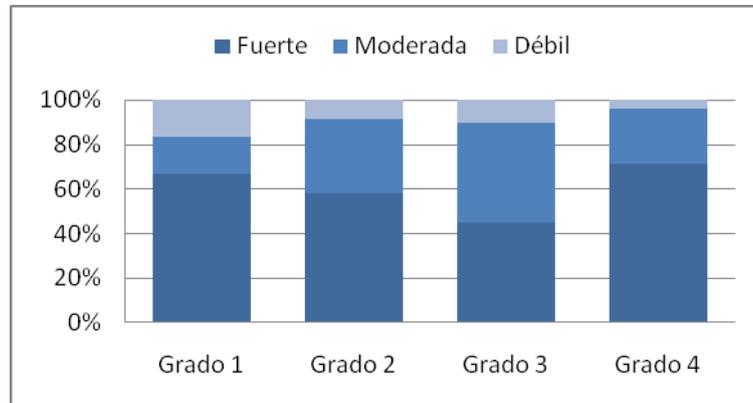


Figura 22. Intensidad de la IM de vimentina según el grado de melanización en las NM cutáneas.

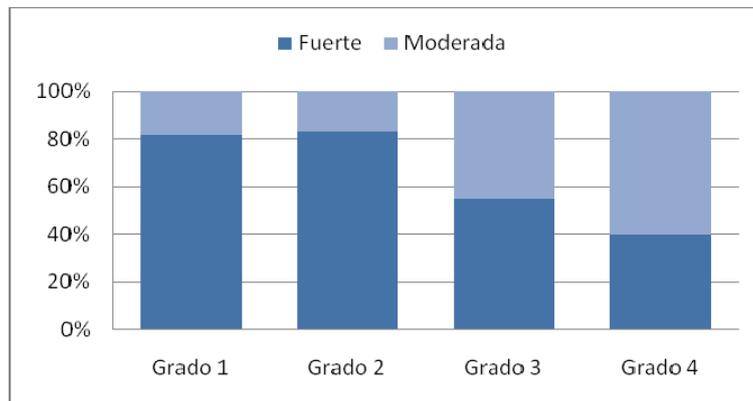


Figura 23. Intensidad de la IM de vimentina según el grado de melanización en las NM orales.

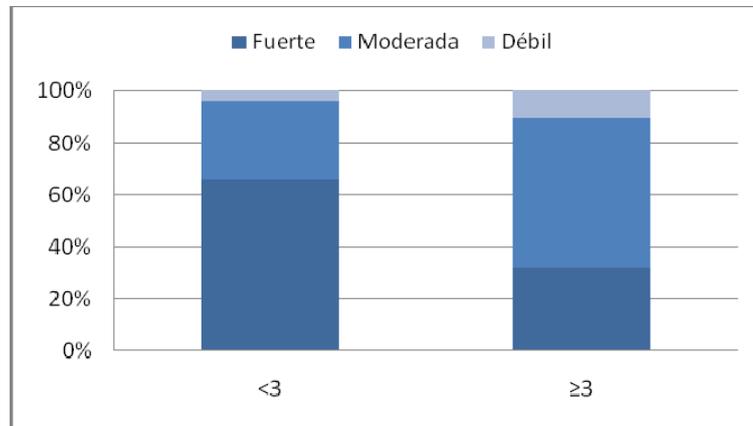


Figura 24. Intensidad de la IM de vimentina según el índice mitótico en las NM cutáneas.

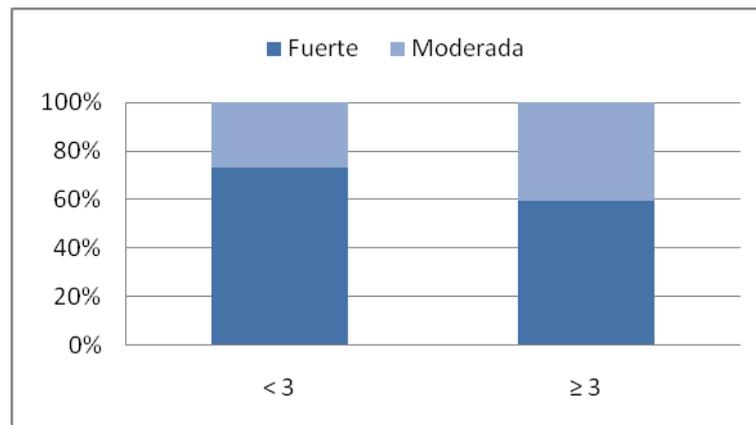


Figura 25. Intensidad de la IM de vimentina según el índice mitótico en las NM orales.

No se observaron diferencias significativas en la intensidad de la IM de vimentina en relación con el tipo celular, el grado de melanización y el índice mitótico en las NM cutáneas y orales ($p>0,05$).

Proteína S100

De total de NM cutáneas analizadas, el 92% de los melanocitomas (33/36) y el 93% de los melanomas (39/42) fueron positivos a proteína S100. Las características de la IM de proteína S100 fueron similares en melanocitomas y melanomas, por lo que los resultados se muestran en el conjunto de las NM cutáneas (tabla 10).

Tabla 10. Características de la IM de proteína S100 en las NM cutáneas

Proteína S100	NM cutáneas (n=72)	
	n	%
Distribución		
Homogénea	42	58
Heterogénea	30	42
Intensidad		
Fuerte	29	40
Moderada	32	45
Débil	11	15
Localización		
Nuclear-citoplasmática	65	90
Nuclear	6	8
Citoplasmática	1	2

En las NM orales, el 88% (38/43) fue positivo a proteína S100. Las características de la IM de proteína S100 también fueron similares a aquellas observadas en las NM cutáneas (tabla 11).

Tabla 11. Características de la IM de proteína S100 en las NM orales

Proteína S100	NM orales (n=38)	
	n	%
Distribución		
Homogénea	19	50
Heterogénea	19	50
Intensidad		
Fuerte	14	37
Moderada	19	50
Débil	5	13
Localización		
Nuclear-citoplasmática	22	58
Nuclear	16	42
Citoplasmática	0	0

Si bien en las NM orales se observó una mayor proporción de IM nuclear, la marcación nuclear y citoplasmática fue predominante, al igual que en las NM cutáneas.

En la figura 26 se ilustran algunas de las características de la IM de proteína S100.

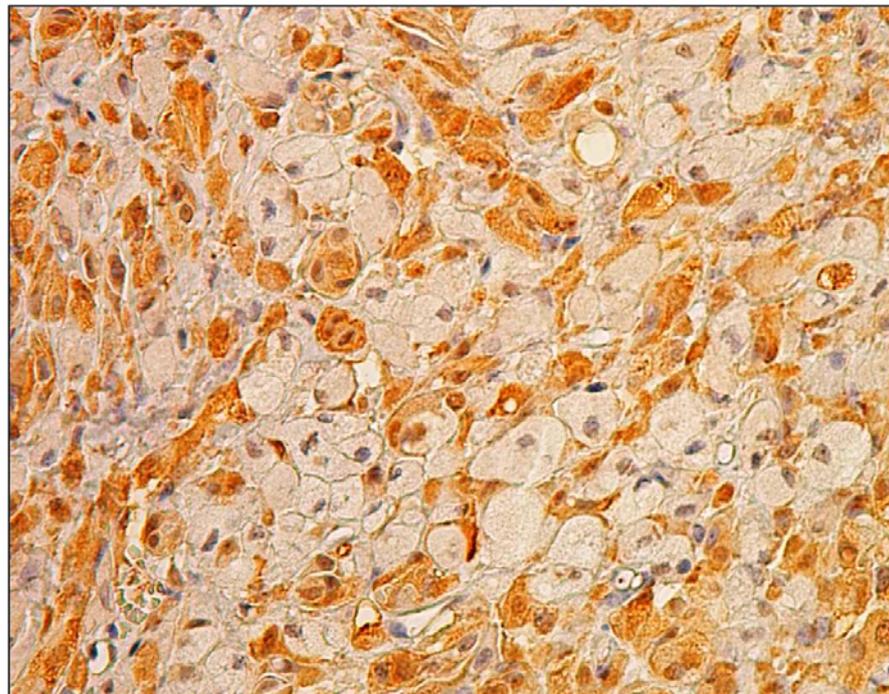


Figura 26. Inmunomarcación de proteína S100 en un melanocitoma, con posterior decoloración de la melanina. La IM es citoplasmática y nuclear y de intensidad fuerte (obj. 40x).

La relación entre la intensidad de marcación de proteína S100 y su distribución en las NM cutáneas y orales se muestra en las figuras 27 y 28. Estas características fueron similares en melanocitomas y melanomas cutáneos, por lo que se analizaron en conjunto.

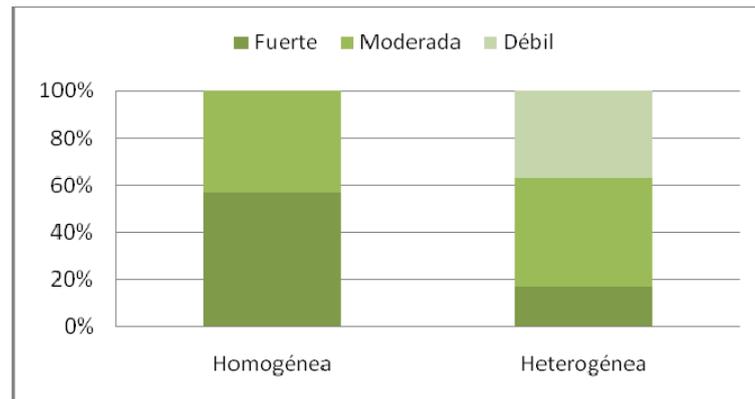


Figura 27. Intensidad según distribución de la IM de proteína S100 en las NM cutáneas.

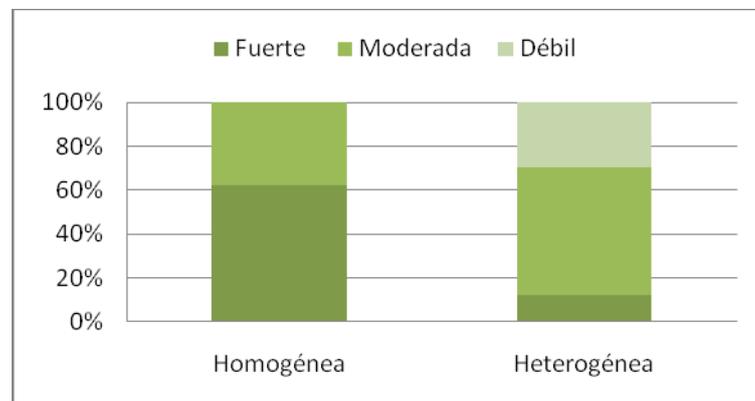


Figura 28. Intensidad según distribución de la IM de proteína 100 en las NM orales.

Tanto en las NM cutáneas como en las orales, la intensidad de marcación de proteína S100 difirió significativamente entre los dos tipos de distribución ($p < 0,001$). En los casos de marcación homogénea, la intensidad predominante fue de fuerte a

moderada, mientras que en la mayoría de los casos de marcación heterogénea, la intensidad fue de moderada a débil.

Los casos negativos a proteína S100 se distribuyeron en proporciones similares entre los tipos celulares mayoritarios, así como entre los distintos grados de melanización.

La relación entre la distribución de la IM de proteína S100 y las características histopatológicas en las NM cutáneas y orales se muestran en las tablas 12 y 13.

Tabla 12. Distribución de la IM de proteína S100 según el tipo celular, el grado de melanización y el índice mitótico en las NM cutáneas.

	IM de proteína S100				p
	Homogénea (n=42)		Heterogénea (n=30)		
	n	%	n	%	
Tipo celular					
Epitelioide	11	52	10	48	0,394
Fusifforme	9	56	7	44	
Mixto	21	63	12	37	
Globoso	1	50	1	50	
Melanización					
Grado 1	3	50	3	50	0,135
Grado 2	4	36	7	64	
Grado 3	13	52	12	48	
Grado 4	22	73	8	27	
Índice mitótico (mitosis/10CMA)					
<3	29	58	21	42	0,931
≥3	13	59	9	41	

IM: inmunomarcación. CMA: campos de mayor aumento.

Tabla 13. Distribución de la IM de proteína S100 según el tipo celular, el grado de melanización y el índice mitótico en las NM orales.

	IM de proteína S100				<i>p</i>
	Homogénea (n=19)		Heterogénea (n=19)		
	n	%	n	%	
Tipo celular					
Epitelioide	4	36	7	64	0,007
Fusiforme	2	20	8	80	
Mixto	12	80	3	20	
Redondo	1	50	1	50	
Melanización					
Grado 1	4	44	5	56	0,460
Grado 2	4	80	1	20	
Grado 3	8	58	11	42	
Grado 4	3	60	2	40	
Índice mitótico (mitosis /10 CMA)					
<3	4	33	8	67	0,162
≥3	15	58	11	42	

IM: inmunomarcación. CMA: campos de mayor aumento.

A diferencia de lo ocurrido en las NM cutáneas, en las que la distribución de la IM de proteína S100 fue muy similar entre los distintos tipos celulares, las NM orales mostraron un predominio significativo de una distribución homogénea o heterogénea de la IM de proteína S100 de acuerdo con el tipo celular.

La relación entre la intensidad de la IM de proteína S100 y las características histopatológicas en las NM cutáneas y orales se muestra en las figuras 29 a 34.

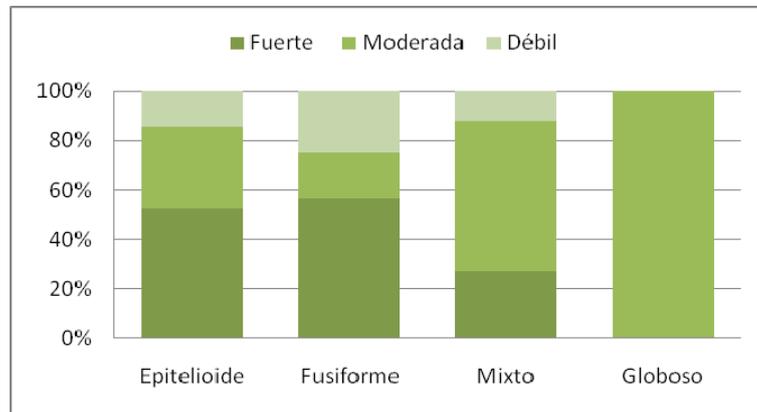


Figura 29. Intensidad de la IM de proteína S100 según el tipo celular en las NM cutáneas.

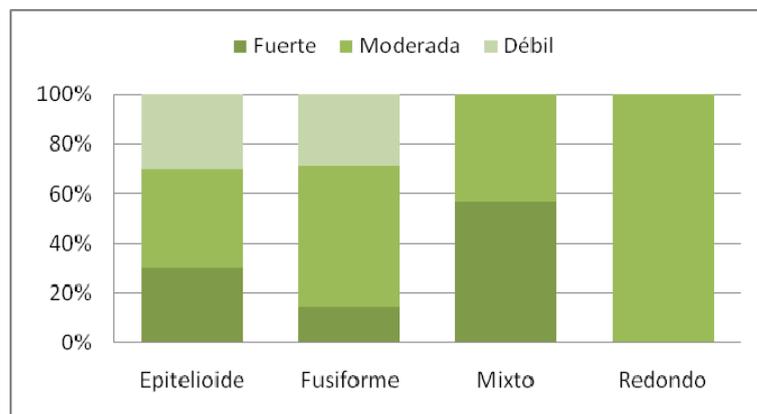


Figura 30. Intensidad de la IM de proteína S100 según el tipo celular en las NM orales.

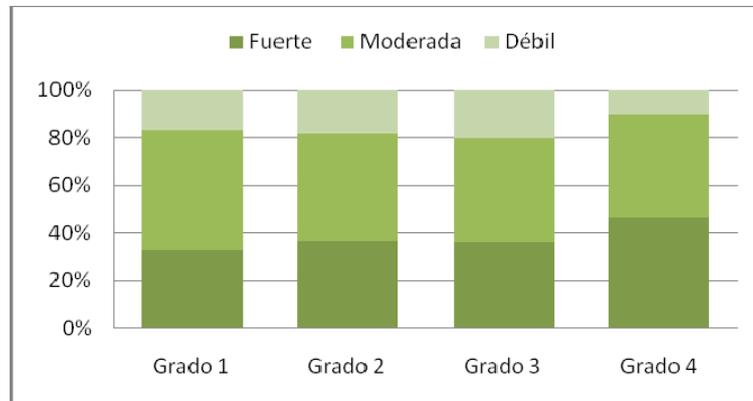


Figura 31. Intensidad de la IM de proteína S100 según el grado de melanización en las NM cutáneas.

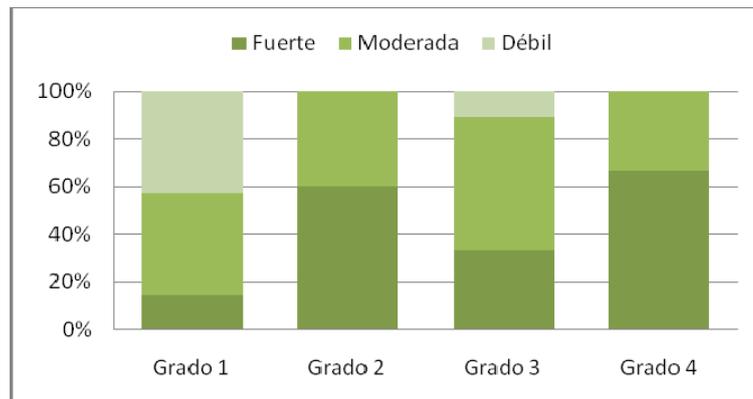


Figura 32. Intensidad de la IM de proteína S100 según el grado de melanización en las NM orales.

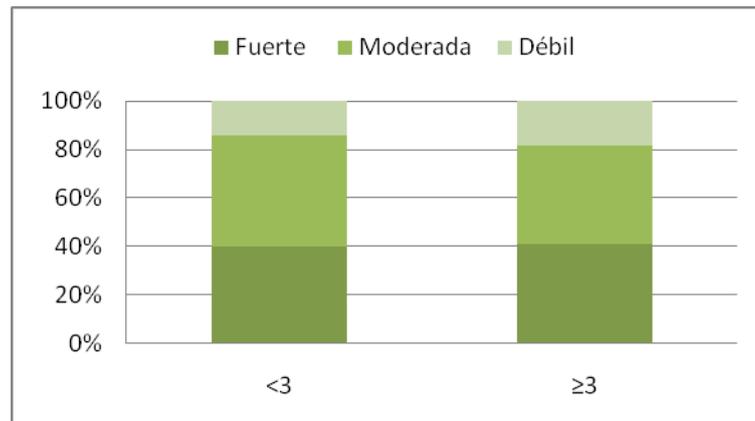


Figura 33. Intensidad de la IM de proteína S100 según el índice mitótico en las NM cutáneas.

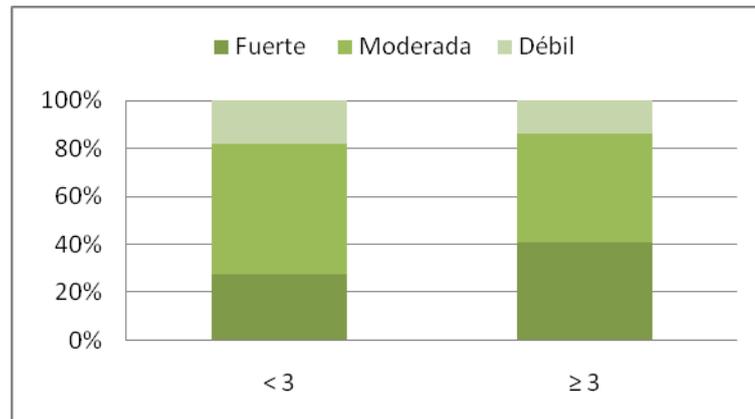


Figura 34. Intensidad de la IM de proteína S100 según el índice mitótico en las NM orales.

Si bien se observaron algunas diferencias en cuanto al predominio de las distintas intensidades de marcación de proteína S100 según el tipo celular, el grado de melanización y la cantidad de mitosis, las mismas no alcanzaron significación estadística en ningún caso. La intensidad de la IM de proteína S100 y las características histopatológicas resultaron independientes, tanto en las NM cutáneas como en las NM orales ($p > 0,05$).

Melan A

Del total de NM cutáneas analizadas, el 92% de los melanocitomas (33/36) y el 79% de los melanomas (33/42) fue positivo a melan A. Melanocitomas y melanomas exhibieron diferencias en las características de la IM de melan A. Dichas características se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Características de la IM de melan A en las NM cutáneas

Melan A	NM cutáneas				p
	Melanocitomas (n=33)		Melanomas (n=33)		
	n	%	n	%	
Distribución					
Homogénea	20	61	17	52	0,457
Heterogénea	13	39	16	48	
Intensidad					
Fuerte	24	73	13	39	0,006
Moderada	7	21	18	55	
Débil	2	6	2	6	
Patrón citoplasmático					
Difuso	31	94	25	76	0,039
Polar	2	6	8	24	

Como puede verse en la tabla 14, la intensidad de marcación de melan A, así como el patrón citoplasmático de la misma, dependen del diagnóstico histopatológico. Se detectó un claro predominio de marcación fuerte en melanocitomas. En lo que respecta al patrón citoplasmático de la reacción, la frecuencia de la marcación polar fue llamativamente más alta en melanomas.

En lo que respecta a las NM orales, el 72% de las mismas (31/43 melanomas) fue positivo a melan A, proporción inferior a la observada en melanomas cutáneos. Las características de la IM de melan A en las NM orales se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Características de la IM de melan A en las NM orales

Melan A	NM orales (n=31)	
	n	%
Distribución		
Homogénea	20	64%
Heterogénea	11	36%
Intensidad		
Fuerte	24	78%
Moderada	6	19%
Débil	1	3%
Patrón citoplasmático		
Difuso	22	71%
Polar	9	29%

Como puede verse en la tabla 15, la distribución y la intensidad de la IM de melan A fueron similares a las observadas en melanocitomas cutáneos, mientras que el patrón citoplasmático de la misma fue similar al observado en melanomas cutáneos.

En la figura 35 (A-B) se ilustran algunas de las características de la IM de melan A.

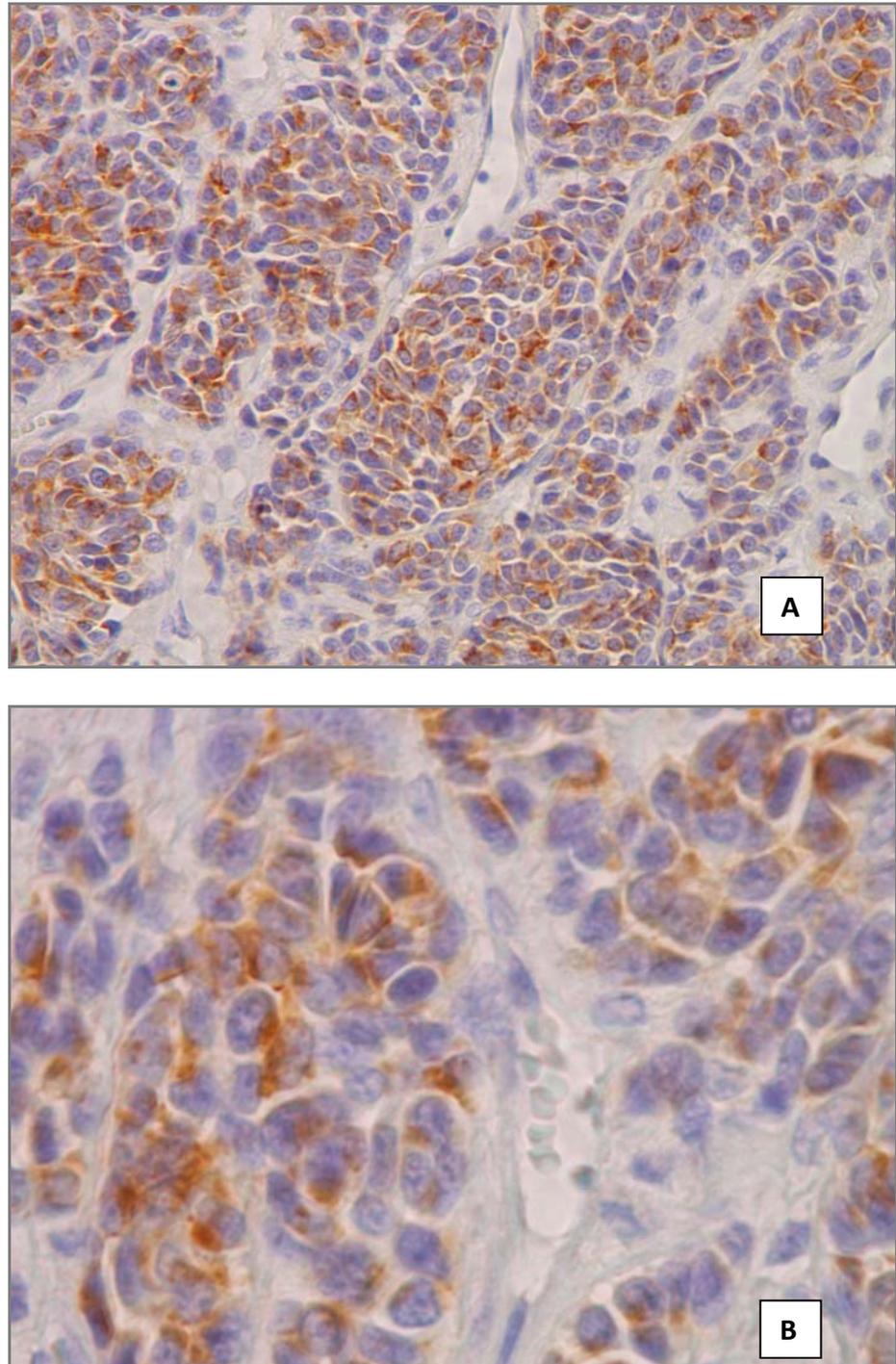


Figura 35. A: Inmunomarcación de melan A en un melanoma, con posterior decoloración de la melanina. La IM es homogénea, fuerte, citoplasmática difusa en algunas células y polar en otras (obj. 40x). **B:** detalle de A en un sector de marcación predominantemente polar (obj. 100x).

La relación de la intensidad de marcación de melan A y su distribución en las NM cutáneas y en las NM orales se muestra en las figuras 36 y 37. Estas características fueron similares en melanocitomas y melanomas cutáneos, por lo que se analizaron en conjunto.

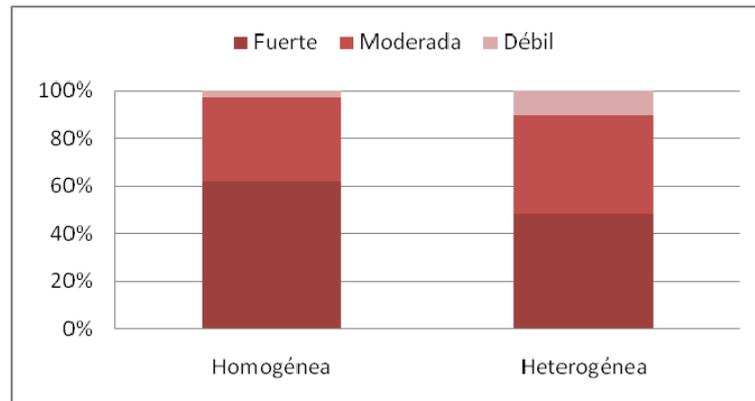


Figura 36. Intensidad según distribución de la IM de melan A en las NM cutáneas.

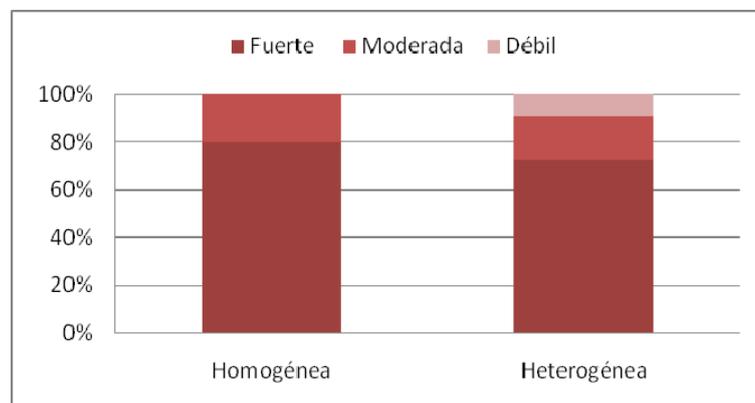


Figura 37. Intensidad según distribución de la IM de melan A en las NM orales.

A pesar de observarse que la marcación débil se relacionó con mayor frecuencia con la distribución heterogénea en las NM en general, la intensidad de marcación de melan A y su distribución fueron independientes ($p > 0,05$).

La frecuencia de la IM positiva y negativa de melan A de acuerdo con las características histopatológicas en las NM cutáneas y en las NM orales, se muestra en las tablas 16 y 17.

Tabla 16. IM positiva y negativa de melan A según las características histopatológicas en las NM cutáneas

	Melan A + (n=66)		Melan A - (n=12)		<i>p</i>
	n	%	n	%	
Tipo celular					
Epitelioide	17	74	6	26	-
Fusiforme	17	94	1	6	
Mixto	31	89	4	11	
Globoso	1	50	1	50	
Melanización					
Grado 1	2	33	4	67	<0,001
Grado 2	9	69	4	31	
Grado 3	25	86	4	14	
Grado 4	30	100	0	0	
Índice mitótico					
(mitosis/10CMA)					
<3	47	85	8	15	0,751
≥3	19	83	4	17	

+: positiva. -: negativa. CMA: campos de mayor aumento.

Tabla 17. IM positiva y negativa de melan A según las características histopatológicas en las NM orales

	NM orales				p
	Melan A + (n=31)		Melan A - (n=12)		
	n	%	n	%	
Tipo celular					
Epitelioide	9	64	5	36	-
Fusiforme	6	55	5	45	
Mixto	14	88	2	12	
Redondo	2	0	0	100	
Melanización					
Grado 1	3	25	9	75	<0,001
Grado 2	5	83	1	17	
Grado 3	18	90	2	10	
Grado 4	5	100	0	0	
Índice mitótico					
(mitosis/10CMA)					
<3	10	63	6	37	0,280
≥3	21	78	6	22	

+: positiva. -: negativa. CMA: campos de mayor aumento.

Tanto en las NM cutáneas como en las NM orales, la frecuencia de casos positivos y negativos a melan A parecería ser independiente del tipo celular y del índice mitótico. Contrariamente, la positividad a melan A se mostró significativamente asociada al grado de melanización; la frecuencia de casos positivos fue más alta entre las NM con los mayores grados de melanización y viceversa.

La relación entre la intensidad de la IM de melan A y las características histopatológicas en las NM cutáneas y en las NM orales se muestran en las figuras 38 a 43. Los melanocitomas y los melanomas cutáneos se analizan en conjunto, dado que no mostraron diferencias al respecto.

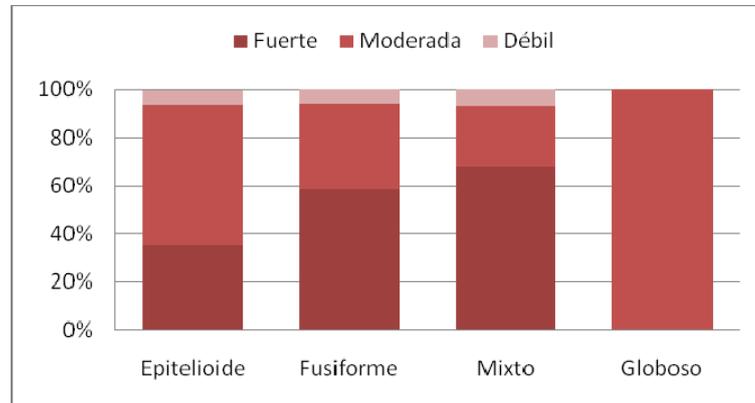


Figura 38. Intensidad de la IM de melan A según el tipo celular en las NM cutáneas.

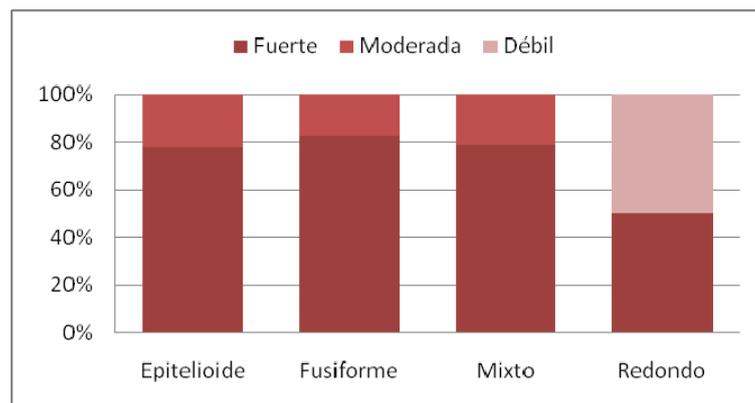


Figura 39. Intensidad de la IM de melan A según el tipo celular en las NM orales.

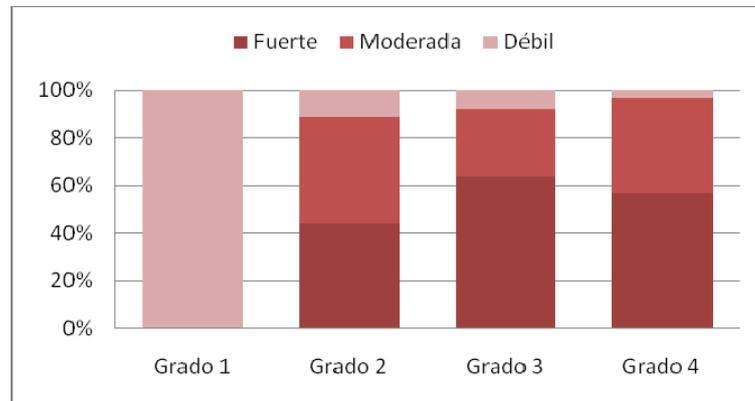


Figura 40. Intensidad de la IM de melan A según el grado de melanización en las NM cutáneas.

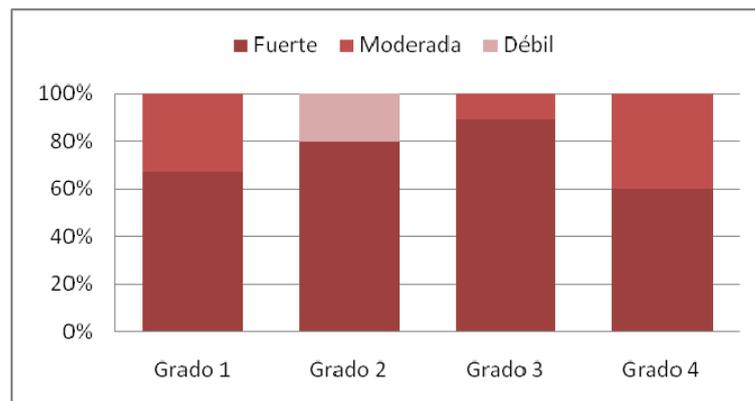


Figura 41. Intensidad de la IM de melan A según el grado de melanización en las NM orales.

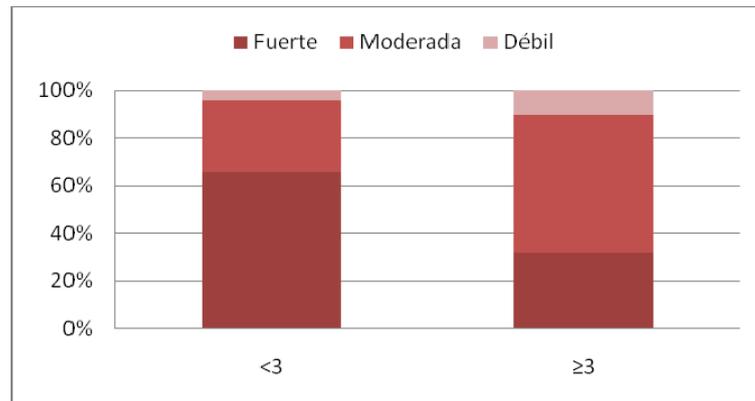


Figura 42. Intensidad de la IM de melan A según el índice mitótico en las NM cutáneas.

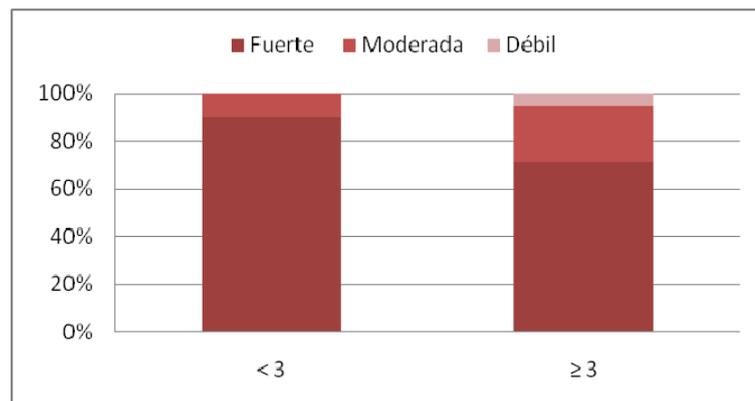


Figura 43. Intensidad de la IM de melan A según el índice mitótico en las NM orales.

Si bien se observaron algunas variaciones con respecto al predominio de las distintas intensidades de marcación de melan A según el tipo celular o el grado de melanización, no se hallaron diferencias significativas al respecto en las NM en general ($p>0,05$). Contrariamente, la intensidad de marcación se mostró asociada al índice mitótico, tanto en las NM cutáneas como en las NM orales, aunque sólo alcanzó significación estadística en las primeras ($p=0,020$). La marcación de intensidad fuerte resultó notoriamente más frecuente en las NM con índice mitótico bajo. Las neoplasias

con 3 o más mitosis cada 10 CMA se vieron más frecuentemente asociadas a marcaciones moderadas y débiles.

La relación entre la distribución de la IM de melan A y las características histopatológicas en las NM cutáneas, así como en las NM orales, se muestra en las tablas 18 y 19.

Tabla 18. Distribución de la IM de melan A según el tipo celular, el grado de melanización y el índice mitótico en las NM cutáneas

	IM de melan A				p
	Homogénea (n=37)		Heterogénea (n=29)		
	n	%	n	%	
Tipo celular					
Epitelioide	9	53	8	47	0,694
Fusiforme	10	59	7	41	
Mixto	18	58	13	42	
Globoso*	0	0	1	100	
Melanización					
Grado 1	1	50	1	50	0,048
Grado 2	2	22	7	78	
Grado 3	16	64	9	36	
Grado 4	18	60	12	40	
Índice mitótico					
(mitosis/10CMA)					
<3	25	53	22	47	0,460
≥3	12	63	7	37	

IM: inmunomarcación. CMA: campos de mayor aumento.

*No incluido en la prueba estadística.

Tabla 19. Distribución de la IM de melan A según el tipo celular, el grado de melanización y el índice mitótico en las NM orales

	IM de melan A				<i>p</i>
	Homogénea (n=20)		Heterogénea (n=11)		
	n	%	n	%	
Tipo celular					
Epitelioide	7	78	2	22	-
Fusiforme	5	83	1	17	
Mixto	8	57	6	43	
Redondo	0	0	2	100	
Melanización					
Grado 1	2	67	1	33	0,405
Grado 2	2	40	3	60	
Grado 3	13	72	5	28	
Grado 4	3	60	2	40	
Índice mitótico					
(mitosis/10CMA)					
<3	8	80	2	20	0,260
≥3	12	57	9	43	

IM: inmunomarcación. CMA: campos de mayor aumento.

Como puede verse en ambas tablas, la distribución de la IM de melan A resultó independiente de la mayoría de las características histopatológicas estudiadas, a excepción del grado de melanización en las NM cutáneas. En estas últimas, la marcación homogénea estuvo asociada con los grados de melanización más altos y viceversa.

Tirosinasa

De las 20 NM analizadas, sólo 1/9 NM cutáneas (11%) y 1/11 NM orales (9%) mostraron positividad citoplasmática. La IM fue de intensidad moderada y de distribución

heterogénea en la masa tumoral (figura 44 A). En tres de las NM cutáneas se apreció, además, una marcación débil en los melanocitos de la epidermis (figura 44 B).

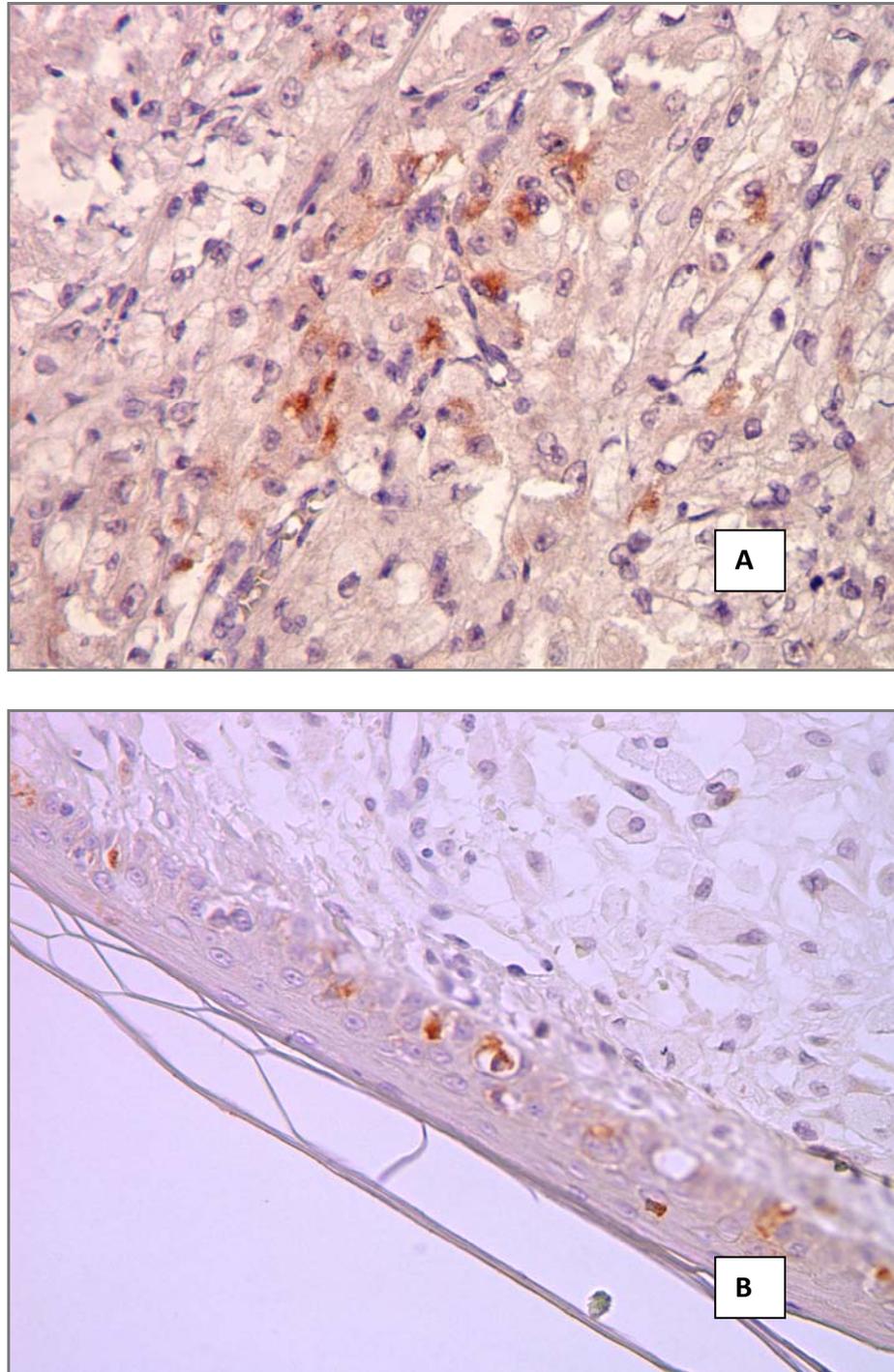


Figura 44. A: Inmunomarcación de tirosinasa en un melanoma, con posterior decoloración de la melanina. La IM es heterogénea y de intensidad moderada en el citoplasma de las células tumorales (obj. 40x). **B:** Melanocitos de la epidermis positivos a tirosinasa (obj. de 40x).

Debido al hallazgo de tan escasa proporción de NM positivas, se decidió no aumentar la cantidad de casos a estudiar más allá de los utilizados para los estudios preliminares.

La técnica utilizada para la detección de tirosinasa se presenta en materiales y métodos y en el anexo II.

ESTUDIOS INMUNOCITOQUÍMICOS

Vimentina, proteína S100 y melan A

La frecuencia con que se dispuso de extendidos resultó insuficiente para la estandarización de la técnica, dado que se encontraron dificultades en la etapa de fijación.

La cantidad de células, así como la morfología celular post fijación, resultaron adecuadas. Mediante la fijación se logró, además, remover fluidos proteínicos y eritrocitos que pudieran generar coloración de fondo. Sin embargo, sólo en contados casos se obtuvo una adhesión suficiente de las células al portaobjetos que asegurara su permanencia en cantidad y calidad hasta finalizar el proceso de inmunomarcación.

Tampoco se logró una adecuada conservación de la antigenicidad ya que, en los casos en que las células permanecieron adheridas al portaobjetos hasta finalizar la inmunomarcación, la misma resultó negativa para los tres anticuerpos evaluados.

Los detalles de las pruebas realizadas se presentan en materiales y métodos y anexo IV.

ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS CUANTITATIVOS

Proliferación: IP-PCNA e IP-Ki67

De total de las NM cutáneas analizadas, 71/71 (33 melanocitomas y 38 melanomas) fueron positivas a PCNA y 54/71 (25 melanocitomas y 29 melanomas) fueron positivas a Ki67. En las NM orales, 43/43 fueron positivas a PCNA y 32/43 fueron positivas a Ki67.

Se observó marcación nuclear de intensidad variable en las células neoplásicas. Las células en mitosis mostraron positividad citoplasmática a PCNA y cromosómica a Ki67 (figuras 45 y 46).

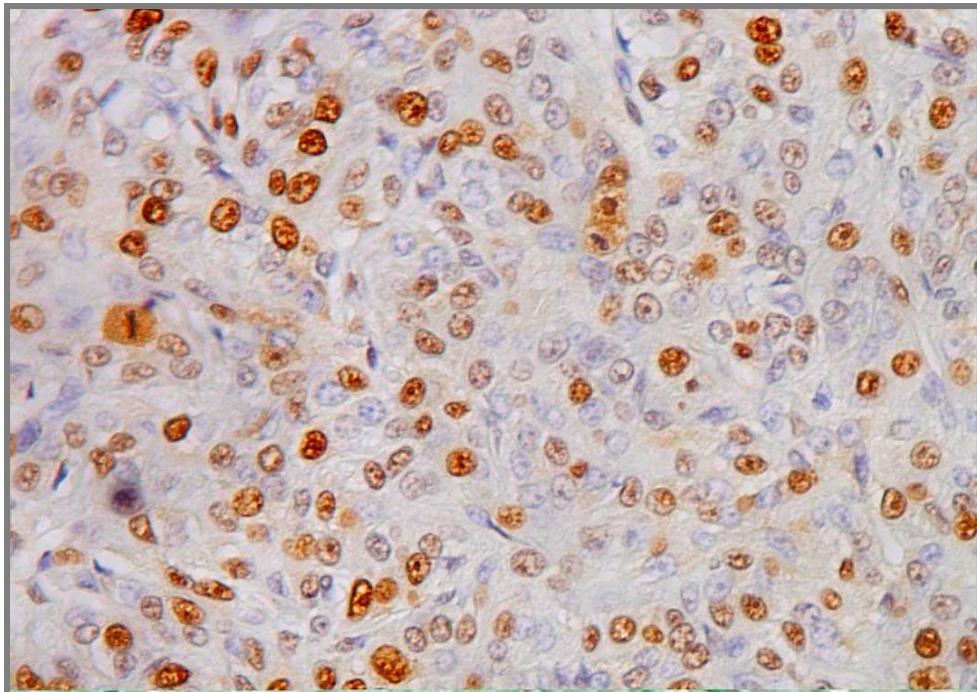


Figura 45. Inmunomarcación de PCNA en un melanoma, con posterior decoloración de la melanina (obj. 40x).

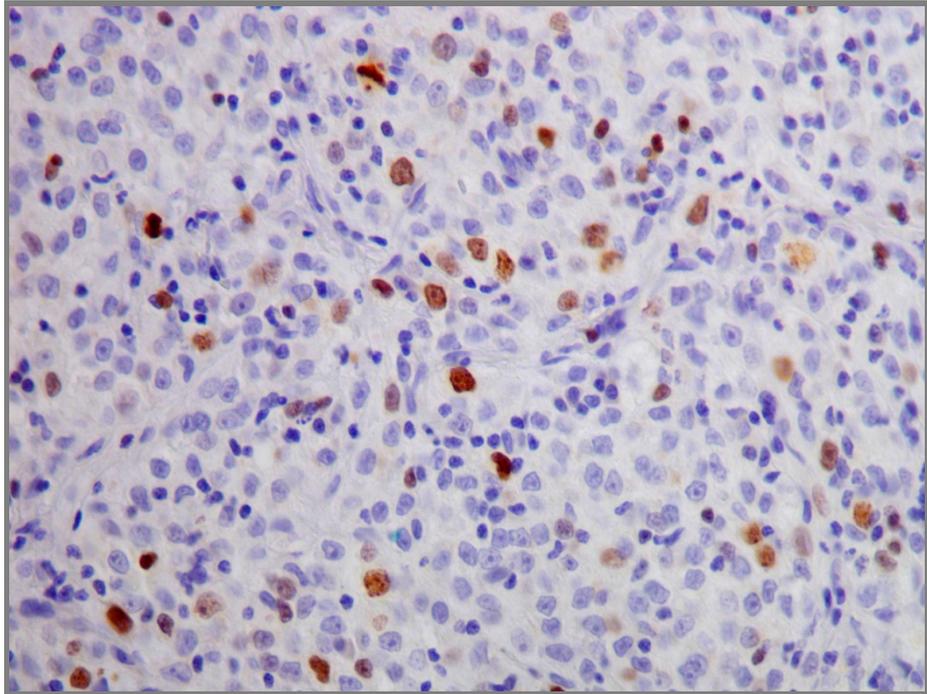


Figura 46. Inmunomarcación de Ki67 en un melanoma, con posterior decoloración de la melanina (obj. 40x).

La distribución de la IM de PCNA fue siempre homogénea, mientras que la de Ki67 fue homogénea en algunas neoplasias y heterogénea en otras. Ocasionalmente, se detectó positividad nuclear a PCNA en células endoteliales, células inflamatorias y células del tejido conjuntivo. En la mayor parte de los casos, el IP-PCNA resultó más alto que el IP-Ki67 en una misma neoplasia.

Los índices de proliferación para ambos marcadores en las NM cutáneas y orales se muestran en las figuras 47 y 48.

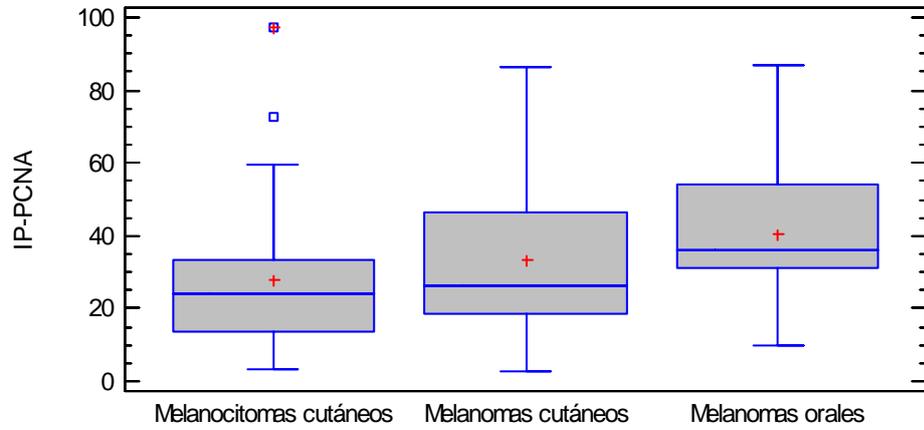


Figura 47. Índices de proliferación (IP) para PCNA en las NM cutáneas y orales.

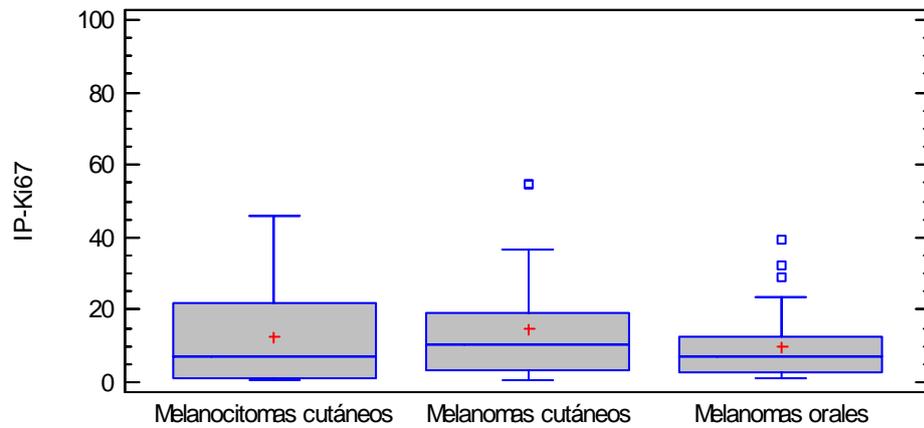


Figura 48. Índices de proliferación (IP) para Ki67 en las NM cutáneas y orales.

El IP-PCNA promedio fue de $28,1 \pm 3,5$ (ESM) en melanocitomas, de $33,2 \pm 3,4$ (ESM) en melanomas cutáneos y de $40,2 \pm 2,9$ (ESM) en melanomas orales. El IP-Ki67 promedio fue de $12,4 \pm 2,6$ (ESM) en melanocitomas, de $14,6 \pm 2,7$ (ESM) en melanomas cutáneos y de $9,8 \pm 1,7$ en melanomas orales. Dado que los IP para ambos marcadores

fueron prácticamente similares en melanocitomas y melanomas cutáneos, no se observaron diferencias significativas entre los mismos (tabla 20). El IP-PCNA en las NM orales fue significativamente superior al correspondiente tanto a melanocitomas como a melanomas cutáneos ($p < 0,001$), no así el IP-Ki67 que, al contrario de lo esperado, fue menor al observado en las neoplasias cutáneas. Sin embargo, ambos índices, IP-PCNA e IP-Ki67, mostraron una correlación moderada y significativa, tanto en las NM cutáneas ($r = 0,41$; $p = 0,001$) como en melanomas orales ($r = 0,65$; $p < 0,001$) (figura 49).

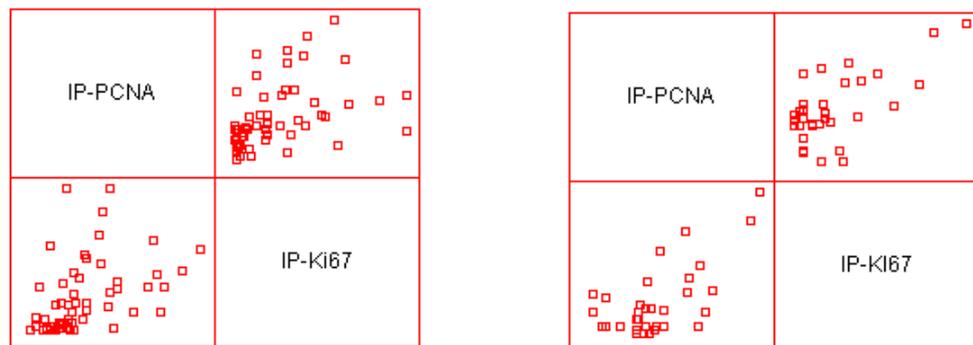


Figura 49. Correlación de los IP en las NM cutáneas (izquierda) y en las NM orales (derecha).

La relación de los IP en las NM con las características clinicopatológicas se muestra en las tablas 20 y 21.

Tabla 20. Índices de proliferación (IP) para PCNA y Ki67 en las NM cutáneas según las características clinicopatológicas

	IP-PCNA			IP-Ki67		
	n	Media ± ESM	p	n	Media ± ESM	p
Diagnóstico HP						
Melanocitoma	33	28,1 ± 3,5	0,294	25	11,8 ± 3,1	0,497
Melanoma	38	33,2 ± 3,4		29	13,2 ± 3,6	
Localización						
Digital	49	32,6 ± 4,9	0,622	17	12,6 ± 3,5	0,681
Otra	22	29,9 ± 2,8		37	14,0 ± 2,3	
Diámetro mayor						
≤ 2	30	34,8 ± 2,9	0,407	22	12,1 ± 2,6	0,197
> 2	21	30,3 ± 4,8		17	17,8 ± 4,1	
NC (20)						
Ulceración						
Presencia	20	38,7 ± 5,0	0,041	18	17,8 ± 3,9	0,142
Ausencia	51	27,7 ± 2,7		36	11,4 ± 2,0	
Actividad en la UDE						
Presencia	28	25,7 ± 2,9	0,091	19	6,35 ± 1,8	0,001
Ausencia	33	34,8 ± 24,2		27	18,0 ± 2,8	
NE (10)						
Tipo celular						
Epitelioide	20	33,4 ± 5,1	0,293	15	13,8 ± 3,2	0,366
Fusifforme	18	24,2 ± 4,3		14	9,9 ± 3,1	
Mixto	32	33,1 ± 3,7		24	15,8 ± 3,3	
Globoso	1	26,1*		1	7,1*	
Melanización						
Grado 1	6	39,9 ± 11,5	0,181	5	25,4 ± 8,5	0,185
Grado 2	13	34,5 ± 4,7		9	16,9 ± 5,6	
Grado 3	25	23,8 ± 3,5		16	9,8 ± 2,9	
Grado 4	27	33,4 ± 4,3		24	12,3 ± 2,5	
Índice mitótico (mitosis/10 CMA)						
< 3	50	28,0 ± 2,8	0,080	38	11,2 ± 2,2	0,010
≥ 3	21	37,4 ± 4,5		16	18,8 ± 3,4	

ESM: error estándar de la media. HP: histopatológico. NC: no consignado. UDE: unión dermoepidérmica. NE: no evaluable. CMA: campos de mayor aumento.

*No incluido en la prueba estadística.

Tabla 21. Índices de proliferación (IP) para PCNA y Ki67 en las NM orales según las características clinicopatológicas

	IP-PCNA			IP-Ki67		
	n	Media ± ESM	p	n	Media ± ESM	p
Localización						
Encía/paladar	32	38,7 ± 3,3	0,505	25	9,6 ± 1,8	0,215
Carrillo	5	47,6 ± 10,3		3	17,5 ± 9,1	
Labio	5	46,4 ± 8,7		3	3,5 ± 2,0	
NC (1)						
Diámetro mayor						
≤ 3	14	38,5 ± 3,5	0,980	13	7,7 ± 2,0	0,430
> 3	14	38,6 ± 6,3		11	13,2 ± 3,9	
NC (15)						
Ulceración						
Presencia	10	46,9 ± 8,2	0,205	7	15,4 ± 4,3	0,051
Ausencia	33	38,1 ± 29		25	8,2 ± 1,7	
Tipo celular						
Epitelioide	14	37,7 ± 5,9	0,807	9	10,3 ± 3,9	0,655
Fusiforme	11	42,3 ± 6,7		9	11,9 ± 3,4	
Mixto	16	41,9 ± 4,1		13	8,4 ± 2,3	
Redondo *	2	31,0 ± 1,0		1	1,0	
Melanización						
Grado 1	12	35,1 ± 4,2	0,187	7	9,1 ± 2,5	0,813
Grado 2	6	29,6 ± 6,1		5	5,7 ± 1,9	
Grado 3	20	43,6 ± 4,58		15	10,6 ± 2,7	
Grado 4	5	50,9 ± 8,7		5	12,5 ± 6,3	
Índice mitótico (mitosis/10 CMA)						
< 3	16	37,7 ± 5,4	0,525	11	9,9 ± 2,5	0,982
≥ 3	27	41,6 ± 3,45		21	9,8 ± 2,3	

ESM: error estándar de la media. NC: no consignado. CMA: campos de mayor aumento.

*No incluido en la prueba estadística.

Como puede verse en ambas tablas, los índices de proliferación para PCNA y Ki67 resultaron independientes de la mayor parte de las variables clinicopatológicas estudiadas. No obstante, en las NM que presentaron ulceración, el IP-PCNA fue significativamente más alto que en aquellas que no la presentaron. Si bien ambos índices resultaron llamativamente bajos en las NM con actividad en la unión dermoepidérmica y

en aquellas con menor índice mitótico, sólo el IP-Ki67 mostró asociación significativa con dichas variables.

Vascularización: AE y DMV

Se observó positividad citoplasmática en las células endoteliales inmunorreactivas. Dicha positividad, además de detectarse en vasos bien definidos, se observó en células endoteliales aisladas o agrupadas, formando nidos o en cordones (figura 50). En algunos casos se detectó una coloración inespecífica de fondo, de intensidad leve. Ocasionalmente, se apreciaron vasos negativos.

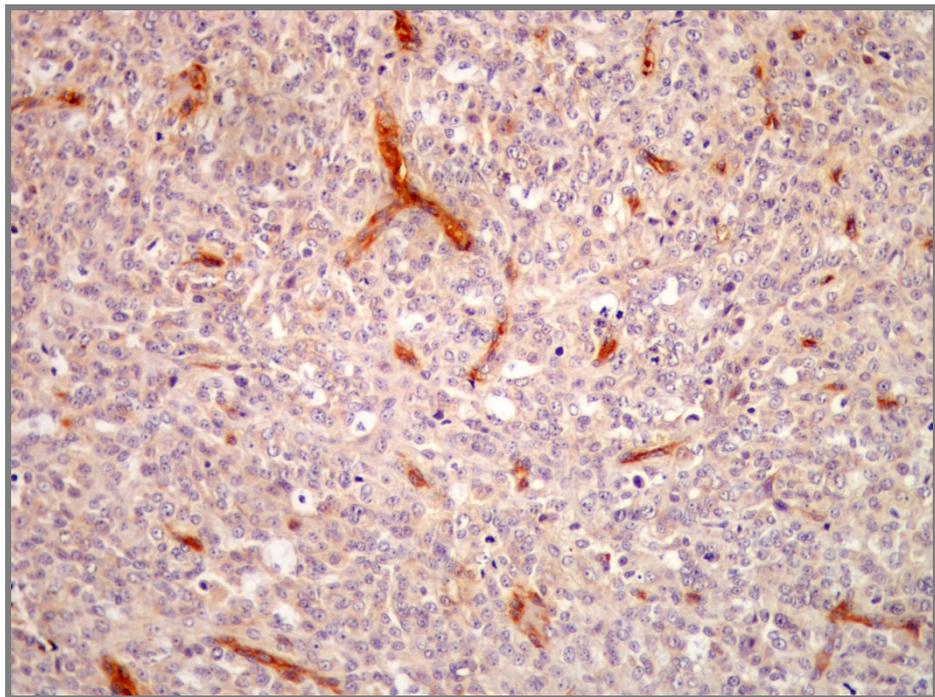


Figura 50. Inmunomarcación de factor de von Willebrand en un melanoma, con posterior decoloración de la melanina (obj. 20x).

Los resultados de la estimación del AE y de la DMV en las NM cutáneas y orales se muestran en las figuras 51 y 52.

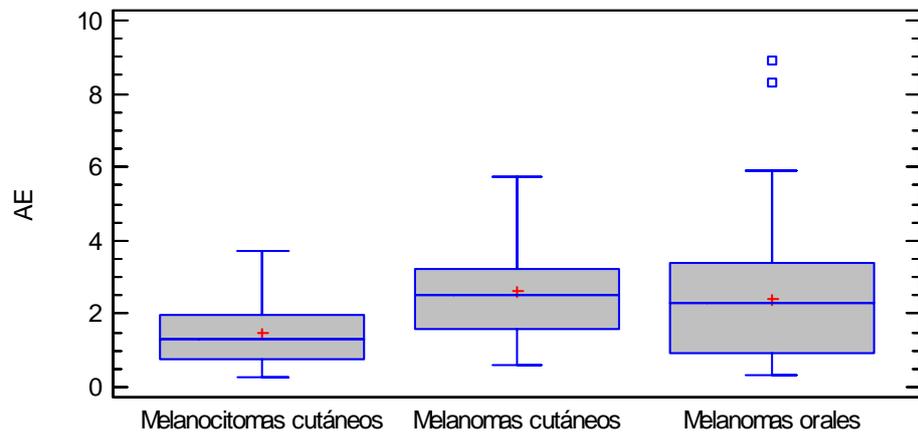


Figura 51. Área endotelial (AE) en las NM cutáneas y orales.

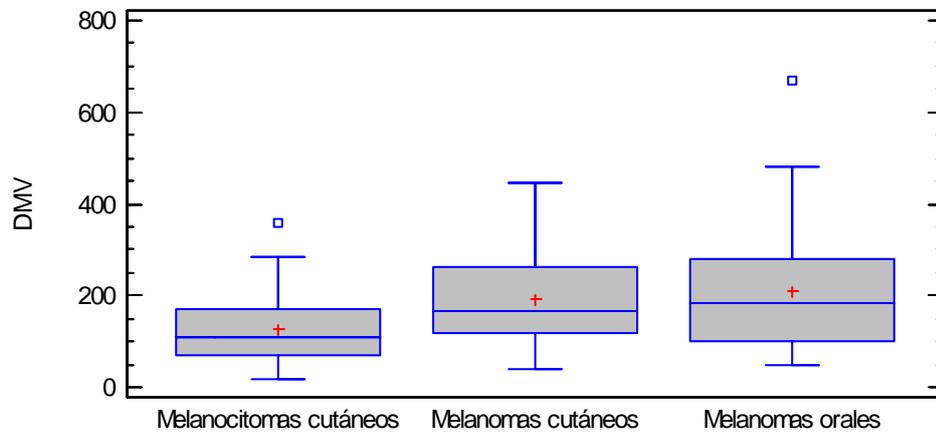


Figura 52. Densidad de microvasos (DMV) en las NM cutáneas y orales.

El AE promedio observada en melanocitomas ($1,5 \pm 0,14$) fue significativamente más baja que la correspondiente a melanomas cutáneos ($2,6 \pm 0,2$) y a melanomas orales ($2,4 \pm 0,3$) ($p = 0,001$). Lo mismo sucedió con la DMV, la cual fue 129 ± 14 en

melanocitomas, de 191 ± 16 en melanomas cutáneos y de 208 ± 16 en melanomas orales ($p = 0,003$). Ambos parámetros mostraron una correlación moderada y altamente significativa, tanto en las NM cutáneas ($r = 0,54$ $p < 0,001$) como en las NM orales ($r = 0,63$; $p < 0,001$) (figura 53).

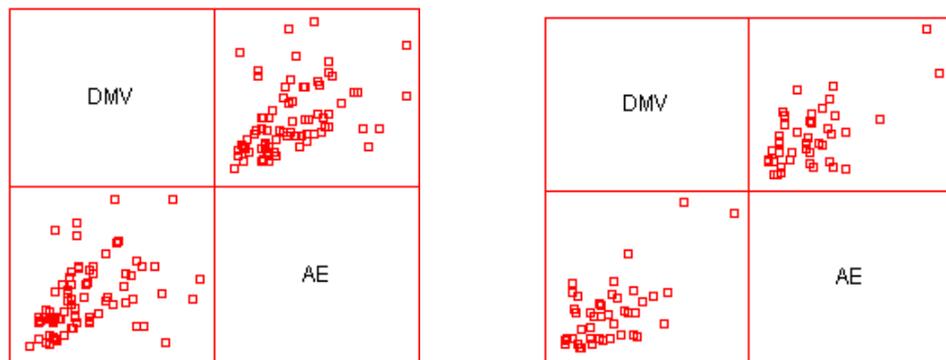


Figura 53. Correlación del AE y la DMV en las NM cutáneas (izquierda) y orales (derecha).

La relación del AE y de la DMV con las características clinicopatológicas en las NM cutáneas y orales se muestra en las tablas 22 y 23.

Tabla 22. Área endotelial (AE) y densidad de microvasos (DMV) en las NM cutáneas según las características clinicopatológicas

	AE			DMV		
	n	Media ± ESM	p	n	Media ± ESM	p
Diagnóstico HP						
Melanocitoma	36	1,5 ± 0,1	<0,001	36	129 ± 14	0,002
Melanoma	40	2,6 ± 0,2		40	191 ± 16	
Localización						
Digital	22	2,5 ± 0,3	0,045	22	213 ± 23	0,004
Otra	54	1,9 ± 0,2		54	141 ± 12	
Diámetro mayor						
≤ 2	31	1,7 ± 0,2	0,054	31	147 ± 17	0,303
> 2	22	2,4 ± 0,3		22	168 ± 21	
NC (23)						
Ulceración						
Presencia	21	2,2 ± 0,3	0,796	21	165 ± 18	-
Ausencia	55	2,0 ± 0,2		55	160 ± 14	
Actividad en la UDE						
Presencia	30	1,6 ± 0,2	0,031	30	133 ± 15	0,046
Ausencia	35	2,3 ± 0,2		35	179 ± 17	
NE (11)						
Tipo celular						
Epitelioide	23	1,9 ± 0,2	0,061	23	162 ± 19	0,738
Fusiforame	19	1,7 ± 0,3		19	157 ± 25	
Mixto	33	2,4 ± 0,2		33	169 ± 17	
Globoso*	1	1,3		1	38	
Melanización						
Grado 1	6	2,5 ± 0,8	0,682	6	152 ± 38	0,203
Grado 2	13	1,9 ± 0,4		13	112 ± 65	
Grado 3	29	2,0 ± 0,2		29	168 ± 17	
Grado 4	28	2,1 ± 0,2		28	180 ± 41	
Índice mitótico (mitosis/10 CMA)						
< 3	55	2,0 ± 0,2	0,193	55	161 ± 14	-
≥ 3	21	2,3 ± 0,2		21	163 ± 17	

ESM: error estándar de la media. HP: histopatológico. NC: no consignado. UDE: unión dermoepidérmica. NE: no evaluable. CMA: campos de mayor aumento.

*No incluido en la prueba estadística.

Tabla 23. Área endotelial (AE) y densidad de microvasos (DMV) en las NM orales según las características clinicopatológicas

	AE			DMV		
	n	Media ± ESM	p	n	Media ± ESM	p
Localización						
Encía/paladar	32	2,3 ± 0,4	0,334	32	202 ± 24	0,123
Carrillo	5	2,3 ± 0,6		5	155 ± 30	
Labio	5	2,7 ± 0,2		5	294 ± 46	
NC (1)						
Diámetro mayor						
≤ 3	14	2,1 ± 0,3	0,662	14	213 ± 29	0,945
> 3	14	3,1 ± 0,7		14	241 ± 42	
NC (15)						
Ulceración						
Presencia	10	3,2 ± 0,7	0,082	10	247 ± 50	0,472
Ausencia	33	2,2 ± 0,3		33	197 ± 21	
Tipo celular						
Epitelioide	14	2,2 ± 0,6	0,379	14	230 ± 47	0,528
Fusiforme	11	2,6 ± 0,4		11	178 ± 29	
Mixto	16	2,5 ± 0,5		16	221 ± 37	
Redondo *	2	2,5 ± 0,9		2	117 ± 21	
Melanización						
Grado 1	12	2,0 ± 0,3	0,097	12	159 ± 24	0,149
Grado 2	6	2,6 ± 1,5		6	229 ± 41	
Grado 3	20	2,1 ± 0,5		20	200 ± 29	
Grado 4	5	4,4 ± 1,1		5	335 ± 86	
Índice mitótico (mitosis/10 CMA)						
< 3	16	2,0 ± 0,3	0,489	16	199 ± 27	0,959
≥ 3	27	2,7 ± 0,4		27	214 ± 27	

ESM: error estándar de la media. NC: no consignado. CMA: campos de mayor aumento.

*No incluido en la prueba estadística.

Relación del AE y la DMV con los marcadores de proliferación celular

Se observó una correlación baja y no significativa del AE y de la DMV con los índices de proliferación para PCNA y Ki67, tanto en las NM cutáneas como en las NM orales.

Invasión: MMP-2

No se observó inmunorreactividad a metaloproteinasa 2 de la matriz en las 11 NM primarias y secundarias evaluadas. La técnica utilizada para su detección se presenta en materiales y métodos y en el anexo II.

ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA

Contando con la colaboración de los médicos veterinarios clínicos que mantienen contacto con el Servicio de Anatomía Patológica de la Cátedra de Patología Especial, fue posible obtener información sobre el tiempo de supervivencia en el 48% (61/127) de los casos estudiados (39 NM cutáneas y 22 NM orales).

Aspectos clinicopatológicos

Los datos de supervivencia de los pacientes con NM cutáneas y orales se resumen en la tabla 24.

Tabla 24. Supervivencia de los pacientes con NM cutáneas y orales

	Supervivencia					
	Larga (> 8 m)		Intermedia (4 a 8 m)		Corta (<4 m)	
	n	%	n	%	n	%
Diagnóstico HP						
Melanocitomas c.	18	100	0	0	0	0
Melanomas c.	14	67	2	10	5	24
Melanomas o.	8	36	6	27	8	36
Total	40	66	8	13	13	21

HP: histopatológico. m: meses. c: cutáneos. o: orales.

En lo que respecta a las NM cutáneas, el 95% (17/18) de los pacientes con melanocitoma se encontró libre de la enfermedad al finalizar el período de seguimiento, mientras que un animal murió a los 9 meses de realizado el diagnóstico por causas no relacionadas con la neoplasia.

El 62% (13/21) de los pacientes con melanoma permaneció vivo hasta la finalización del período de seguimiento. De ellos, el 85% (11/13) se mantuvo, además,

libre de la enfermedad. El 38% (8/21) restante murió por causas relacionadas con la enfermedad antes de los 12 meses.

En las NM orales, sólo el 32% (7/22) de los pacientes permaneció vivo al finalizar el período de seguimiento. El 68 % restante (15/22) murió por causas relacionadas con la enfermedad en un lapso que no superó los 6 meses en la mayor parte de los casos. De los pacientes que permanecieron vivos hasta finalizar el seguimiento, el 57% (4/7) experimentó recidivas en el período, mientras que 43% (3/7) restante permaneció libre de la enfermedad durante al menos los dos años posteriores al diagnóstico.

En la mayor parte de los pacientes con melanomas cutáneos u orales se practicó la eutanasia debido a la comprobación de metástasis y al deterioro evidente de la calidad de vida.

En la figura 54 se aprecian claramente las diferencias en la probabilidad de supervivencia en melanocitomas cutáneos, melanomas cutáneos y melanomas orales.

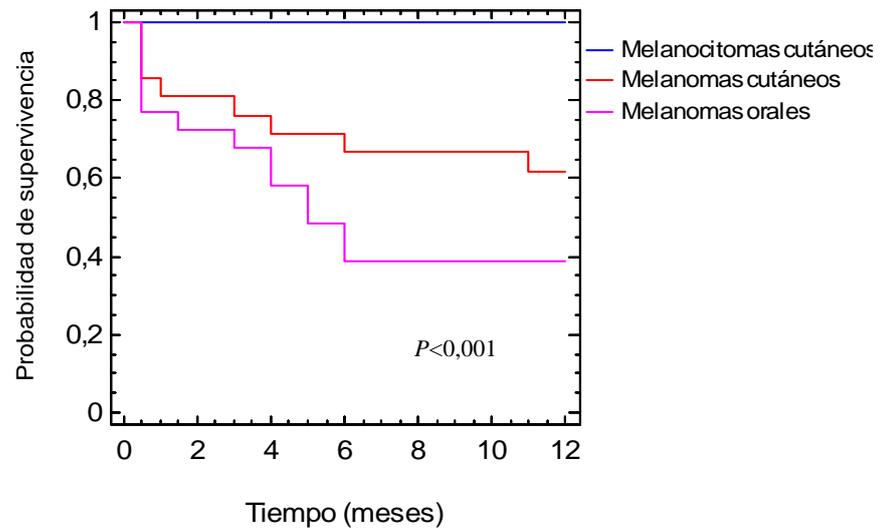


Figura 54. Función estimada de supervivencia para las NM cutáneas y orales.

En lo que respecta a las características clinicopatológicas, la supervivencia en las NM cutáneas se asoció con la localización, la ulceración, el diagnóstico histopatológico, la actividad en la unión dermoepidérmica y el índice mitótico (tabla 25).

Tabla 25. Relación de la supervivencia con las características clinicopatológicas en las NM cutáneas

	Supervivencia				p
	Larga		Intermedia-corta		
	n	%	n	%	
Sexo					
Macho	13	87	2	13	0,685
Hembra	19	79	5	21	
Edad					
≤ 8	16	84	3	16	-
≥ 9	15	79	4	21	
NC (1)					
Localización					
Digital	5	50	5	50	0,009
Otra	27	93	2	7	
Diámetro mayor					
≤ 2	19	95	1	5	0,076
> 2	6	67	3	33	
NC (10)					
Ulceración					
Presencia	5	56	4	44	0,008
Ausencia	27	93	1	3	
NC (2)					
Diagnóstico HP					
Melanocitoma	18	100	0	0	0,007
Melanoma	14	67	7	33	
Actividad en la UDE					
Presencia	19	100	0	0	0,003
Ausencia	8	57	6	43	
NE (6)					
Tipo celular					
Epitelioide	8	73	3	27	-
Fusiforme	8	100	0	0	
Mixto	16	80	4	20	
Melanización					
Grado 1	2	67	1	33	0,626
Grado 2	6	75	2	25	
Grado 3	9	75	3	25	
Grado 4	15	94	1	6	
Índice mitótico (mitosis/10 CMA)					
< 3	27	100	0	0	<0,001
≥ 3	5	42	7	58	

NC: no consignado. HP: histopatológico. UDE: unión dermoepidérmica. NE: no evaluable. CMA: campos de mayor aumento.

En las neoplasias localizadas en los dedos, la probabilidad de supervivencia resultó menor. Lo mismo sucedió con aquellas que presentaron ulceración, ausencia de actividad en la unión dermoepidérmica y 3 o más mitosis cada diez campos de mayor aumento (figuras 55 a 58).

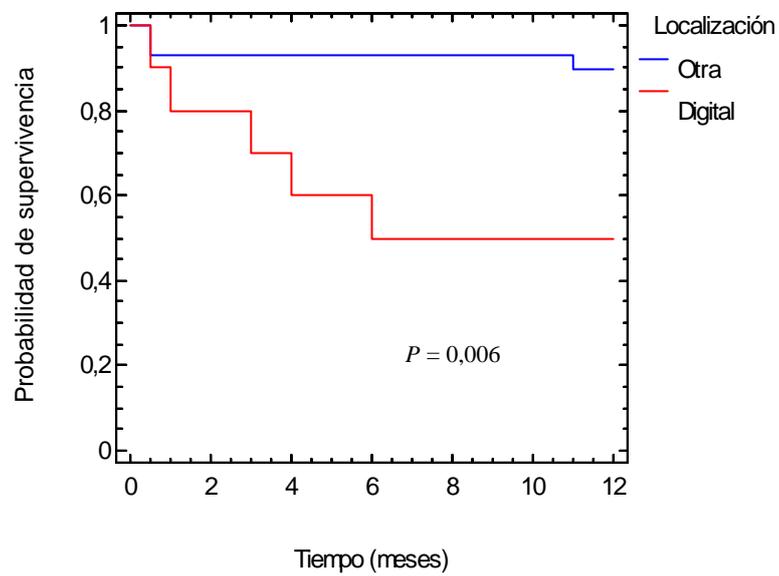


Figura 55. Función estimada de supervivencia para las NM cutáneas según su localización.

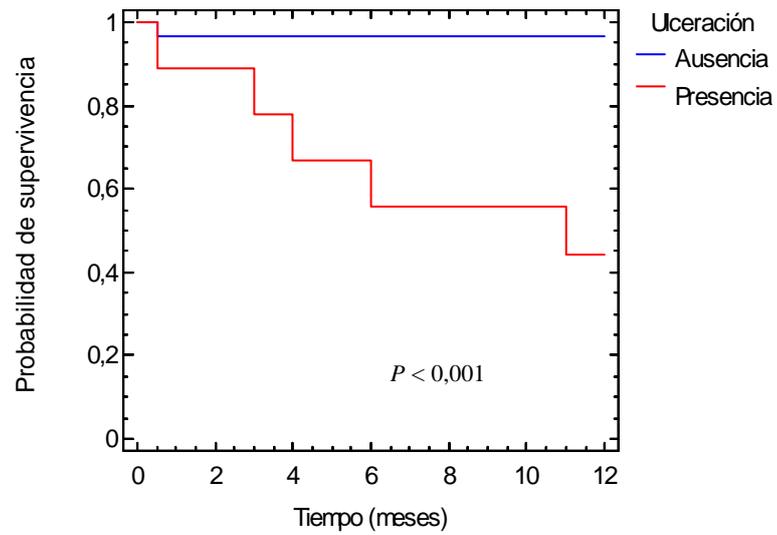


Figura 56. Función estimada de supervivencia para las NM cutáneas según la presencia o ausencia de ulceración.

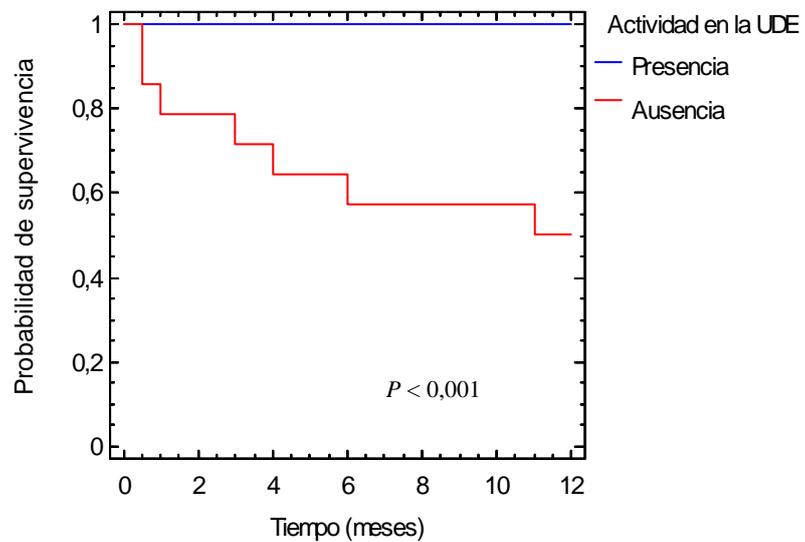


Figura 57. Función estimada de supervivencia para las NM cutáneas según la presencia o ausencia de actividad en la UDE (unión dermoepidérmica).

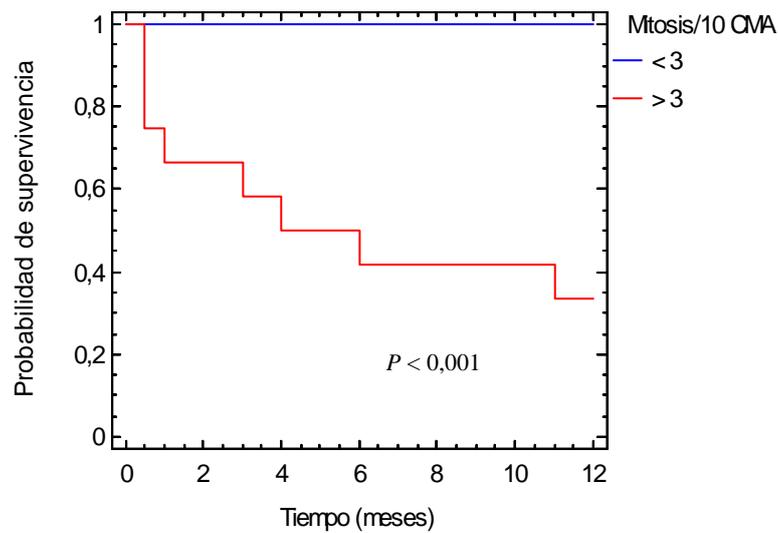


Figura 58. Función estimada de supervivencia para las NM cutáneas según el índice mitótico.

Cabe resaltar que, a pesar de la ausencia de significación estadística entre la supervivencia y el tipo celular, todos los pacientes con NM cutáneas de células fusiformes permanecieron libres de la enfermedad al finalizar el período de seguimiento.

En las NM orales, la supervivencia resultó independiente de la mayor parte de las características clinicopatológicas analizadas, a excepción del tamaño de la neoplasia (tabla 26).

Tabla 26. Relación de la supervivencia con las características clinicopatológicas en las NM orales

	Supervivencia				p
	Larga		Intermedia-corta		
	n	%	n	%	
Sexo					
Macho	7	50	7	50	0,149
Hembra	1	13	7	87	
Edad					
≤ 10	5	42	7	58	0,674
≥ 10	3	30	7	70	
Localización					
Encía/paladar	5	33	11	73	-
Carrillo	2	67	1	33	
Labio	1	50	1	50	
NC (1)					
Diámetro mayor					
≤ 3	5	56	4	44	0,033
> 3	0	0	7	100	
NC (6)					
Ulceración					
Presencia	1	14	6	86	0,193
Ausencia	7	47	8	53	
Tipo celular					
Epitelioide	4	50	4	50	-
Fusiforme	0	0	6	100	
Mixto	4	50	4	50	
Melanización					
Grado 1	5	63	3	37	0,074
Grado 2	1	50	1	50	
Grado 3	2	22	7	78	
Grado 4	0	0	3	100	
Índice mitótico (mitosis/10 CMA)					
< 3	2	22	7	78	0,380
≥ 3	6	46	7	54	

NC: no consignado. CMA: campos de mayor aumento.

Como puede verse en la figura 59, las NM orales cuyo diámetro mayor superó los 3 cm, se asociaron con una supervivencia menor.

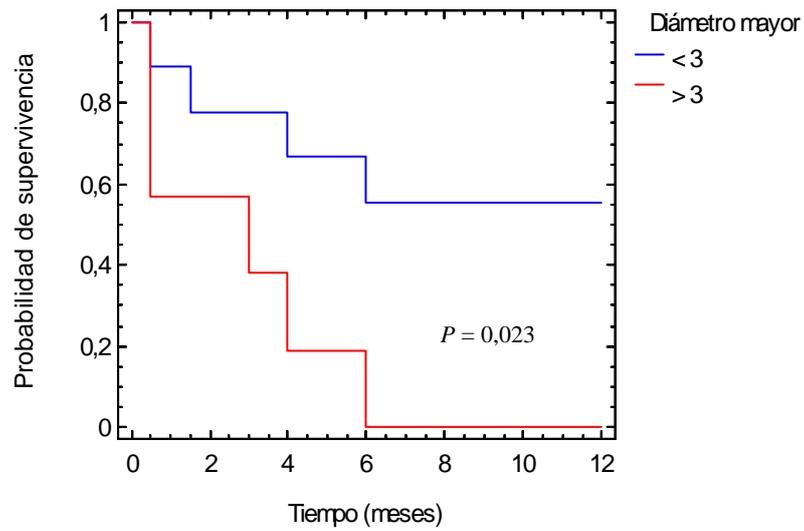


Figura 59. Función estimada de supervivencia para las NM orales en relación a su tamaño.

Vimentina, proteína S100, melan A

El tiempo de supervivencia de los pacientes con NM cutáneas y orales resultó independiente de las características de la IM de vimentina y proteína S100, así como de la mayor parte de las características de la IM de melan A. Sólo se detectaron diferencias significativas en la supervivencia de los pacientes con NM cutáneas en función del patrón citoplasmático de marcación de melan A (tabla 27).

Tabla 27. Relación de la supervivencia con las características de la IM de melan A en las NM cutáneas

Melan A	Supervivencia				<i>p</i>
	Larga		Intermedia-corta		
	n	%	n	%	
Inmunomarcación					
Positiva	27	82	6	18	-
Negativa	4	80	1	20	
Distribución					
Homogénea	14	74	5	26	0,208
Heterogénea	13	93	1	7	
Intensidad					
Fuerte	14	93	1	7	0,186
Moderada-débil	13	72	5	28	
Patrón citoplasmático					
Difuso	26	90	3	10	0,013
Polar	1	25	3	75	

En la figura 60 se aprecia claramente que las NM con IM polar de melan A se asociaron a una supervivencia menor respecto de aquellas con IM difusa.

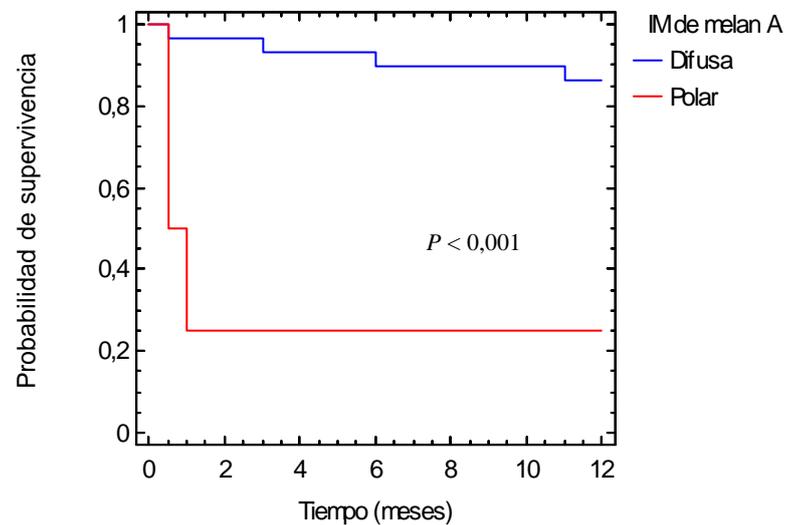


Figura 60. Función estimada de supervivencia para las NM cutáneas según el patrón citoplasmático de IM de melan A.

Contrariamente a lo observado en las NM cutáneas, las NM orales no mostraron variaciones en el tiempo de supervivencia de acuerdo con las características de la IM de melan A (tabla 28).

Tabla 28. Relación de la supervivencia con las características de la IM de melan A en las NM orales

Melan A	Supervivencia				p
	Larga		Intermedia-corta		
	n	%	n	%	
Inmunomarcación					-
Positiva	5	36	9	64	
Negativa	3	37	5	63	
Distribución					-
Homogénea	4	36	7	64	
Heterogénea	1	33	2	67	
Intensidad					
Fuerte	4	36	7	64	-
Moderada-débil	1	33	2	67	
Patrón citoplasmático					
Difuso	4	36	7	64	-
Polar	1	33	2	67	

IP-PCNA e IP-Ki67

El IP-PCNA promedio, así como el IP-Ki67 promedio, fueron más altos en las NM cutáneas y orales de los pacientes con supervivencia intermedia-corta, aunque éstas diferencias alcanzaron significación estadística únicamente en el caso del IP-PCNA en las NM cutáneas (tablas 29 y 30).

Tabla 29. Índices de proliferación (IP) para PCNA y Ki67 según el tiempo de supervivencia en las NM cutáneas

Supervivencia	IP-PCNA			IP-Ki67		
	n	Media ± ESM	p	n	Media ± ESM	p
Larga	26	33,1 ± 4,2	0,010	25	13,4 ± 3,3	0,313
Intermedia-corta	7	57,0 ± 6,5		7	17,9 ± 5,2	

ESM: error estándar de la media.

Tabla 30. Índices de proliferación (IP) para PCNA y Ki67 según el tiempo de supervivencia en las NM orales

	IP-PCNA			IP-Ki67		
	n	Media \pm ESM	<i>p</i>	n	Media \pm ESM	<i>p</i>
Supervivencia						
Larga	8	39,5 \pm 6,5	0,472	8	7,4 \pm 3,9	0,285
Intermedia-corta	14	46,7 \pm 6,1		14	12,7 \pm 3,2	

ESM: error estándar de la media.

Independientemente del grado de significación estadística, las diferencias más grandes entre los grupos de supervivencia se observaron en el IP-PCNA de las NM cutáneas y en el IP-Ki67 de las NM orales. En ellos, los casos con supervivencia intermedia-corta mostraron índices de proliferación de casi el doble del valor correspondiente a los casos con supervivencia larga. Estas diferencias resultaron aún más notables en el análisis de supervivencia cuando se utilizaron valores de corte para ambos marcadores. Los valores de corte que permitieron agrupar correctamente al mayor número de pacientes dentro de uno u otro grupo de supervivencia fueron 50 para PCNA (valor cercano a la media del grupo de pacientes con supervivencia larga), y 7 para Ki67 (valor correspondiente a la media del grupo de pacientes con supervivencia intermedia-corta). Los pacientes con NM cutáneas con IP-PCNA menores a 50 mostraron una supervivencia significativamente superior respecto de aquellos con IP-PCNA superiores a 50 (figura 61).

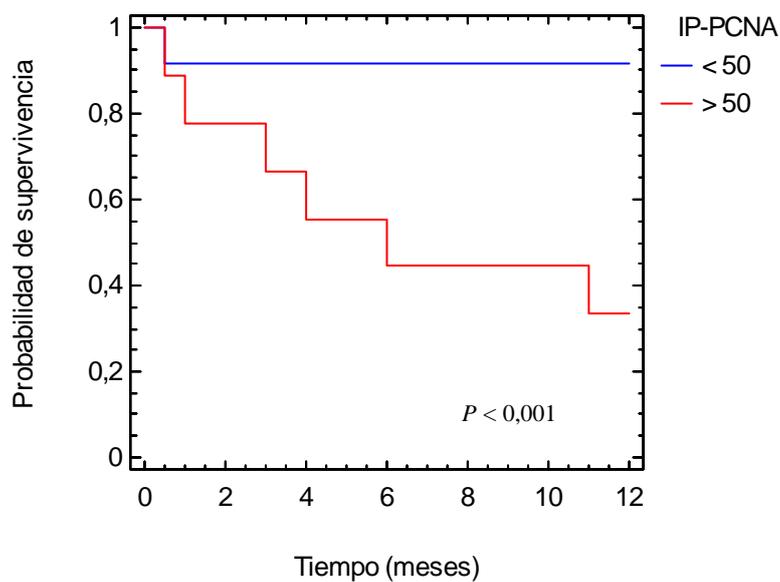


Figura 61. Función estimada de supervivencia para las NM cutáneas de acuerdo con el IP-PCNA.

Algo similar sucedió con las NM orales, en las que se halló una probabilidad de supervivencia claramente mayor en aquellos pacientes cuyas neoplasias mostraron un IP-Ki67 menor o igual a 7 (figura 62).

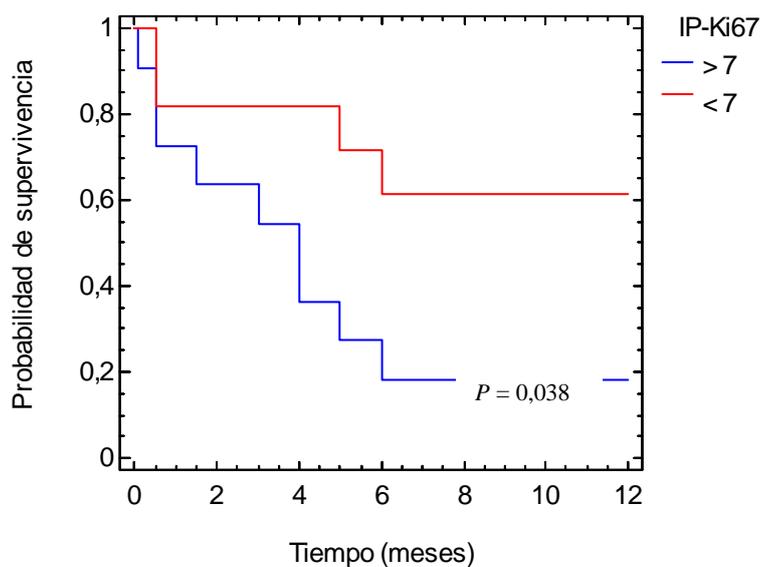


Figura 62. Función estimada de supervivencia para las NM orales de acuerdo con el IP-Ki67.

AE y DMV

En las NM cutáneas, no se halló relación entre el AE y la DMV ya que los valores promedio para ambos resultaron similares entre los dos grupos de supervivencia (tabla 31).

Tabla 31. Área endotelial (AE) y densidad de microvasos (DMV) según el tiempo de supervivencia en las NM cutáneas

	AE			<i>p</i>	DMV		
	n	Media ± ESM			n	Media ± ESM	<i>p</i>
Supervivencia							
Larga	30	2,1 ± 0,2		0,805	30	147 ± 16	0,815
Intermedia-corta	7	2,2 ± 0,2			7	139 ± 10	

ESM: error estándar de la media.

En las NM orales, los valores promedio del AE y de la DMV fueron ligeramente superiores en los casos con supervivencia intermedia-corta, pero sin alcanzar diferencias significativas respecto de los casos con supervivencia larga (tabla 32).

Tabla 32. Área endotelial (AE) y densidad de microvasos (DMV) según el tiempo de supervivencia en las NM orales

	AE			<i>p</i>	DMV		
	n	Media ± ESM			n	Media ± ESM	<i>p</i>
Supervivencia							
Larga	8	2,1 ± 0,3		0,608	8	194 ± 29	0,428
Intermedia-corta	14	2,9 ± 0,6			14	235 ± 34	

ESM: error estándar de la media.

Tampoco se encontraron valores de corte para el AE o la DMV que permitieran agrupar adecuadamente a las NM cutáneas y orales en función del tiempo de supervivencia de los pacientes.

DISCUSIÓN

ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO, ASPECTOS CLÍNICOS Y DE LA RESEÑA

Las NM cutáneas en este estudio fueron más frecuentes que las NM orales, lo que concuerda con lo comunicado por algunos autores, quienes afirman que el mayor porcentaje de estas neoplasias ocurre en la piel (2, 6, 17).

Existen discrepancias acerca de una posible predisposición racial. En relación a ello, es importante considerar que buena parte de los hallazgos en lo que respecta a la frecuencia de NM según la raza esté sujeta a las características de la población canina de cada región. Por ello parece razonable encontrar sólo coincidencias parciales entre los diferentes estudios. En los casos aquí estudiados, y en coincidencia con estudios previos, los animales mestizos estuvieron sobrerrepresentados, así como aquellos de las razas Ovejero Alemán y Rottweiler (15, 107). Resultó llamativa la frecuencia de NM cutáneas, predominantemente benignas, en animales de la raza Doberman, así como el alto porcentaje de NM malignas en caninos de la raza Rottweiler. Curiosamente, Bolon y col. encontraron en la primera un predominio de NM benignas (108). Asimismo, Ramos Vara y col. hallaron una frecuencia de NM orales menor de la esperada en la raza Doberman y, al igual que lo observado en nuestro estudio, encontraron a las razas Cocker Spaniel y Pequinés significativamente sobrerrepresentadas en el grupo de las NM orales (15). También se ha postulado que los animales de piel y mucosas intensamente pigmentadas presentan el mayor riesgo de padecer NM (2, 3, 15, 16). En coincidencia con ello, las razas mayoritariamente afectadas en nuestro estudio fueron aquellas de piel y/o mucosas pigmentadas.

La cantidad de hembras y machos en el estudio fue similar, aunque los machos mostraron una incidencia de melanomas ligeramente superior a la observada en las hembras. La proporción de machos y hembras afectados por éstos últimos fue de 1,2:1 en las NM cutáneas y 1,4:1 en las NM orales, pero sin encontrarse diferencias significativas al respecto. Varios estudios han detectado una mayor proporción de machos afectados por melanomas (3, 20, 21, 110, 111, 109), pero otros, en coincidencia con nuestros resultados, no hallaron predilección por sexo (2, 15, 107, 108).

La edad promedio de presentación de las NM melanocíticas cutáneas coincidió con la comunicada por otros autores (2, 76, 107). La frecuencia del diagnóstico de melanocitomas y melanomas cutáneos en animales mayores y menores de la edad promedio de presentación fue similar, no observándose diferencias significativas al respecto.

En las NM orales, la edad promedio de presentación hallada en este estudio, ligeramente superior a la observada en las NM cutáneas, también coincidió con los resultados de estudios precedentes (15, 20, 21, 107).

La mayor parte de los autores coincide en afirmar que los sitios más frecuentemente afectados por las NM cutáneas son, con ligeras variaciones en el orden de frecuencia, la cabeza (especialmente los párpados), el tronco y las extremidades (incluyendo a los dedos) (6, 14, 16), tal como ha sido observado en nuestro estudio. En las NM orales, la encía y la mucosa labial se citan como los sitios de localización más frecuentes (3, 15, 17, 20, 21). En nuestro caso, la encía fue seguida en orden de frecuencia por el paladar y por la mucosa labial en tercer lugar.

Existe evidencia de que las NM caninas se encuentran entre las pocas neoplasias animales en las que la localización anatómica es un indicador pronóstico. Así como la mucosa oral es asiento frecuente de NM malignas, el lecho ungular también lo es (16, 23, 76, 107, 112, 113, 114). Si bien en este estudio no se dispuso de datos acerca de la localización precisa de las NM digitales, se contrastaron las características del conjunto de las NM digitales con aquellas de las NM cutáneas de otras localizaciones. Al igual que lo observado por otros autores, más del 80% de las neoplasias digitales correspondió a melanomas, proporción significativamente mayor a la observada para las NM cutáneas de otras localizaciones (17, 76, 107, 112, 113). Asimismo, en estas últimas, los melanocitomas resultaron claramente más frecuentes, tal como ha sido descrito (16, 23, 77).

El diámetro mayor promedio para las NM cutáneas y orales (2,7 y 4,3, respectivamente) concuerda con los descripciones de la bibliografía (15, 16, 18). Se halló una asociación significativa entre el tamaño de las NM cutáneas y el diagnóstico histopatológico; la mayor parte de los melanocitomas no superó los 2 cm de diámetro, mientras que sí lo hizo la mayoría de los melanomas.

A pesar de que la ulceración fue un hallazgo más común en melanomas que en melanocitomas, esta última resultó independiente del diagnóstico histopatológico en las NM cutáneas. La influencia de este criterio, así como del tamaño de las NM cutáneas y orales en el pronóstico sigue siendo controvertida (3, 6, 17, 77, 107).

Entre las NM cutáneas, se diagnosticó la misma proporción de melanocitomas y melanomas. En contraste con ello, algunos autores han comunicado una frecuencia de melanocitomas de dos a cuatro veces superior a la de melanomas (16, 23, 112)

En lo que respecta a las NM orales, prácticamente todas fueron clasificadas como melanomas. Estos hallazgos coinciden con los de la bibliografía ya que, como se mencionaba anteriormente, la localización oral en las NM ha sido asociada con un comportamiento maligno (3, 15, 17, 18, 76, 114, 115). Sin embargo, se han descrito melanocitomas o “NM bien diferenciadas” en la mucosa oral (21, 76, 78), las que exhibieron un comportamiento acorde con su aspecto histológico benigno.

Tanto en medicina veterinaria como en medicina humana, la diferenciación entre NM benignas y malignas mediante el estudio histopatológico convencional puede resultar compleja en algunos casos (16,23, 26, 28, 116, 117). Este fue el caso del 3% de las NM cutáneas y del 2% de las NM orales en nuestro estudio. Tres NM cutáneas y 1 NM oral no pudieron ser clasificadas como melanocitomas o melanomas ya que presentaban características histológicas “intermedias” entre ambos, no orientativas hacia uno u otro tipo de neoplasia. Como es bien conocido, el diagnóstico asertivo de la neoplasia reviste fundamental importancia al momento de elegir un tratamiento adecuado así como para la formulación del pronóstico. Para el caso particular de la diferenciación de NM benignas y malignas se ha descrito la utilidad diagnóstica de técnicas complementarias, especialmente de la inmunohistoquímica (27, 35, 73, 81, 118, 119, 120).

La presencia de actividad en la unión dermoepidérmica se evaluó en las NM cutáneas. La mayor parte de los melanocitomas en este estudio presentó actividad en la

unión dermoepidérmica, tal como ha sido descrito (14, 16, 83). Más aún, ambas variables se hallaron significativamente asociadas. Esta característica resultó menos frecuente en melanomas.

La distribución de los tipos celulares en las NM varía entre los diferentes trabajos, aunque todos coinciden en que los tipos mixto, epitelioides y fusiformes son los más comunes. En las NM cutáneas, las neoplasias de tipo celular mixto se han citado como las más frecuentes, tal como se observó en nuestro trabajo (16). En las NM orales, en coincidencia con lo hallado por Ramos Vara y col., también predominaron las NM de tipo celular mixto (15). En melanomas cutáneos y orales, el tipo epitelioides se registró con mayor frecuencia que el fusiforme, mientras que en melanocitomas, éstos se presentaron en proporciones similares. A pesar de ello, el tipo celular y el diagnóstico de melanocitomas y melanomas cutáneos resultaron independientes en nuestro estudio. Las NM de células globosas representaron una mínima proporción, tanto en las NM cutáneas como en las orales, tal como ha sido descrito (3, 18,23), al igual que los melanomas de células redondas, registrados, en nuestro estudio, en la mucosa oral.

Se apreciaron los cuatro grados de melanización, tanto en las NM cutáneas como en las orales. La melanización de grado 4 fue la más común en melanocitomas, mientras que la de grado 3 lo fue en melanomas cutáneos y orales. Estos hallazgos son similares a los comunicados por otros autores en NM cutáneas (83). La mayor proporción de neoplasias amelánicas se observó en melanomas orales, seguidos por los melanomas cutáneos. En coincidencia con ello, en un estudio previo, aproximadamente la mitad de las NM orales mostró melanización escasa o ausente (15). Si bien algunos autores han

relacionado la melanización intensa en las NM con un pronóstico más favorable (76, 78), este criterio sigue siendo discutido. Recientemente, se ha relacionado al hallazgo de grados altos de melanización con un pronóstico desfavorable en el caso particular de melanomas orales (84). Dado que la distribución de la melanina suele ser irregular en la masa tumoral, encontrándose áreas completamente amelánicas junto a otras intensamente pigmentadas, resulta difícil evaluar este criterio. En nuestro estudio se halló, en el caso particular de las NM cutáneas, una proporción de melanocitomas con melanización de grados 3 a 4 significativamente más alta que la observada en melanomas.

El hallazgo de tres o más mitosis en diez campos de mayor aumento (CMA) se considera un criterio de malignidad en las NM cutáneas (6, 16, 17, 23, 76, 83). Este último no sólo ha sido relacionado con el diagnóstico histopatológico sino también con el comportamiento de la neoplasia. En las NM cutáneas aquí estudiadas, melanocitomas y melanomas mostraron IM significativamente diferentes. El 100% de los melanocitomas presentó menos de 3 mitosis en diez CMA, mientras que más de la mitad de los melanomas mostró un índice mitótico de 3 o superior. El hecho de que muchos de los melanomas en este estudio hayan presentado un IM de menos de 3 mitosis cada diez CMA se debe a que, para su clasificación, no sólo se tuvo en cuenta dicho criterio, sino también otros indicadores de malignidad presentes, fundamentalmente la atipía celular.

Si bien algunos autores sostienen que en las NM orales el hallazgo de 3 mitosis o más cada diez CMA no es útil como indicador de malignidad (21, 76), otros la han utilizado para detectar NM “bien diferenciadas”, de comportamiento menos agresivo que

la mayor parte de los melanomas orales (78). Asimismo, en melanomas orales con diferenciación osteocartilaginosa, se observó asociación entre la presencia de más de 3 mitosis cada diez CMA y la recurrencia temprana del tumor (82). En coincidencia con los hallazgos de trabajos previos, dos tercios de las NM orales presentaron 3 o más mitosis cada diez CMA en nuestro estudio (15, 78, 82, 107).

La información disponible acerca de la relación del tipo celular, el grado de melanización y el índice mitótico en las NM es escasa.

En este estudio se encontró que las NM cutáneas y orales de células epitelioides presentaron melanización escasa o ausente con mayor frecuencia que aquellas de células fusiformes o mixtas. A excepción de esta observación, los 4 grados de melanización se distribuyeron homogéneamente entre los tipos celulares mayoritarios, sin encontrarse asociación entre las mencionadas variables. Según nuestro conocimiento, no existen en la bibliografía estudios que hayan analizado la relación entre el tipo celular y el grado de melanización, aunque algunos libros de texto afirman que las mismas no se hayan relacionadas (16, 23). La escasa melanización observada en las NM de células globosas se corresponde con las características descritas para las este tipo particular de NM en la bibliografía (16, 23).

En lo que respecta a la relación del índice mitótico con el tipo celular predominante, en las NM cutáneas se observó un predominio de menos de 3 mitosis cada diez CMA en todos los tipos celulares estudiados, sugiriendo ausencia de asociación entre ambas características. Sin embargo, el predominio de este índice mitótico bajo fue menos marcado en las neoplasias de células epitelioides, en las que prácticamente la mitad de

las mismas exhibió 3 o más mitosis cada diez CMA. Dado que, como se mencionó anteriormente, la cantidad de mitosis cada 10 CMA en las NM cutáneas ha sido relacionada con el comportamiento clínico de la neoplasia, cabría esperar también una asociación entre este último y la presencia del tipo celular epitelióide.

En las NM orales, en cambio, fueron mucho más numerosas las neoplasias con ≥ 3 mitosis cada diez CMA, con la mayor proporción de dicha cantidad en las NM de tipo celular mixto. A pesar de ello, no se detectaron diferencias significativas en la cantidad de mitosis en relación al tipo celular predominante en estas neoplasias.

En lo que respecta a la distribución del índice mitótico en función del grado de melanización, en las NM cutáneas se encontró una relación inversa, lineal y significativa entre ambos; a mayores grados de melanización, menor cantidad de mitosis y viceversa. Resultó especialmente llamativa la alta proporción de neoplasias de melanización de grado 4 que presentaron menos de 3 mitosis cada diez CMA. Si bien en la bibliografía se afirma que el grado de melanización carece de valor pronóstico, dado el índice mitótico bajo encontrado en la mayor parte de las NM con melanización de grado 4, cabría esperar en estas últimas un comportamiento clínico menos agresivo.

En las NM orales, en cambio, no se observó una relación clara entre ambas características. El índice mitótico se distribuyó homogéneamente entre los distintos grados de melanización, poniendo en evidencia la falta de asociación entre las mismas.

ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS CUALITATIVOS

Generalmente, el estudio histopatológico convencional es suficiente para identificar y clasificar adecuadamente a las NM caninas. Sin embargo, al igual que lo que sucede con las NM humanas, el diagnóstico puede resultar complejo cuando estas neoplasias son pobremente diferenciadas (3, 15, 16, 21, 25, 26, 27). Las NM exhiben grados de melanización variables y carecer de pigmento visible. Otro factor que dificulta su identificación es la amplia variedad de aspectos histológicos que pueden presentar (3, 15, 27). Las NM cutáneas escasamente pigmentadas deben diferenciarse de otras neoplasias cutáneas de células fusiformes y redondas. Entre ellas se citan tumores de la vaina de los nervios periféricos, fibrosarcomas, plasmacitomas, mastocitomas poco diferenciados, sarcomas histiocíticos y linfomas, entre otros (16). Las NM orales pueden confundirse con carcinomas poco diferenciados, fibrosarcomas, linfomas y tumores osteogénicos (15). Sumado a ello, al igual que en las NM humanas, un pequeño porcentaje de las NM caninas suele presentar características histológicas “intermedias”, comunes a NM benignas y malignas. Por tanto, cuando el origen melanocítico es claro, aún pueden encontrarse dificultades en la diferenciación entre NM benignas y malignas (16, 26, 27, 28). Las técnicas de inmunohistoquímica son extensamente usadas en medicina humana como complemento de la histopatología convencional, tanto para la identificación de NM escasamente diferenciadas como para la diferenciación entre NM malignas y benignas (25, 27, 34, 56). Para determinar si la neoplasia es de origen melanocítico, se evalúa su inmunorreactividad con un panel de marcadores de diferenciación melanocítica. En dermatopatología humana, la proteína S100 es utilizada en combinación con, al menos, un marcador melanocítico más específico, principalmente

melan A, aunque también se utilizan con frecuencia HMB-45 y tirosinasa (27, 34). En medicina veterinaria, las potenciales aplicaciones de los marcadores antes mencionados se encuentran todavía en investigación. Existen escasos estudios sobre la inmunomarcación de vimentina, proteína S100, melan A, tirosinasa, NSE y HMB-45 en las NM caninas (15, 39, 45, 49, 57, 59, 60, 61). Menos se conoce aún sobre las características de otros marcadores melanocíticos menos comunes, tales como HMSA 1 y 5 e IBF9 (71, 72), o sobre los de surgimiento más reciente, como es el caso de TRP-1 y TPR-2, MITF y PNL2 (15, 58, 59, 60). En este estudio se analizaron las características de la IM de los marcadores melanocíticos vimentina, proteína S100, melan A y tirosinasa en las NM cutáneas, tanto en melanocitomas como en melanomas, así como en las NM orales, a fin de ampliar el conocimiento sobre las particularidades de la IM de cada uno de los citados marcadores en los distintos grupos de neoplasias.

Vimentina

Al igual que lo observado por otros autores, tanto en medicina veterinaria como en medicina humana, prácticamente todas las NM cutáneas y orales resultaron positivas a vimentina. La IM fue, en su mayor parte, homogénea y de intensidad fuerte, localizada en el citoplasma de los melanocitos, en forma difusa.

La marcación de distribución homogénea fue, con mayor frecuencia, de intensidad fuerte. En cambio, la marcación heterogénea se mostró asociada a intensidades moderadas y débiles.

La intensidad de marcación se distribuyó claramente al azar entre los tipos celulares predominantes y los grados de melanización, tanto en las NM cutáneas como en

las orales, predominando la intensidad fuerte en todos los casos. Las NM negativas a vimentina mostraron grados de melanización intermedios.

En las NM de mayor índice mitótico, la intensidad de marcación de vimentina fue débil y moderada con mayor frecuencia que en aquellas de índice mitótico bajo (<3), tanto en las NM cutáneas como en las orales. Esto podría deberse, en parte, a que las NM con mayor índice mitótico muestren menor diferenciación y, por ende, una menor reactividad antigénica. Sin embargo, este hallazgo pareció ser accidental ya que no se alcanzó significación estadística en este aspecto.

Dada la escasa frecuencia NM negativas a vimentina, sumada al hallazgo de marcaciones homogéneas y de intensidad fuerte en la mayoría de los casos estudiados, la vimentina representa un marcador útil y de interpretación sencilla para su inclusión en el panel de marcadores para la identificación de NM poco diferenciadas. Nuestros hallazgos reafirman la alta sensibilidad de la vimentina para la determinación de la diferenciación mesenquimática de las NM caninas observada en trabajos precedentes. Sin embargo, la misma no fue de utilidad para la diferenciación entre NM benignas y malignas, dado que las características de la IM en melanocitomas y melanomas cutáneos fueron similares. Uno de los pocos trabajos realizados al respecto en medicina veterinaria tampoco encontró diferencias remarcables en la expresión de vimentina entre NM benignas y malignas (39).

Cabe resaltar que la positividad a vimentina sólo confirma la diferenciación mesenquimática de la neoplasia. Aunque su sensibilidad es alta, su especificidad es baja. Por ello resulta adecuada para las instancias iniciales de la identificación de las NM.

Proteína S100

La mayor parte de las NM cutáneas y orales fueron positivas a proteína S100. Estos hallazgos reafirman la alta sensibilidad de la misma en la identificación del origen neuroectodérmico de las NM humanas y caninas, comunicada en trabajos precedentes. Más aún, el porcentaje de casos positivos a proteína S100 en nuestro estudio superó al comunicado en algunos de los trabajos previos, especialmente en lo que respecta a las NM orales. En un estudio extenso realizado por Ramos Vara y col. en NM orales, los autores encontraron sólo un 76% de casos positivos a proteína S100 (15). Otros autores, utilizando un menor número de casos y sin discriminar entre NM cutáneas u orales, hallaron entre un 55 y un 100% de NM positivas a proteína S100 (6, 31, 39, 45, 58).

Tanto en las NM cutáneas como en las orales, la IM fue, casi con la misma frecuencia, de distribución heterogénea y homogénea y de intensidad moderada y fuerte. La localización celular de la IM difirió entre las NM cutáneas y orales. En las primeras, la localización fue nuclear y citoplasmática en casi todos los casos. En las segundas, la mitad de los casos presentó IM de localización nuclear exclusivamente. La localización de la IM de proteína S100 más frecuentemente descrita en la bibliografía en las NM caninas es tanto nuclear como citoplasmática (6, 31, 45, 58). No hemos encontrado en la bibliografía registro de una demostración inmunohistoquímica únicamente nuclear de la proteína S100 en las NM, como la observada con frecuencia en las NM orales en nuestro estudio. En cambio, sí se ha comunicado el hallazgo, en algunos tumores, de una marcación nuclear de mayor intensidad que la citoplasmática (121).

Al igual que lo observado con la vimentina, la distribución homogénea de la IM de proteína S100 se relacionó exclusivamente con intensidades de marcación moderada a fuerte, mientras que únicamente la distribución heterogénea se vio asociada con la marcación de intensidad débil, tanto en las NM cutáneas como en las NM orales, aunque en este caso las diferencias observadas no fueron debidas al azar. La ocurrencia de marcaciones heterogéneas y débiles en forma concomitante hace pensar que éstas sean manifestaciones de una conservación antigénica deficiente, probablemente a consecuencia de una fijación prolongada.

Las características histopatológicas no condicionaron la distribución de la IM de proteína S100, a excepción del tipo celular en las NM orales.

El tipo celular, el grado de melanización y el índice mitótico no influyeron en la intensidad de marcación de proteína S100 en las NM cutáneas y orales. En las primeras, los tipos celulares mayoritarios, así como los diversos grados de melanización, mostraron las tres intensidades de marcación. En las NM orales, resultó llamativo el hecho de que prácticamente todos los casos de marcación débil se observaron en neoplasias con melanización de grado 1. Sin embargo, al igual que lo observado con vimentina, las NM cutáneas y orales negativas a proteína S100 exhibieron grados de melanización intermedios. Algunos estudios encontraron una relación inversa entre la pigmentación y la intensidad de marcación de proteína S100 en las NM humanas (122), no así en NM caninas (45). Independientemente de ello, la mayor parte de los autores coincide en afirmar que la proteína S100 sigue siendo el marcador más útil para el diagnóstico de melanomas desmoplásicos y de células fusiformes, debido a que la sensibilidad de

marcadores más específicos es baja en dichos casos, no así la de la proteína S100 (27, 34, 40, 41). Lo mismo se ha concluido en algunos estudios realizados en NM caninas amelánicas (58, 39). El nuestro trabajo, el hallazgo de un gran número de casos positivos, de intensidad mayormente moderada a fuerte, independientemente del tipo celular y, fundamentalmente, del grado de melanización, permite considerar a la proteína S100 como un marcador útil y de interpretación sencilla para la identificación de NM pobremente diferenciadas y amelánicas, con ligeras dificultades sólo en los casos que puedan obtenerse marcaciones heterogéneas y débiles en forma concomitante.

Como las características de la IM de proteína S100 fueron similares en melanocitomas y melanomas cutáneos, se puede inferir que la misma no es aplicable a la diferenciación entre NM benignas y malignas. Koenig y col. tampoco encontraron diferencias remarcables en la expresión de proteína S100 entre NM benignas y malignas caninas (39).

Aunque la sensibilidad de este marcador es alta, su especificidad no lo es tanto, por lo que, si bien es más específica para las NM que la vimentina, su sola aplicación no permite confirmar el diagnóstico. Su utilización resulta valiosa en conjunto con algún marcador de diferenciación melanocítica.

Melan A

La información disponible acerca de las características de la IM de melan A en las NM caninas es muy escasa. En la mayor parte de los estudios precedentes, los hallazgos se describieron sin discriminar entre NM de distintas localizaciones. Un trabajo previo en el que se evaluó un pequeño grupo de NM cutáneas y orales, encontró sólo un 62% de

casos positivos a melan A (39). En nuestro estudio, tanto melanocitomas como melanomas cutáneos mostraron una positividad a melan A superior; 92% y 80%, respectivamente. Contrariamente, la proporción de NM orales positivas fue inferior a la descrita por otros autores; 70% y 90%, respectivamente (15). A partir de la realización de los de los primeros estudios, se ha planteado el interrogante de si la positividad a melan A en las MN caninas está relacionada con la presencia de melanina o no (3, 15, 39, 58). En un estudio de 29 casos (que incluyó NM cutáneas y orales) los autores encontraron que el 90% de las neoplasias pigmentadas fue positivo a melan A, mientras que todas las neoplasias amelánicas resultaron negativas. Asimismo, sólo 2 de 7 líneas celulares de melanoma canino evaluadas en dicho estudio fueron positivas a melan A. Ambas eran intensamente pigmentadas. Contrariamente, 3 líneas en las que la melanina no fue apreciable resultaron negativas (39). Estos hallazgos fueron apoyados por un estudio posterior, en el que sólo en el 47% de las NM amelánicas fue positivo a melan A. Sin embargo, el estudio más exhaustivo realizado hasta el presente en 122 melanomas orales, registró sólo un 8% de casos negativos a melan A. Si bien los autores no detallaron el grado de pigmentación de las NM negativas a melan A, el 32% de casos estudiados correspondió a melanomas amelánicos (15). De esto se deduce que una proporción importante de NM amelánicas resultó positiva a melan A. En nuestro estudio, sin embargo, los resultados avalaron los hallazgos de los primeros trabajos, ya que se observó una asociación clara, estadísticamente significativa, entre la positividad a melan A y la presencia de melanina y viceversa. El 100% de las NM con melanización de grado 4 fue positivo a melan A, mientras que las NM con melanización de grado 1 exhibieron la frecuencia más alta de casos negativos (alrededor del 70%). Las NM con grados de

melanización intermedios también mostraron porcentajes de positividad intermedios a melan A. Este fenómeno se observó tanto en las NM cutáneas como en las NM orales. Esta observación no resulta alentadora, ya que los casos que mayores dificultades diagnósticas plantean son aquellos con melanización escasa o ausente. En melanomas amelánicos humanos, melan A ha demostrado poseer una sensibilidad bastante superior (123). Sin embargo, en el caso particular de melanomas de células fusiformes y desmoplásticos, la sensibilidad de los marcadores melanocíticos específicos, incluyendo a melan A, es significativamente inferior a la observada en otras NM humanas (34, 41). En relación a ello, existen trabajos que afirman que la positividad a melan A en las NM humanas depende del tipo celular predominante (53). En nuestro estudio, prácticamente la mitad de las NM orales de células fusiformes fue negativa a melan A. En las NM cutáneas, la mayor proporción de casos negativos se registró en aquellas de células epitelioides. De cualquier modo, la positividad a melan A en nuestro estudio resultó independiente del tipo celular.

Por otro lado, se ha sugerido que la positividad a melan A en las NM caninas podría depender de su carácter de benignas o malignas. En su estudio de 29 casos, Koenig y col. hallaron la más alta proporción de casos negativos en NM histológica y clínicamente malignas. Por ello infirieron alguna relación de la expresión de melan A con el pronóstico de las NM caninas (39). Los hallazgos comunicados por estos autores presentan similitudes con los del presente trabajo. En lo que respecta al potencial valor pronóstico de melan A, en las NM humanas se ha correlacionado la presencia de una inmunorreactividad mínima o negativa a melan A con un pronóstico desfavorable (124). Desde que se sabe que Melan A/MART-1 es un antígeno reconocido por linfocitos T

citotóxicos específicos (*CTL, cytolytic T lymphocytes*), éstas células se han detectado en una alta proporción de personas con melanoma (125). La pérdida de la expresión de melan A y de otros antígenos de diferenciación melanocítica en melanomas podría representar una forma de evasión de la respuesta inmune por parte de la neoplasia. Asimismo, la pérdida de la expresión de melan A observada en pacientes con estadios avanzados de la enfermedad podría ser el resultado de la acción de una respuesta inmune específica que conlleva a una selección de células débilmente positivas o negativas a melan A (124).

Aunque la sensibilidad de melan A en las NM humanas varía de acuerdo con el tipo de lesión melanocítica, en coincidencia con lo observado en las NM caninas, las lesiones benignas han mostrado una reactividad a melan A hasta del 100%, superando a la observada en melanomas malignos en esta especie (53). Tal como se ha descrito, la distribución de la IM de melan A en nuestros casos resultó heterogénea con cierta frecuencia (15), alternándose áreas intensamente marcadas con otras no reactivas, tanto en las NM cutáneas como en las orales. Si bien la distribución homogénea fue ligeramente más frecuente en melanocitomas que en melanomas cutáneos, esta característica resultó independiente del diagnóstico histopatológico. Contrariamente, la intensidad de marcación de melan A fue significativamente diferente entre melanocitomas y melanomas cutáneos. La intensidad fuerte se mostró asociada con frecuencia a melanocitomas, mientras que los melanomas exhibieron marcaciones de intensidad moderada en más de la mitad de los casos. En coincidencia, Koenig y col. hallaron marcaciones intensas en la mayor parte de los melanocitomas analizados en su

trabajo (39). En melanomas orales, en cambio, la intensidad de marcación fuerte fue predominante.

El patrón citoplasmático de la IM de melan A fue difuso, polar y una mezcla de ambos en nuestro estudio, hallazgo que también se ha descrito previamente (15). El patrón difuso se presentó en la mayoría de los casos. Curiosamente, la marcación polar se observó con mayor frecuencia en melanomas, tanto orales como cutáneos, y prácticamente no se presentó en melanocitomas. Esta diferencia alcanzó significación estadística en las NM cutáneas. No hemos encontrado información acerca de esta relación en la bibliografía. De acuerdo con nuestros resultados, la IM polar de melan A podría ser indicio de malignidad en las NM cutáneas, lo que permitiría también relacionarla con el pronóstico en estas neoplasias.

Al igual que lo observado en la IM de vimentina y de proteína S100, la IM homogénea de melan A fue, a su vez, de intensidad fuerte a moderada en casi la totalidad de los casos. En cambio, la marcación heterogénea mostró la frecuencia más alta de marcaciones débiles. A pesar de ello, las citadas variables resultaron independientes en las NM cutáneas y orales.

En las NM cutáneas, así como en las NM orales, ni el tipo celular ni el grado de melanización condicionaron la intensidad de marcación de melan A. Contrariamente, la marcación de intensidad fuerte resultó notoriamente más frecuente en las NM de índice mitótico bajo. Las NM con un índice mitótico de 3 o superior, mostraron marcaciones moderadas a débiles con mayor frecuencia. Esta asociación resultó significativa sólo en las NM cutáneas, lo que no resulta extraño considerando que, en estas últimas, existe

evidencia creciente de que un índice mitótico de 3 o superior representa el “punto de corte” para la diferenciación entre NM de comportamiento clínico benigno o maligno, no siendo esto tan evidente en las NM orales (6, 16, 17, 23, 76, 83). Dado que la marcación fuerte de melan A se observó con alta frecuencia en melanocitomas y éstos, a su vez, presentaron índices mitóticos bajos, es esperable que las tres características se hallen interrelacionadas. Por ello, cabe considerar una vinculación entre la IM de melan A de intensidad fuerte y un pronóstico favorable en las NM cutáneas, como ha sido propuesto por otros autores (39).

La distribución de la IM de melan A tampoco mostró dependencia de las características histopatológicas de las NM cutáneas y orales, a excepción, una vez más, del grado de melanización en las primeras. Las NM cutáneas con los menores grados de melanización, además de exhibir un gran porcentaje de casos negativos a melan A, mostraron una distribución heterogénea de la IM. La mayor parte de las NM con melanización de grados 3 y 4 mostraron marcaciones homogéneas. Curiosamente, las escasas NM con melanización de grado 1 que fueron positivas a melan A lo hicieron, además, en forma débil.

Al contrario de lo que sucede con vimentina y proteína S100, la especificidad de melan A para los tejidos de origen melanocítico es alta. Ramos Vara y col. encontraron que sólo 4 de 163 tumores no melanocíticos caninos fueron positivos a melan A. Éstos incluyeron carcinomas de glándulas salivales y de células transicionales, neoplasias que difícilmente puedan confundirse con NM en el estudio morfológico (15). Asimismo, Cangul y col. corroboraron la especificidad de melan A para las NM caninas analizando

una serie de neoplasias que, como se mencionó al comienzo de esta sección, pueden ser confundidas con NM pobremente diferenciadas (linfoma, mastocitoma, plasmacitoma, fibrosarcoma y tumor venéreo transmisible). Ninguna de ellas resultó positiva a melan A (57).

A pesar de su alta selectividad, melan A mostró menor capacidad que la proteína S100 para la identificación de NM pobremente diferenciadas. Según nuestro estudio, tratándose de NM escasamente pigmentadas o amelánicas, melan A contribuiría a la formulación del diagnóstico en el 30% de los casos, aproximadamente. Cabe notar que son éstos los casos que plantean mayores dificultades diagnósticas. Sumado a ello, la IM en estas neoplasias tiende a presentarse en forma débil, especialmente en las NM cutáneas. Por ello, en coincidencia con algunos de los estudios previos, consideramos que la utilidad diagnóstica de melan A en las NM caninas es limitada.

Sin embargo, un rasgo interesante de la IM de melan A en las NM caninas es su potencial valor como indicador pronóstico. En nuestro estudio, las diferencias en la intensidad de marcación observadas entre melanocitomas y melanomas, así como la frecuente aparición del patrón de marcación polar en melanomas, sugieren una potencial vinculación de melan A con el pronóstico. Asimismo, dadas sus características, este marcador podría ser de utilidad en la diferenciación entre NM benignas y malignas, considerando que la obtención de una IM homogénea y de intensidad fuerte, con un patrón citoplasmático difuso se ha visto asociada con NM benignas en nuestro estudio.

Tirosinasa

Según nuestro conocimiento, existen escasos estudios acerca de la utilidad del marcador melanocítico tirosinasa (clon T311) en las NM caninas. Más aún, los resultados varían en gran medida entre los distintos autores. A partir del primer estudio preliminar realizado en NM orales, Ramos Vara y col. desaconsejaron su uso debido a que encontraron inmunorreactividad a tirosinasa no sólo en melanocitos sino también en otros tejidos como el epitelio de la mucosa oral, la epidermis, los anexos y el músculo esquelético (15). Un estudio posterior confirmó la reactividad a tirosinasa en el epitelio de las glándulas sudoríparas pero revaloró su especificidad dado que una extensa serie de neoplasias no melanocíticas que podrían confundirse con NM pobremente diferenciadas fue negativa a tirosinasa. Desafortunadamente, en el mismo estudio, los autores no encontraron reactividad a tirosinasa en ninguna de las NM estudiadas (57). En coincidencia con ello, el porcentaje de NM cutáneas y orales positivas a tirosinasa en nuestro estudio fue extremadamente bajo, de modo que se decidió no aumentar la cantidad de casos a estudiar más allá de los utilizados para el estudio preliminar. Se apreció una IM de intensidad moderada en células tumorales aisladas y en los melanocitos presentes en la epidermis. No se apreció reactividad inespecífica a tirosinasa en los tejidos adyacentes a las neoplasias en cuestión. Asimismo, debe tenerse en cuenta que los anticuerpos monoclonales producidos contra antígenos humanos reconocen un epítipo específico de ese antígeno y éste puede variar entre las especies (126). Éste podría ser el caso de algunos de los antígenos evaluados en nuestro estudio, entre ellos, el de la tirosinasa. En oncología veterinaria se dispone de tan escasa cantidad de anticuerpos de uso específico para las especies domésticas que se hace necesario utilizar

aquellos producidos para uso humano, confiando en la existencia de reactividad cruzada entre antígenos humanos y animales. A ello se deben las principales dificultades en la detección inmunohistoquímica de muchos antígenos en medicina veterinaria (36). Si bien cabría considerar la posibilidad de que éste antígeno haya sido afectado, en mayor medida que otros, por el efecto del enmascaramiento antigénico provocado durante el proceso de fijación, un trabajo reciente mostró que la permanencia prolongada en formaldehído no afectó la reactividad antigénica de la tirosinasa (61).

Aunque la tirosinasa se utiliza de rutina en el diagnóstico de las NM humanas y se ha comunicado una sensibilidad hasta del 95% (27), los resultados de nuestro estudio han indicado que la misma carece de utilidad para el diagnóstico de las NM caninas pobremente diferenciadas.

Consideraciones finales

Dado que aún no se ha identificado un marcador que reúna las condiciones ideales de sensibilidad y especificidad para la identificación de NM pobremente diferenciadas, la utilización de un "cóctel" de anticuerpos conformado por varios marcadores puede ayudar a superar dicho inconveniente. De los marcadores analizados en nuestro estudio, vimentina, proteína S100 y melan A presentaron características que justifican su inclusión en un panel de marcadores de utilidad diagnóstica para las NM caninas. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la vimentina resulta útil en la clasificación inicial de las NM para la confirmación de la diferenciación mesenquimática de las mismas, permitiendo descartar aquellas de origen epitelial. Asimismo, la utilización de la proteína S100 resulta indispensable para la aproximación diagnóstica en el caso particular de las NM

escasamente pigmentadas. Melan A, dada su alta selectividad, puede considerarse un marcador aplicable a la confirmación del diagnóstico de las NM. Aunque su aplicación permitirá llegar a dicha instancia en menos de la mitad de los casos de NM amelánicas, consideramos que esa proporción justifica su inclusión en el panel de anticuerpos a emplear.

Por un lado, la descripción pormenorizada de las características de la IM de cada antígeno estudiado en este trabajo proporciona herramientas para una interpretación más precisa de los resultados en los casos en que los mismos sean aplicados para la identificación de NM pobremente diferenciadas o para colaborar en la diferenciación entre NM benignas y malignas.

Por otro lado, resulta evidente que es necesario complementar el uso de los marcadores antes mencionados con otros tan específicos como melan A, pero cuya sensibilidad sea mayor, de modo que contribuyan a incrementar la sensibilidad del conjunto para la detección de NM caninas pobremente diferenciadas. Afortunadamente, los resultados obtenidos con *TRP-1* y *2*, así como con *PNL-2*, ambos marcadores que han comenzado a estudiarse en forma reciente, parecen ser prometedores (59, 60, 61).

ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS CUANTITATIVOS

Proliferación: IP-PCNA e IP-Ki67

Según nuestro conocimiento, son escasos los estudios disponibles acerca de la expresión de los marcadores de proliferación celular PCNA y Ki67 en las NM caninas (6, 77, 82, 83, 84). Menos información existe aún sobre el análisis comparativo de ambos marcadores en melanocitomas y melanomas (6). Sumado a ello, el número de NM benignas y malignas utilizado en los mencionados trabajos es heterogéneo o bien muy pequeño en alguno de los grupos (6, 77, 83). El análisis de los resultados en el presente estudio se realizó teniendo en cuenta los hallazgos de trabajos precedentes, pero utilizando grupos más homogéneos en cuanto al número de casos para la comparación de la expresión de ambos marcadores en melanocitomas y melanomas cutáneos.

No resulta sorprendente que todas las neoplasias analizadas, tanto cutáneas como orales, fueran positivas a PCNA. Es bien conocido que esta proteína posee una vida media prolongada, hecho que facilita su detección inmunohistoquímica (127). Más aún, se ha sugerido que, debido a su vida media prolongada, esta proteína podría ser identificada en células en G0 (127,128, 129, 130). Por esta razón, su habilidad para detectar específicamente células proliferantes es discutida. Se han apreciado marcaciones inespecíficas en células que difícilmente sean proliferantes (129, 131, 134). En este estudio, éste fenómeno se observó sólo ocasionalmente en el endotelio vasos de pequeño calibre, neutrófilos y células del tejido conjuntivo.

Lo contrario sucede con Ki67, cuya vida media ha sido estimada en alrededor de una hora. Se postula que los niveles de la proteína varían a lo largo del ciclo celular, no

debido a su velocidad de degradación sino de acuerdo con su tasa de expresión. Se ha visto que los niveles de ki67 son bajos en las fases G1 y S temprana, por lo que células en fase G1 tardía podrían ser erróneamente consideradas como no proliferantes (133, 134). Por un lado, ello explicaría el hecho de que los IP-Ki67 sean generalmente más bajos que los IP-PCNA en una misma neoplasia. Por otro lado, estas características de ki67 podrían asociarse con el hallazgo de casos que resultan negativos al antígeno en cuestión. En NM humanas, algunos autores consideran esperable encontrar NM benignas completamente negativas a Ki67. Más aún, ello ha sido correlacionado con un pronóstico favorable de las mismas (135). En nuestro estudio, sin embargo, los casos negativos a Ki67 se observaron en melanocitomas, pero también en melanomas cutáneos y orales. Curiosamente, la proporción de neoplasias negativas a Ki67 fue la misma en cada grupo (alrededor del 25%). Sumado a ello, algunas de las NM malignas negativas a Ki67 presentaron índices mitóticos relativamente altos. Considerando que los niveles de la proteína alcanzan el máximo en los núcleos en mitosis (136), es posible suponer que haya ocurrido una falla en la detección inmunohistoquímica de Ki67 en dichos casos. Por otra parte, el enmascaramiento antigénico producido por una permanencia prolongada en formol durante el proceso de fijación también podría ser causa del hallazgo de casos negativos a Ki67 en nuestro estudio. Se ha visto que este antígeno es muy sensible a los fijadores y que puede deteriorarse con el tiempo, inclusive a pesar ser mantenido a -20°C (137). Cabe destacar que, en los casos positivos, el IP-Ki67 se correlacionó con el índice mitótico. Asimismo, debe tenerse en cuenta que los anticuerpos monoclonales producidos contra antígenos humanos reconocen un epítopo específico de ese antígeno y éste puede variar entre las especies (126). En oncología veterinaria se dispone de tan escasa cantidad de

anticuerpos de uso específico para las especies domésticas que se hace necesario utilizar aquellos producidos para uso humano, confiando en la existencia de reactividad cruzada entre antígenos humanos y animales (36). A ello se deben las principales dificultades en la detección inmunohistoquímica de muchos antígenos.

En los trabajos previos sobre la expresión de Ki67 (MIB-1) en NM caninas, los autores no hicieron referencia al hallazgo de casos negativos (6, 77, 82, 83, 84). Sin embargo, en un estudio realizado en carcinomas mamarios caninos, sólo el 54% de los casos resultó positivo a Ki67 (138). Esta proporción fue aún superior a la encontrada por nosotros. Curiosamente, en dicho estudio se utilizó un marcador provisto por el mismo laboratorio que el empleado en nuestro estudio.

El hallazgo de marcaciones, tanto homogéneas como heterogéneas, para ambos marcadores en las NM coincide con lo descrito en trabajos precedentes (6, 83).

En las NM cutáneas, los IP promedio para PCNA y Ki67 obtenidos en melanocitomas en nuestro estudio fueron superiores a los descritos por otros autores, no así aquellos obtenidos en melanomas (6, 77, 83). Por ello, en contraposición a lo comunicado en trabajos precedentes, no encontramos diferencias en los índices de proliferación en melanocitomas y melanomas cutáneos. Aunque observamos una variabilidad alta de los IP dentro de cada grupo (melanocitomas y melanomas), la misma no fue en ningún caso superior a la obtenida por otros autores en NM, tanto en medicina veterinaria como en medicina humana (6, 77, 81, 82, 83, 84, 132, 139, 135). Cabe mencionar que, en dos de los estudios previos realizados en NM caninas en los que se obtuvieron diferencias significativas en los IP promedio para PCNA y Ki-67 entre NM

benignas y malignas, se incluyeron en el análisis no sólo NM cutáneas sino también NM orales. Los IP para ambos marcadores en dichos estudios en NM orales fueron superiores a los observados en melanomas cutáneos, hecho que incrementó aún más las diferencias entre los IP de melanocitomas y melanomas (6, 77).

En las NM orales, el IP-PCNA promedio hallado en nuestro estudio fue significativamente superior al correspondiente a melanocitomas y a melanomas cutáneos. Este hallazgo podría correlacionarse con la mayor agresividad de las NM orales respecto de las NM cutáneas. Contrariamente, el IP-Ki67 promedio estimado en las NM orales fue menor al observado en las NM cutáneas. A pesar de ello, ambos índices, IP-PCNA e IP-Ki67, mostraron una correlación significativa en estas neoplasias. Los IP-Ki67 hallados en algunos de los estudios previos han sido relativamente bajos (6, 77), mientras que en otros, los IP-Ki67 fueron tan altos como los obtenidos para PCNA en nuestro estudio (82, 84).

En lo que respecta a la relación de los IP para ambos marcadores y las variables clinicopatológicas analizadas, en coincidencia con lo comunicado por otros autores, las diferencias observadas en ambos índices con respecto a la localización, al tamaño de la neoplasia y a la presencia de ulceración fueron mínimas. Sólo esta última se mostró asociada a IP-PCNA altos en las NM cutáneas así como a IP-Ki67 altos en las NM orales. En lo que respecta al tipo celular predominante, tampoco se detectaron diferencias importantes en los valores de ambos índices de proliferación, tal como ha sido descripto (6). Según Laprie y col., la melanización intensa y la actividad en la UDE ejercerían una influencia positiva en la supervivencia de los pacientes con NM cutáneas. En coincidencia,

las NM cutáneas con melanización más abundante, al igual que aquellas con actividad en la UDE, mostraron IP-Ki67 significativamente bajos y viceversa. Este fenómeno no se observó en las NM orales en las que, al contrario de lo observado en las NM cutáneas, los IP para ambos marcadores fueron más altos en las neoplasias con melanización intensa, aunque sin alcanzar significación estadística en este caso. Un estudio reciente ha vinculado a la melanización intensa con un pronóstico desfavorable en las NM orales caninas (84).

La mayor parte de los autores coincide en afirmar que el índice mitótico en las NM cutáneas es la variable histopatológica que mejor se correlaciona con el comportamiento del tumor (6, 16, 17, 23, 76, 83). En este estudio, las NM cutáneas con 3 o más mitosis cada 10 CMA mostraron IP-Ki67 significativamente más elevados que aquellas con menos de 3. Algo similar se apreció con el IP-PCNA aunque sin alcanzar significación estadística en este caso. Esta observación podría considerarse un indicio de la capacidad de los marcadores de proliferación celular para identificar NM cutáneas de comportamiento agresivo, tal como se ha observado en estudios precedentes (6, 77, 83). Contrariamente, las diferencias en ambos índices de proliferación en las NM orales con más y menos de 3 mitosis cada 10 CMA fueron insignificantes.

A partir de los resultados de este estudio puede asumirse que, en el caso de las NM cutáneas, ninguno de los marcadores de proliferación aquí estudiados contribuye a la diferenciación de neoplasias benignas y malignas. Por otro lado, se obtuvo cierta evidencia acerca de la posible capacidad de los marcadores de proliferación celular para

identificar NM de comportamiento más agresivo, especialmente en el caso de las NM cutáneas, dada su estrecha relación con el índice mitótico.

Es probable que la heterogeneidad observada en los resultados de los escasos estudios existentes acerca de los marcadores de proliferación celular en las NM caninas se deba a las diferencias metodológicas y, especialmente, a que todavía no se dispone de criterios de interpretación homogéneos ni de métodos estandarizados para la cuantificación de la IM de estos marcadores. En nuestro caso, la IM se cuantificó en las áreas con mayor cantidad de células positivas (“hot spots”). Esta forma de cuantificación se ha utilizado en otros estudios dado que se considera que dichas áreas podrían representar clones celulares con mayor capacidad de invadir y metastatizar (83, 140). En años recientes se ha cuestionado la validez de la cuantificación inmunohistoquímica (141, 142). La comparación de resultados obtenidos en distintos laboratorios resulta compleja debido a que factores potencialmente estandarizables como el procesamiento del tejido, los sistemas de detección empleados, los clones y las concentraciones de los anticuerpos, así como los protocolos de recuperación antigénica (143, 144) aún continúan variando entre ellos. Más aún, se ha visto que la regularidad de los resultados en un mismo laboratorio puede variar entre diferentes especímenes, especialmente en lo que se refiere al tiempo de exposición al fijador (145). Inclusive, aunque los factores antes mencionados sean estandarizados, aún resultará difícil controlar aquellas variables relacionadas con la conservación antigénica previa al procesamiento inmunohistoquímico (143, 144). Este fenómeno de que múltiples estudios sobre los mismos marcadores conduzcan a diferentes conclusiones ha motivado a expertos en el área a confeccionar y

publicar guías con recomendaciones para la comunicación de los resultados de los estudios sobre marcadores tumorales pronósticos (146).

A propósito de esto último, y al igual que en medicina veterinaria, se han comunicado resultados variables acerca de la utilidad de PCNA y Ki67 en las NM humanas. La mayoría de los autores coincide en afirmar que ambos marcadores pueden ayudar en la diferenciación de NM benignas y malignas (27). Aunque su relación con el pronóstico es controvertida, algunos estudios parecen indicar que ambos marcadores presentan potencial para predecir el resultado de la enfermedad (48, 147, 148).

Vascularización: AE y DMV

La evaluación del potencial angiogénico de las neoplasias no resulta sencilla dado que se trata de un fenómeno dinámico. De allí que la mayoría de los estudios realizados hasta el presente se han centrado en el producto de la angiogénesis: la densidad de microvasos (149). La medición de la densidad de microvasos a partir de la detección inmunohistoquímica de “hot spots” (puntos calientes) es el método tradicionalmente aceptado para la evaluación de la angiogénesis en oncología humana (150). Sin embargo, este método lleva implícito cierto nivel de subjetividad, dado que puede resultar complejo determinar si vasos adyacentes deben o no contarse como vasos individuales. A los efectos de disminuir la variación entre observadores, se han propuesto y aplicado diversos métodos automáticos de cuantificación de este proceso en distintas neoplasias humanas (149, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157). Por otra parte, la medición de la vascularización tumoral mediante programas de análisis de imágenes proporciona información adicional a la obtenida mediante la estimación de la DMV en la forma

tradicional, como la cantidad de vasos dentro un rango de dimensiones, el área luminal vascular, el perímetro vascular y el área total inmunomarcada por campo microscópico (149, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157).

Para la medición de la vascularización tumoral en nuestro estudio se determinaron el área endotelial (AE) y la DMV, mediante la aplicación del factor de von Willebrand, a los efectos de evaluar su relación con las características clinicopatológicas de las NM cutáneas y orales.

A pesar de que la DMV se ha relacionado con el pronóstico en una serie de neoplasias humanas, su importancia en melanomas es aún controvertida (94, 95, 96 97, 98, 99).

En las NM caninas, según nuestro conocimiento, sólo se han realizado escasos estudios sobre angiogénesis y la relación del AE y la DMV con algunas características clinicopatológicas en estas neoplasias (104, 158). En coincidencia con lo comunicado en ambos trabajos precedentes, tanto el AE como la DMV en nuestro estudio fueron significativamente más elevados en melanomas cutáneos y orales que en melanocitomas. Es por ello que el AE y la DMV podrían resultar de ayuda en la diferenciación entre NM benignas y malignas.

La correlación hallada por nosotros entre en AE y la DMV fue superior a la observada por otros autores en neoplasias humanas (106), aunque no encontramos datos acerca de este aspecto en medicina veterinaria.

Se ha postulado que la mayor agresividad de las MN orales respecto de las NM cutáneas podría estar relacionada con la abundante irrigación de la mucosa oral, hecho que facilita el acceso al torrente vascular para la diseminación de la neoplasia (104). En coincidencia con ello, la DMV promedio en melanomas orales en nuestro estudio fue la más elevada. Asimismo, en las NM cutáneas de localización digital, las que también se han relacionado con un pronóstico desfavorable (17, 76, 107, 112, 113), presentaron mayor vascularización que aquellas de otras localizaciones. En las NM orales, en cambio, el AE y la DMV variaron sólo ligeramente entre las localizadas en los carrillos, la encía y el paladar. Tampoco se apreciaron variaciones en el estatus vascular de las NM cutáneas y orales en función de su tamaño o bien de la presencia de ulceración. Contrariamente, las NM cutáneas con actividad en la UDE exhibieron una vascularización significativamente menor a la observada en aquellas sin actividad en la UDE. Ello coincide con el hecho de que la mayor parte de las NM con actividad en la UDE fueron melanocitomas, los cuales, a su vez, exhibieron el AE y la DMV más bajos.

Asimismo, y confirmando en parte los hallazgos de Mukaratirwa y col. (104), el AE y la DMV fueron independientes del tipo celular predominante y del grado de melanización.

Tampoco se observaron diferencias en el AE y la DMV entre las NM con más y menos de 3 mitosis cada 10 CMA. Este hallazgo no resulta alentador ya que, en las NM cutáneas, el índice mitótico es la característica histopatológica que mejor se ha correlacionado con el grado de malignidad (6, 16, 17, 23, 76, 83).

Tampoco se halló en nuestro estudio una relación clara del AE y la DMV con los índices de proliferación celular. Este hallazgo coincide con lo observado en otras neoplasias caninas (103).

Invasión: MMP-2

Aunque la expresión de metaloproteinasa 2 de la matriz ha comenzado a estudiarse mediante estudios inmunohistoquímicos en distintas neoplasias caninas, especialmente mamarias (91,92), aún no se han comunicado resultados al respecto en las neoplasias melanocíticas.

En nuestro estudio no fue posible demostrar la presencia de MMP-2 en las NM caninas. Tampoco se detectó la enzima en tejidos caninos normales, como pulmón y linfonódulo. Ambos mostraron expresión de MMP-2 en trabajos precedentes (91). Dados los hallazgos, y lejos de restarle importancia a la actividad de las colagenasas en la progresión de las NM caninas, consideramos que el anticuerpo “anti MMP-2 humana” empleado en este trabajo carece de utilidad para la inmunomarcación de la misma en caninos, probablemente por ausencia de reactividad cruzada entre ambas especies.

ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA

Aspectos clinicopatológicos

Si bien desde hace algunas décadas se asume que existen aspectos clínicos y morfológicos relacionados con el pronóstico de las NM caninas, aún continúan documentándose variaciones en su comportamiento. Del análisis de la bibliografía se puede apreciar la falta de consenso entre los distintos autores acerca de los criterios anatómicos e histológicos que clásicamente se han considerado indicadores pronósticos. Es por ello que en nuestro estudio se analizó la relación de características clinicopatológicas y de marcadores inmunohistoquímicos con el tiempo de supervivencia de los pacientes, a los efectos de evaluar el potencial pronóstico de los aspectos que permanecen en discusión, así como para detectar posibles factores que aún no han sido relacionados con el pronóstico de las NM caninas.

Las discrepancias entre el aspecto histológico de las NM y su comportamiento observadas por algunos autores han sido motivo de sucesivos estudios, es decir, NM histológicamente benignas que exhibieron comportamiento agresivo y viceversa (17, 76, 78, 83, 107, 108, 114, 159). Un hallazgo relevante de nuestro estudio fue que, en contraposición con ello, todas las NM cutáneas histológicamente benignas se comportaron como tales, dado que el 100% de los pacientes con melanocitoma se presentó libre de la enfermedad al año de realizado el diagnóstico. Si bien estas discrepancias se hallaron más frecuentemente en NM orales, también se han observado, aunque en menor medida, en NM cutáneas (76, 78, 83, 107, 159).

En lo que respecta a melanomas cutáneos, sólo la mitad de los pacientes experimentó recidivas o murió antes del año de realizado el diagnóstico en nuestro estudio. Más aún, la probabilidad de supervivencia al año en estas neoplasias fue superior al 60%. Dentro de este 50% de melanomas que experimentaron comportamiento benigno, resulta difícil saber si el aspecto histológico falló en predecir el resultado de la enfermedad o si el comportamiento benigno fue consecuencia de la curación de la neoplasia mediante el tratamiento quirúrgico (16, 108). En estudios previos, la correlación entre el diagnóstico histopatológico de malignidad y la ocurrencia de recidivas o metástasis en melanomas cutáneos ha sido del 35 al 80% (17, 83, 107, 108).

Por otro lado, en la literatura veterinaria se encuentra profundamente arraigado el concepto de la relación entre la localización de las NM y su comportamiento. Se asume que prácticamente todas las NM cutáneas se asocian a comportamientos benignos, constituyendo una excepción aquellas del lecho ungular (2, 14, 16). Según nuestros resultados, el 75% de las NM cutáneas tendría buen pronóstico.

En las NM orales, en cambio, la muerte relacionada con la neoplasia en nuestro estudio fue mucho más frecuente dentro de los 6 meses posteriores al diagnóstico y la probabilidad de supervivencia al año fue inferior al 40%. Estos hallazgos son similares a los descritos en la bibliografía (15, 17, 20, 76, 107, 115). Claro está que las NM orales presentaron mayor agresividad que las NM cutáneas y, por ende, la tasa de supervivencia en las primeras fue mucho menor. Más aún, la mayoría de los autores coincide en afirmar que prácticamente todas las NM localizadas en la mucosa oral presentan comportamiento maligno (2, 3, 15, 16, 18, 76). Como se mencionaba al comienzo de este

apartado, se han descrito NM orales de aspecto histológico benigno que causaron la muerte de los pacientes (76, 78, 83, 107, 159). Esto no ocurrió en nuestro estudio, ya que no se diagnosticaron melanocitomas orales. Sin embargo, sí observamos el fenómeno opuesto en el 14% de los pacientes con melanoma oral, los que se mantuvieron libres de la enfermedad durante, al menos, un año después de realizado el diagnóstico. Esto también ha sido observado en trabajos precedentes (17, 20, 76, 78, 107), promoviendo el debate acerca de los aspectos clínicos y anatomopatológicos que desde hace unos años se relacionan con el pronóstico de las NM. En este contexto, un estudio reciente demostró que el 95% de los pacientes de un subgrupo con NM orales denominadas “bien diferenciadas”, permaneció vivo al menos tres años luego de la exéresis quirúrgica de la neoplasia (78). Sin embargo, pocas de las características histológicas descritas para estas NM bien diferenciadas se observaron en las NM orales de los pacientes libres de la enfermedad en nuestro estudio. Asimismo, en un trabajo con resultados muy similares a los nuestros, Spangler y col. encontraron que el 12% de los pacientes con melanoma oral se encontró libre de la enfermedad durante los tres años posteriores al diagnóstico (17).

Por todo lo expuesto, es evidente que aunque el aspecto histológico de las NM permite predecir el resultado de la enfermedad en muchos casos, en otros, esto no es así. La necesidad de mejorar la predicción acerca de la evolución de la enfermedad ha motivado la investigación de posibles indicadores pronósticos, dentro de los cuales se encuentran ciertas características clinicopatológicas de las NM, en permanente evaluación.

En nuestro estudio, la supervivencia de los pacientes con NM digitales fue significativamente menor a la de los pacientes con neoplasias cutáneas de otras localizaciones. Aunque algunos autores no observaron esta relación (76, 108, 113), Spangler y col. ubicaron a las NM digitales en un grupo de supervivencia intermedio entre las NM cutáneas de otros sitios y las NM orales (17).

La presencia de ulceración en las NM cutáneas fue otra característica que se relacionó con peor pronóstico en nuestro trabajo. Este criterio ha sido escasamente estudiado en NM caninas. Si bien se ha sugerido que posee valor pronóstico limitado (3), Laprie y col. hallaron resultados similares a los nuestros.

Al igual que lo observado en la mayoría de los trabajos precedentes, el sexo, la edad de presentación y el tamaño de las NM cutáneas no mostraron influencia en la supervivencia (3, 6, 77, 107). Sin embargo, el tamaño y la edad se han citado como determinantes de supervivencia en un estudio reciente (17).

En las NM orales, sólo el tamaño de la neoplasia se mostró asociado con la supervivencia de los pacientes. De acuerdo con nuestros resultados, un tamaño de la neoplasia superior a los 3 cm ejercería una influencia negativa sobre la supervivencia. Los resultados encontrados al respecto en la bibliografía son contradictorios (3, 17, 76, 78, 114, 160).

En lo que respecta a las características microscópicas, la presencia de actividad en la UDE en nuestro estudio afectó positivamente la supervivencia en las NM cutáneas. El valor pronóstico de esta característica ha sido escasamente evaluado en las NM. Los estudios existentes la han relacionado en forma positiva, pero también negativa, con la

supervivencia de los pacientes con NM cutáneas (17 y 83). La asociación entre la presencia de la actividad en la UDE y un comportamiento menos agresivo en las NM caninas presenta similitudes con lo que sucede con el melanoma extensivo superficial y el melanoma nodular en el hombre. Este último carece de un componente dermoepidérmico y presenta un pronóstico menos favorable que el melanoma extensivo superficial, el cual se localiza en la zona de la unión dermoepidérmica.

La mayor parte de los autores coincide en afirmar que el índice mitótico en las NM cutáneas es el criterio histológico que mejor se relaciona con el comportamiento de las mismas (6, 16, 17, 23, 76, 83). En coincidencia con ello, el hallazgo de tres o más mitosis en diez CMA se relacionó con una supervivencia menor en nuestro estudio y viceversa. Si bien la mayoría de los melanomas cutáneos exhibió más de 3 mitosis cada diez CMA, algunos de ellos, a pesar de contar con un índice mitótico menor, fueron clasificados como tales debido, fundamentalmente, al marcado grado de atipía celular. La mayor parte de estos últimos exhibió, sin embargo, comportamiento benigno. Ello demuestra que el índice mitótico podría ser considerado el mejor indicador pronóstico entre los hasta aquí analizados, dado que permitiría predecir el resultado de la enfermedad en forma más precisa que el diagnóstico histopatológico, vistas las discrepancias entre este último y el pronóstico en algunos casos. Igualmente, no debe descartarse la posibilidad de que parte de las discrepancias entre el aspecto histológico de las NM y su evolución se deban a que muchos de los pacientes con NM malignas experimentaron la curación de la neoplasia maligna después del tratamiento quirúrgico.

En las NM orales, en coincidencia con lo comunicado por otros autores, el hallazgo de 3 mitosis o más cada diez CMA no resultó de valor pronóstico (15, 76, 114). Existen evidencias de que el índice mitótico, aunque con valores de corte superiores a tres, puede utilizarse en la predicción de la supervivencia en estas neoplasias (17, 82, 84).

Tal como ha sido visto en trabajos precedentes, el tipo celular predominante no influyó en la supervivencia de los pacientes con NM cutáneas y orales (3, 6, 15, 76, 113). Al igual que en un estudio realizado por Bostock, sólo llamó la atención la mayor proporción de pacientes con supervivencia intermedia-corta observada en pacientes con NM cutáneas de células epitelioideas (76). Casualmente, las NM cutáneas de células epitelioideas exhibieron índices mitóticos altos con mayor frecuencia que los demás tipos celulares.

En lo que respecta al grado de melanización, casi el 100% de los pacientes con NM con melanización de grado 4 mostró un pronóstico favorable. Algunos autores han relacionado la melanización intensa en las NM con un pronóstico favorable (76, 78), pero este criterio sigue siendo discutido. Sorprendentemente, observamos el efecto opuesto en las NM orales; el 100% de los pacientes con NM con melanización de grado 4 murió por causas relacionadas con la enfermedad. Muy recientemente, se ha relacionado al hallazgo de grados altos de melanización con un pronóstico desfavorable en el caso particular de melanomas orales (84).

Vimentina, proteína S100, melan A

En lo que respecta a la determinación de posibles marcadores inmunohistoquímicos cualitativos relacionados con el pronóstico de las NM, sólo la

expresión de melan A se asoció con la supervivencia de los pacientes en nuestro estudio. El patrón de IM polar de melan A mostró una influencia negativa en la supervivencia de los pacientes con NM cutáneas. Cabe notar que no hemos encontrado información al respecto en la bibliografía. Un hallazgo curioso, aunque no significativo, fue que cerca del 100% de los pacientes con supervivencia larga exhibieron una IM fuerte de melan A. En coincidencia con ello, el potencial pronóstico de melan A en las NM caninas fue sugerido por Koenig y col., dado que estos autores detectaron una asociación positiva entre la intensidad de marcación de melan A y el comportamiento benigno de las NM (39). Cabe interpretar con cautela estos resultados ya que la cantidad de casos analizada en ambos estudios fue reducida.

Desafortunadamente, ninguna de las relaciones observadas entre la IM de la melan A y el pronóstico se repitió en las NM orales.

IP-PCNA e IP- Ki67

En lo que respecta a los estudios de proliferación celular, el IP-PCNA resultó de valor pronóstico en las NM cutáneas y el IP-Ki67 en las NM orales. Si bien se detectaron IP-PCNA y IP-Ki67 más elevados en los pacientes con supervivencia intermedia-corta, tanto en las NM cutáneas como en las orales, las diferencias entre los grupos de supervivencia no fueron significativas, lo que podría deberse al tamaño muestral insuficiente para poner en evidencia diferencias no muy marcadas. Esto último resulta más probable aún para el caso de las NM cutáneas en las que el IP-Ki67 se mostró significativamente asociado al índice mitótico, el cual demostró estar fuertemente relacionado con el pronóstico en estas neoplasias.

Los valores del IP-PCNA en las NM cutáneas, así como del IP-Ki67 en las NM orales, casi duplicaron el valor correspondiente a los casos con supervivencia larga. Los pacientes con NM cutáneas con IP-PCNA menores a 50 mostraron una supervivencia significativamente superior respecto de aquellos con IP-PCNA superiores a 50. Algo similar sucedió con las NM orales, en las que se halló una probabilidad de supervivencia claramente mayor en aquellos pacientes cuyas neoplasias mostraron un IP-Ki67 menor o igual a 7.

Al contrario de lo observado en nuestro estudio, el único trabajo precedente que analizó la IM de PCNA en NM caninas no atribuyó significación pronóstica a este último. Resulta complejo comparar nuestros hallazgos con los del mencionado estudio, dado que los autores no diferenciaron entre NM cutáneas y orales. Lo mismo sucedió con una parte de los trabajos que analizó la expresión de Ki67 en las NM caninas (6, 77). Sin embargo, algunos de estudios han correlacionado al IP-Ki67 con el comportamiento de las NM cutáneas (83) y orales (82, 84). Considerando estos resultados, cabe contemplar la posibilidad de que el aumento del tamaño muestral en futuras investigaciones permita detectar las diferencias poco marcadas en el IP- Ki67 observadas en nuestro estudio entre los distintos grupos de supervivencia en las NM cutáneas.

AE y DMV

Con respecto al estudio de la vascularización en las NM, en contraposición a lo observado por Mukaratirwa y col., el tiempo de supervivencia de los pacientes resultó independiente del AE y la DMV estimadas mediante la IM del factor de von Willebrand en nuestro estudio (104). Este hallazgo no fue sorprendente dado que, en melanomas

humanos y en algunas neoplasias caninas, tampoco ha sido posible atribuir un rol pronóstico a la densidad de microvasos (95, 99, 100). Para la interpretación de la ausencia de relación del AE y de la DMV con la supervivencia de los pacientes con NM en nuestro estudio cabe tener en cuenta una serie de aspectos. Si bien la inmunomarcación endotelial obtenida con el factor de von Willebrand fue apropiada para su cuantificación, se observaron algunos pequeños vasos negativos, hecho que también ha sido visto por otros autores (93). Asimismo, el factor de von Willebrand es un marcador “panendotelial”, de modo que no sólo reacciona con células endoteliales proliferantes o activadas, sino también con vasos sanguíneos quiescentes, aportando una estimación del estatus vascular y no tanto del estatus angiogénico de las neoplasias. Es probable que la utilización de marcadores que detecten selectivamente células endoteliales activadas aporten una medida más precisa de la angiogénesis y, por ende, de la agresividad tumoral (149). La superioridad de este tipo de marcadores sobre los clásicos “panendoteliales” ya ha sido comprobada en algunas neoplasias humanas (161, 162, 163, 164, 165). Por último, cabe tener en cuenta que la angiogénesis puede no ser el único mecanismo por el cual las neoplasias adquieren una microcirculación. La formación de canales vasculares por células tumorales genéticamente desreguladas y agresivas se denominó “mímica vasculogénica”, a los efectos de enfatizar su génesis “*de novo*”, sin la participación de células endoteliales y en forma independiente de la angiogénesis (166). Este proceso fue descrito por primera vez en melanoma humano y aún no ha sido investigado en las NM caninas (167).

CONCLUSIONES

- Las NM cutáneas son más frecuentes que las NM orales.
- No existe predilección por sexo.
- Melanocitomas y melanomas son igualmente frecuentes en la piel, no así en la mucosa oral, en la que prácticamente todas las NM son melanomas.
- El 3% de las NM presenta características histológicas “intermedias” entre melanocitomas y melanomas, por lo que se requiere de la inmunohistoquímica para su clasificación.
- La actividad en la UDE es más frecuente en melanocitomas que en melanomas.
- La melanización escasa o ausente se observa con mayor frecuencia en melanomas orales, seguidos por los melanomas cutáneos.
- En las NM cutáneas existe una relación inversa entre la melanización y el índice mitótico, no así en las NM orales.
- La vimentina es un marcador útil en las instancias iniciales de la clasificación de las NM poco diferenciadas. Es altamente sensible y de interpretación sencilla. Su IM es independiente del tipo celular y del grado de melanización.
- La proteína S100 es un marcador altamente sensible, especialmente útil para la identificación de NM amelánicas. Su IM es de intensidad moderada a fuerte en la mayoría de los casos, independientemente del grado de melanización.
- La IM de vimentina y proteína S100 no resulta de ayuda en la diferenciación entre NM benignas y malignas.

- La sensibilidad de melan A en las NM es inversa al grado de melanización, por lo que su utilidad en la identificación de NM amelánicas es limitada. Su aplicación permite confirmar el diagnóstico en menos de la mitad de los casos.
- En las NM cutáneas, la IM de melan A puede ayudar en la diferenciación entre melanocitomas y melanomas.
- El anticuerpo tirosinasa empleado en este estudio carece de utilidad en el diagnóstico de las NM caninas.
- El IP-PCNA y el IP-Ki67 carecen de utilidad en la diferenciación entre melanocitomas y melanomas cutáneos.
- El IP-PCNA y el IP-Ki67 se relacionan con el índice mitótico en las NM cutáneas.
- La utilidad de Ki67 (MIB-1) en las NM caninas se limita al 75% de los casos. El 25% restante no muestra reactividad con el citado marcador.
- El AE y la DMV son más elevados en las NM malignas, por lo que pueden contribuir a la diferenciación entre melanocitomas y melanomas cutáneos.
- No existe una relación clara entre la proliferación celular y la vascularización en las NM caninas.
- El anticuerpo MMP-2 empleado en este trabajo carece de utilidad en las NM caninas.
- El 75% de las NM cutáneas presenta un comportamiento benigno luego de la exéresis quirúrgica.

- Las NM cutáneas histológicamente benignas se comportan como tales.
- La probabilidad de supervivencia al año de los pacientes con melanoma cutáneo es superior al 60%; aproximadamente el 50% de los melanomas cutáneos suele mostrar un comportamiento benigno luego de la exéresis quirúrgica.
- En las NM orales, la muerte relacionada con la neoplasia dentro de los 6 meses posteriores al diagnóstico es frecuente y la probabilidad de supervivencia al año es inferior al 40%. Sin embargo, una parte de los pacientes con melanoma oral suele mantenerse libre de la enfermedad durante, al menos, un año después de formulado el diagnóstico.
- En las NM cutáneas, la localización de la neoplasia, la ulceración, la actividad en la UDE, el índice mitótico, el patrón citoplasmático de la IM de melan A y el IP-PCNA son parámetros de valor pronóstico.
- El índice mitótico es la variable que mejor se correlaciona con el comportamiento de las NM cutáneas; el hallazgo de 3 o más mitosis en 10 CMA es indicativo de malignidad.
- En las NM orales, sólo el tamaño de la neoplasia y el IP-Ki67 son parámetros de valor pronóstico.
- La vascularización no reviste importancia pronóstica en las NM.

BIBLIOGRAFÍA

1. Knapp DW, Waters DJ. Naturally occurring cancer in pet dogs: important models for developing improved cancer therapy for humans. *Mol Med Today*. 1997; 3:8-11.
2. Goldschmidt MH, Hendrick MJ. Tumors of the Skin and Soft Tissues. En: Meuten DJ, editor. *Tumors in Domestic Animals*. 4th ed. Iowa: Iowa State Press; 2000. p. 78-83.
3. Smith SH, Goldschmidt MH, McManus PM. A comparative review of melanocytic neoplasms. *Vet Pathol*. 2002; 39: 651-678.
4. Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2002 [Internet]. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2005 [updated 2007 sept 19; cited 2011 april 13]. Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2002/.
5. Altekruse SF, Kosary CL, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007 [Internet] Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2010 [updated 2011 jan 7; cited 2011 april 13]. Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/.
6. 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.

7. Sulaimon SS, Kitchell BE. The basic biology of malignant melanoma: molecular mechanisms of disease progression and comparative aspects. *J Vet Intern Med.* 2003; 17(6): 760-772.
8. Modiano JF, Ritt MG, Wojcieszyn J. The molecular basis of canine melanoma: pathogenesis and trends in diagnosis and therapy. *J Vet Intern Med.* 1999;3(3):163-174.
9. Koenig A, Bianco SR, Fosmire S, Wojcieszyn J, Modiano JF. Expression and significance of p53, rb, p21/waf-1, p16/ink-4a, and PTEN tumor suppressors in canine melanoma. *Vet Pathol.* 2002;39(4):458-472.
10. Roels S, Tilmant K, Ducatelle R. p53 expression and apoptosis in melanomas of dogs and cats. *Res Vet Sci.* 2001;70:19-25.
11. Watzinger F, Mayr B, Gamerith R, Vetter C, Lion T. Comparative analysis of ras proto-oncogene mutations in selected mammalian tumors. *Mol Carcinog.* 2001;30(4):190-198.
12. Ahern TE, Bird RC, Bird AE, Wolfe LG. Overexpression of c-erbB-2 and c-myc but not c-ras, in canine melanoma cell lines, is associated with metastatic potential in nude mice. *Anticancer Res.* 1993;13(5A):1365-1371.
13. Ritt MG, Mayor J, Wojcieszyn J, Smith R, Barton CL, Modiano JF. Sustained nuclear localization of p21/WAF-1 upon growth arrest induced by contact inhibition. *Cancer Lett.* 2000;158(1):73-84.

14. Pulley LT, Stannard AA: Tumors of the skin and soft tissues. En: Moulton JE (ed): Tumors in Domestic Animals. 3rd ed. California: University of California Press; 1990. p. 75-82.
15. 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.
16. Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter VK. Skin Diseases of the Dog and Cat. Clinical and Histopathologic Diagnosis. 2nd ed. Iowa: Blackwell Science; 2005.
17. Spangler WL, Kass PH. The histologic and epidemiologic bases for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia. *Vet Pathol.* 2006;43:136-149.
18. Head KW, Else RW, Dubielzig RR. Tumors of the Alimentary Tract. En: Meuten DJ, editor. Tumors in Domestic Animals. 4th ed. Iowa: Iowa State Press; 2002. p. 427-430.
19. Cuitiño MC, Massone AR, Quiroga MA, Broglia GC, Caggiano NC, Guido N y col. Neoplasias cutáneas en caninos: estudio retrospectivo 2006-2009. Presentado en sesión de posters en: Primer Congreso de la Sociedad Argentina de Dermatología Veterinaria; octubre de 2010; Rosario.
20. Todoroff RJ, Brodey RS. Oral and pharyngeal neoplasia in the dog: a retrospective survey of 361 cases. *J Am Vet Med Assoc.* 1979;175(6):567-571.

21. Head KW, Cullen JM, Else RW, Dubielzig RR, Misdorp W, Patnaik AK, et al, editors. WHO International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. Second Series, Vol. X, Tumors of the alimentary system. Washington (USA): AFIP; 2003. 33p.
22. Ginn PE, Mansell JEKL, Rakich PM. Skin and Appendages. En: Maxie MG, editor. Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N. Pathology of Domestic Animals. Vol 3, 5th Ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2007. p. 759-761.
23. Goldschmidt MH, Dunstan RW, Stannard AA, von Tscharner C, Walder EJ, Yager JA, editors. WHO International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. Second Series, Vol. II, Epithelial and melanocytic tumors of the skin. Washington (USA): AFIP; 1998. 38p.
24. Wilcock B, Dubielzig RR, Render JA, editors. WHO International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. Second Series, Vol. IX, Ocular and otic tumors. Washington (USA): AFIP; 2002. 14p.
25. Ivan D, Prieto VG. Use of immunohistochemistry in the diagnosis of melanocytic lesions: applications and pitfalls. *Am J Dermatopathol.* 2010;32(8):809-814.
26. Perniciaro C. Dermatopathologic variants of malignant melanoma. *Mayo Clin Proc.* 1997;72(3):273–279.
27. Ohsie SJ, Sarantopoulos GP, Cochran AJ, Binder SW. Immunohistochemical characteristics of melanoma. *J Cutan Pathol.* 2008;35(5):433-444.

28. Ruiter DJ, van Dijk MC, Ferrier CM. Current diagnostic problems in melanoma pathology. *Semin Cutan Med Surg.* 2003;22(1):33-41.
29. Wick MR. Immunohistochemical approaches to the diagnosis of undifferentiated malignant tumors. *Ann Diagn Pathol.* 2008;12(1):72-84.
30. Anderson GG, Weiss LM. Determining tissue of origin for metastatic cancers: meta-analysis and literature review of immunohistochemistry performance. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2010;18(1):3-8.
31. Rabanal RH, Fondevila DM, Montane V, Domingo M, Ferrer L. Immunocytochemical diagnosis of skin tumours of the dog with special reference to undifferentiated types. *Res Vet Sci.* 1989; 47:129-133.
32. Höinghaus R, Hewicker-Trautwein M, Mischke R. Immunocytochemical differentiation of canine mesenchymal tumors in cytologic imprint preparations. *Vet Clin Pathol.* 2008;37(1):104-111.
33. Sheffield MV, Yee H, Dorvault CC, Weilbaecher KN, Eltoum IA, Siegal GP, et al. Comparison of five antibodies as markers in the diagnosis of melanoma in cytologic preparations. *Am J Clin Pathol.* 2002; 118: 930-936.
34. de Wit NJ, van Muijen GN, Ruiter DJ. Immunohistochemistry in melanocytic proliferative lesions. *Histopathology.* 2004;44(6):517-541.
35. Quatresooz P, Pierard-Franchimont C, Pierard GE. Molecular histology on the diagnostic cutting edge between malignant melanomas and cutaneous melanocytomas. *Oncol Rep.* 2009;22(6):1263-1267.

36. Rhind SM. Veterinary oncological pathology: current and future perspectives. *Vet J.* 2002;163(1):7-18.
37. Baumal R, Kahn HJ, Marks A. Role of antibody to S100 protein in diagnostic pathology. *Lab Invest.* 1988;59(1):152-154.
38. Iwanaga T, Takahashi Y, Fujita T. Immunohistochemistry of neuron-specific and glia-specific proteins. *Arch Histol Cytol.* 1989;52:13-24.
39. Koenig A, Wojcieszyn J, Weeks BR, Modiano JF. 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.* 2001; 38: 427-435.
40. 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.* 2000;32:475-481.
41. Busam KJ. Cutaneous desmoplastic melanoma. *Adv Anat Pathol.* 2005;12(2):92-102.
42. Busam KJ, Iversen K, Coplan KC, Jungbluth AA. Analysis of microphthalmia transcription factor expression in normal tissues and tumors, and comparison of its expression with S-100 protein, gp100, and tyrosinase in desmoplastic malignant melanoma. *Am J Surg Pathol.* 2001;25(2):197-204.

43. El Tal AK, Abrou AE, Stiff MA, Mehregan DA. Immunostaining in Mohs micrographic surgery: a review. *Dermatol Surg.* 2010;36(3):275-290.
44. Jungbluth AA. Serological reagents for the immunohistochemical analysis of melanoma metastases in sentinel lymph nodes. *Semin Diagn Pathol.* 2008;25(2):120-125.
45. Sandusky GE, Carlton WW, Wightman KA. Diagnostic immunohistochemistry of canine round cell tumors. *Vet Pathol.* 1987;24(6):495-499.
46. Schaumburg-Lever G, Metzler G, Kaiserling E. Ultrastructural localization of HMB-45 binding sites. *Cutaneous Pathol.* 1991;28:432-435.
47. Yaziji H, Grown AM. Immunohistochemical markers of melanocytic tumors. *Inter J Surg Pathol.* 2003; 11:11-15.
48. Rothberg BE, Moeder CB, Kluger H, Halaban R, Elder DE, Murphy GF, et al. Nuclear to non-nuclear Pmel17/gp100 expression (HMB45 staining) as a discriminator between benign and malignant melanocytic lesions. *Mod Pathol.* 2008;21(9):1121-1129.
49. Sulaimon S, Kitchell B, Ehrhart E. Immunohistochemical detection of melanoma-specific antigens in spontaneous canine melanoma. *J Comp Pathol.* 2002;127(2-3):162-168.

50. Coulie PG, Brichard V, Van Pel A, et al. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med.* 1994; 180: 35-42.
51. Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, et al. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91: 3515-3519.
52. Marincola FM, Hijazi YM, Fetsch P, Salgaller ML, Rivoltini L, Cormier J, et al. Analysis of expression of the melanoma-associated antigens MART-1 and gp100 in metastatic melanoma cell lines and in in situ lesions. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol.* 1996;19(3):192-205.
53. Busam KJ, Chen YT, Old LJ, Stockert E, Iversen K, Coplan KA, et al. Expression of melan-A (MART1) in benign melanocytic nevi and primary cutaneous malignant melanoma. *Am J Surg Pathol.* 1998;22(8):976-82.
54. Busam KJ, Jungbluth AA. Melan-A, a new melanocytic differentiation marker. *Adv Anat Pathol.* 1999;6(1):12-18.
55. Jungbluth AA, Busam KJ, Gerald WL, Stockert E, Coplan KA, Iversen K et al. A103: An anti-melan-a monoclonal antibody for the detection of malignant melanoma in paraffin-embedded tissues. *Am J Surg Pathol.* 1999; 23:607-610.
56. Busam KJ. The use and application of special techniques in assessing melanocytic tumours. *Pathology.* 2004;36(5):462-469.

57. Cangul IT, van Garderen E, van der Linde-Sipman JS, van den Ingh TS, Schalken JA. Canine balloon and signet-ring cell melanomas: a histological and immunohistochemical characterization. *J Comp Pathol.* 2001;125(2-3):166-173.
58. Choi C, Kusewitt DF. Comparison of tyrosinase-related protein-2, S-100, and Melan A immunoreactivity in canine amelanotic melanomas. *Vet Pathol.* 2003;40(6):713-718.
59. Giudice C, Ceciliani F, Rondena M, Stefanello D, Grieco V. Immunohistochemical investigation of PNL2 reactivity of canine melanocytic neoplasms and comparison with Melan A. *J Vet Diagn Invest.* 2010;22(3):389-394.
60. Smedley RC, Lamoureux J, Sledge DG, Kiupel M. Immunohistochemical diagnosis of canine oral amelanotic melanocytic neoplasms. *Vet Pathol.* 2011;48(1):32-40.
61. Ramos-Vara JA, Miller MA. Immunohistochemical identification of canine melanocytic neoplasms with antibodies to melanocytic antigen PNL2 and tyrosinase: comparison with melan A. *Vet Pathol.* 2010; 48(2):443-450.
62. Orlow SJ, Silvers WK, Zhou BK, Mintz B. Comparative decreases in tyrosinase, TRP-1, TRP-2, and Pmel 17/silver antigenic proteins from melanotic to amelanotic stages of syngeneic mouse cutaneous melanomas and metastases. *Cancer Res.* 1998;58(7):1521-1523.

63. King R, Weilbaecher KN, McGill G, Cooley E, Mihm M, Fisher DE. Microphthalmia transcription factor. A sensitive and specific melanocyte marker for Melanoma Diagnosis. *Am J Pathol.* 1999;155(3):731-738.
64. King R, Googe PB, Weilbaecher KN, Mihm MC Jr, Fisher DE. Microphthalmia transcription factor expression in cutaneous benign, malignant melanocytic, and nonmelanocytic tumors. *Am J Surg Pathol.* 2001;25(1):51-57.
65. Granter SR, Weilbaecher KN, Quigley C, Fletcher CD, Fisher DE. Microphthalmia transcription factor: not a sensitive or specific marker for the diagnosis of desmoplastic melanoma and spindle cell (non-desmoplastic) melanoma. *Am J Dermatopathol.* 2001;23(3):185-189.
66. Busam KJ, Iversen K, Coplan KC, Jungbluth AA. Analysis of microphthalmia transcription factor expression in normal tissues and tumors, and comparison of its expression with S-100 protein, gp100, and tyrosinase in desmoplastic malignant melanoma. *Am J Surg Pathol.* 2001;25(2):197-204.
67. Rochaix P, Lacroix-Triki M, Lamant L, Pichereaux C, Valmary S, Puente E, et al. PNL2, a new monoclonal antibody directed against a fixative-resistant melanocyte antigen. *Mod Pathol.* 2003;16(5):481-490.
68. Akutsu Y, Jimbow K. Development and characterization of a mouse monoclonal antibody, MoAb HMSA-1, against a melanosomal fraction of human malignant melanoma. *Cancer Res.* 1986; 46:2904-2911.

69. Jimbow K, Lee SK, King MG, Hara H, Chen H, Dakor J, et al. Melanin pigments and melanosomal proteins as differentiation markers unique to normal and neoplastic melanocytes. *J Investigative Dermatol.* 1993; 93:259-268.
70. Thomson W, MacKie RM. Comparison of five antimelanoma antibodies for identification of melanocytic cells on tissue sections in routine dermatopathology. *J Am Acad Dermatol.* 1989;21(6):1280-1284.
71. Berrington AJ, Jimbow K, Haines DM. Immunohistochemical detection of melanoma-associated antigens on formalin-fixed, paraffin-embedded canine tumors. *Vet Pathol.* 1994;31(4):455-461.
72. Oliver JL, Wolfe LG. Antigen expression in canine tissues, recognized by a monoclonal antibody generated against canine melanoma cells. *Am J Vet Res.* 1992; 53:123-128.
73. Abdou AG, Hammam MA, Farargy SE, Farag AG, El Shafey EN, Farouk S et al. Diagnostic and prognostic role of galectin 3 expression in cutaneous melanoma. *Am J Dermatopathol.* 2010;32(8):809-814.
74. Salazar-Onfray F, López M, Lundqvist A, Aguirre A, Escobar A, Serrano A, et al. Tissue distribution and differential expression of melanocortin 1 receptor, a malignant melanoma marker. *Br J Cancer.* 2002;87(4):414-422.
75. Gambichler T, Shtern M, Rotterdam S, Bechara FG, Stücker M, Altmeyer P, et al. Minichromosome maintenance proteins are useful adjuncts to differentiate

between benign and malignant melanocytic skin lesions. *J Am Acad Dermatol.* 2009;60(5):808-813.

76. Bostock DE. Prognosis after surgical excision of canine melanomas. *Vet Pathol.* 1979;16(1):32-40.

77. Millanta F, Fratini F, Corazza M, Castagnaro M, Zappulli V, Poli A. Proliferation activity in oral and cutaneous canine melanocytic tumours: correlation with histological parameters, location, and clinical behaviour. *Res Vet Sci.* 2002;73(1):45-51.

78. Esplin DG. Survival of dogs following surgical excision of histologically well-differentiated melanocytic neoplasms of the mucous membranes of the lips and oral cavity. *Vet Pathol.* 2008; 45:889-896.

79. Mukaratirwa S. Prognostic and predictive markers in canine tumours: rationale and relevance. A review. *Vet Q.* 2005;27:52-64.

80. Maga G, Hubscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci.* 2003; 116:3051-3060.

81. Li LL, Crotty KA, McCarthy SW, Palmer AA, Kril JJ. A zonal comparison of MIB1-Ki67 immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions. *Am J of Dermatopathol.* 2000; 22:489-495.

82. Sánchez J, Ramírez GA, Buendia AJ, Vilafranca M, Martínez CM, Altimira J, et al. Immunohistochemical characterization and evaluation of prognostic factors

in canine oral melanomas with osteochondrogenic differentiation. *Vet Pathol.* 2007;44(5):676-682.

83. Laprie C, Abadie J, Amardeilh MF, Net JL, Lagadic M, Delverdier M. MIB-1 immunoreactivity correlates with biologic behaviour in canine cutaneous melanoma. *Vet Dermatol.* 2001;12(3):139-147.

84. Bergin IL, Smedley RC, Esplin DG, Spangler WL, Kiupel M. Prognostic evaluation of Ki67 threshold value in canine oral melanoma. *Vet Pathol.* 2011;48(1):41-53.

85. Hussein MR. The TP53 tumor suppressor gene and melanoma tumorigenesis: is there a relationship? *Tumour Biol.* 2004;25(4):200-207.

86. Hussein MR. The relationships between p53 protein expression and the clinicopathological features in the uveal melanomas. *Cancer Biol Ther.* 2005; 4:57-59.

87. Hofmann UB, Houben R, Brocker EB, Becker JC. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie.* 2005; 87:307-314.

88. Väisänen A, Kallioinen M, Taskinen PJ, Turpeenniemi-Hujanen T. Prognostic value of MMP-2 immunoreactive protein (72 kD type IV collagenase) in primary skin melanoma. *J Pathol.* 1998; 186:51-58.

89. Väisänen AH, Kallioinen M, Turpeenniemi-Hujanen T. Comparison of the prognostic value of matrix metalloproteinases 2 and 9 in cutaneous melanoma. *Hum Pathol.* 2008;39(3):377-385.

90. Hofmann UB, Westphal JR, Zendman AJ, Becker JC, Ruitter DJ, van Muijen GN. Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its co-localization with membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) correlate with melanoma progression. *J Pathol.* 2000;191:245-256.
91. Loukopoulos P, Mungall BA, Straw RC, Thornton JR, Robinson WF. Matrix metalloproteinase-2 and -9 involvement in canine tumors. *Vet Pathol.* 2003;40(4):382-394.
92. Hirayama K, Yokota H, Onai R, Kobayashi T, Kumata T, Kihara K, et al. Detection of matrix metalloproteinases in canine mammary tumours: analysis by immunohistochemistry and zymography. *J Comp Pathol.* 2002;127(4):249-256.
93. N. Weidner. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat.* 1995;36(2):169-80.
94. Kashani-Sabet M, Sagebiel RW, Ferreira CM, Nosrati M, Miller JR. Tumor vascularity in the prognostic assessment of primary cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2002; 20:1826-1831.
95. Busam KJ, Berwick M, Blessing K, Fandrey K, Kang S, Karaoli T, et al. Tumor vascularity is not a prognostic factor for malignant melanoma of the skin. *Am J Pathol.* 1995; 147:1049-1056.

96. Ribatti D, Ennas MG, Vacca A, Ferrel F, Nico B, Orru S, Sirigu P. Tumor vascularity and tryptase-positive mast cells correlate with a poor prognosis in melanoma. *Eur J Clin Invest.* 2003;33:420-425.
97. Pisacane AM, Risio M. VEGF and VEGFR-2 immunohistochemistry in human melanocytic naevi and cutaneous melanomas. *Melanoma Res.* 2005;15(1):39-43.
98. Demirkesen C, Büyükpınarbaşılı N, Ramazanoğlu R, Oğuz O, Mandel NM, Kaner G. The correlation of angiogenesis with metastasis in primary cutaneous melanoma: a comparative analysis of microvessel density, expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblastic growth factor. *Pathology.* 2006;38(2):132-137.
99. Carnochan P, Briggs JC, Westbury G, Davies AJ. The vascularity of cutaneous melanoma: a quantitative histological study of lesions 0.85-1.25 mm in thickness. *Br J Cancer.* 1991;64(1):102-107.
100. Diessler ME, Castellano MC, Portiansky EL, Burns SL, Idiart JR. Invasión vascular, expresión de receptor 2 del factor de crecimiento de endotelios vasculares (VEGFR-2) y densidad de microvasos en carcinomas mamarios. Valor pronóstico. *Ciencias Morfológicas* 2010 (en prensa).
101. Mederle O, Mederle N, Bocan EV, Ceaşu R, Raica M. VEGF expression in dog mastocytoma. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 2010;114:185-1888.

102. J Santos AA, Oliveira JT, Lopes CC, Amorim IF, Vicente CM, Gärtner FR, Matos AJ. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumours. *Comp Pathol.* 2010; 143(4):268-275.
103. Luong RH, Baer KE, Craft DM, Ettinger SN, Scase TJ, Bergman PJ. Prognostic significance of intratumoral microvessel density in canine soft-tissue sarcomas. *Vet Pathol.* 2006;43(5):622-631.
104. Mukaratirwa S, Chikafa L, Dliwayo R, Moyo N. Mast cells and angiogenesis in canine melanomas: malignancy and clinicopathological factors. *Vet Dermatol.* 2006;17(2):141-146.
105. Gould Rothberg BE, Rimm DL. Biomarkers: the useful and the not so useful; an assessment of molecular prognostic markers for cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol.* 2010;130(8):1971-1987.
106. Leme MB, Waitzberg AF, Artigiani Neto R, Linhares MM, Matos D. Assessment of angiogenesis expression and its relationship with prognosis of colorectal cancer by conventional and computer-assisted histopathological image analysis. *Acta Cir Bras.* 2006;21:392-397.
107. Schultheiss PC. Histologic features and clinical outcomes of melanomas of lip, haired skin, and nail bed locations of dogs. *J Vet Diagn Invest.* 2006;18(4):422-425.

108. Bolon B, Calderwood Mays MB, Hall BJ. Characteristics of canine melanomas and comparison of histology and DNA ploidy to their biologic behavior. *Vet Pathol.* 1990;27(2):96-102.
109. Goldschmidt MH, Shofer FS. *Skin Tumors of the Dog and Cat.* New York: Pergamon Press, 1992.
110. Arnesen K, Gamlem H, Glattre E, Grondalen J, Moe L, Nordstoga K. The Norwegian canine cancer register 1990-1998. Report from de project "cancer in the dog". *Norks Veterinaertidsskrift.* 2000;112(3):137-147.
111. Hernández SZ, Negro VB, Duchene A, Cattaneo ML. Neoplasias orales en caninos: Descripción epidemiológica de 73 casos. *InVet.* 1999; 1: 61-66.
112. Conroy JD. Melanocytic tumors of domestic animals with special reference to dogs. *Arch Dermatol.* 1967;96(4):372-380.
113. Aronsohn, M. G.; Carpenter, J. L. Distal extremity melanocytic nevi and malignant melanomas in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1990; 26 (6): 605-612.
114. Harvey HJ, MacEwen EG, Braun D, Patnaik AK, Withrow SJ, Jongeward S. Prognostic criteria for dogs with oral melanoma. *J Am Vet Med Assoc.* 1981;178(6):580-582.
115. Bergman PJ. Canine oral melanoma. *Clin Tech Small Anim Pract.* 2007;22(2):55-60.

116. Farmer ER, Gonin R, Hanna MP. Discordance in the histopathologic diagnosis of melanoma and melanocytic nevi between expert pathologists. *Hum Pathol.* 1996;27(6):528-531.
117. Piris A, Mihm MC Jr. Progress in melanoma histopathology and diagnosis. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009;23(3):467-480.
118. Cuitiño MC; Massone AR.; Risso MA.; Idiart JR. Expression of nuclear cell proliferating antigen (PCNA) as criterion for differentiation between benign and malignant melanocytic tumors in dogs. *Biocell.* 2006; 30 (3): 508 (Abstract).
119. Gambichler T, Shtern M, Rotterdam S, Bechara FG, Stücker M, Altmeyer P, Kreuter A. Minichromosome maintenance proteins are useful adjuncts to differentiate between benign and malignant melanocytic skin lesions. *J Am Acad Dermatol.* 2009;60(5):808-813.
120. Chung LS, Man YG, Lupton GP. WT-1 expression in a spectrum of melanocytic lesions: Implication for differential diagnosis. *J Cancer.* 2010;1:120-125.
121. Nakajima T, Watanabe S, Sato Y, Kameya T, Shimosato Y, Ishihara K. Immunohistochemical demonstration of S100 protein in malignant melanoma and pigmented nevus, and its diagnostic application. *Cancer.* 1982;50(5):912-918.
122. Valcayo Peñalba AM. La proteína S100 en los tumores melanocíticos de la piel [tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 1993.

123. Kaufmann O, Koch S, Burghardt J, Audring H, Dietel M Kaufmann O, et al. Tyrosinase, melan-A, and KBA62 as markers for the immunohistochemical identification of metastatic amelanotic melanomas on paraffin sections. *Mod Pathol.* 1998; 11:740-746.
124. Berset M, Cerottini JP, Guggisberg D, Romero P, Burri F, Rimoldi D, et al. Expression of Melan-A/MART-1 antigen as a prognostic factor in primary cutaneous melanoma. *Int J Cancer.* 2001;95(1):73-77.
125. D'Souza S, Rimoldi D, Lénard D, Lejeune F, Cerottini JC, Romero P. Circulating Melan-A/Mart-1 specific cytolytic T lymphocyte precursors in HLA-A2+ melanoma patients have a memory phenotype. *Int J Cancer.* 1998;78(6):699-706.
126. Vilches-Moure J, Ramos-Vara J. Comparison of rabbit monoclonal and mouse monoclonal antibodies in immunohistochemistry in canine tissues. *J Vet Diagn Invest.* 2005;17:346-350.
127. McCormick D, Hall PA. The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology.* 1992;21(6):591-594.
128. Ishikawa K, Sakai H, Hosoi M, Yanai T, Masegi T. Evaluation of cell proliferation in canine tumors by the bromodeoxyuridine labeling method, immunostaining of Ki-67 antigen and proliferating cell nuclear antigen. *J Toxicol Pathol.* 2006;19(3):123-127.

129. Leong AS, Vinyuvat S, Suthipintawong C, Milios J. A comparative study of cell proliferation markers in breast carcinomas. *Clin Mol Pathol*. 1995;48(2):M83-M87.
130. Scott RJ, Hall PA, Haldane JS, van Noorden S, Price Y, Lane DP, Wright NA. A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. *J Pathol*. 1991;165(2):173-178.
131. Coltrera M, Skelly M, Gown AM. Anti-PCNA antibody PC10 yields unreliable proliferation indexes in routinely processed, deparaffinized, formalin-fixed tissue. *Appl Immunohistochem*. 1994; 1:193-200.
132. Ben-Izhak O, Bar-Chana M, Sussman L, Dobiner V, Sandbank J, Cagnano M, et al. Ki67 antigen and PCNA proliferation markers predict survival in anorectal malignant melanoma. *Histopathology*. 2002;41(6):519-525.
133. Bruno S, Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif*. 1992;25(1):31-40.
134. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 1984;133(4):1710-1715.
135. Lohmann CM, Iversen K, Jungbluth AA, Berwick M, Busam KJ. Expression of melanocyte differentiation antigens and ki-67 in nodal nevi and comparison of ki-

- 67 expression with metastatic melanoma. *Am J Surg Pathol.* 2002;26(10):1351-1357.
136. du Manoir S, Guillaud P, Camus E, Seigneurin D, Brugal G. Ki-67 labeling in postmitotic cells defines different Ki-67 pathways within the 2c compartment. *Cytometry.* 1991;12(5):455-463.
137. Hall PA, Levison DA. Review: assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol.* 1990;43(3):184-192.
138. Nowak M, Madej JA, Dziegiel P. Expression of E-cadherin, beta-catenin and Ki-67 antigen and their reciprocal relationships in mammary adenocarcinomas in bitches. *Folia Histochem Cytobiol.* 2007;45(3):233-238.
139. Ilmonen S, Hernberg M, Pyrhönen S, Tarkkanen J, Asko-Seljavaara S. Ki-67, Bcl-2 and p53 expression in primary and metastatic melanoma. *Melanoma Res.* 2005;15(5):375-381.
140. Takahashi H, Strutton GM, Parsons PG. Determination of proliferating fractions in malignant melanomas by anti-PCNA/cyclin monoclonal antibody. *Histopathology.* 1991;18(3):221-227.
141. Leong AS. Quantitation in immunohistology: fact or fiction? A discussion of variables that influence results. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2004;12(1):1-7.

142. Taylor CR, Levenson RM. Quantification of immunohistochemistry: issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology*. 2006;49(4):411-424.
143. Leong TY, Cooper K, Leong AS. Immunohistology: past, present, and future. *Adv Anat Pathol*. 2010;17(6):404-418.
144. Leong AS, Leong TY. Standardization in immunohistology. *Methods Mol Biol*. 2011;724:37-68.
145. Nkoy FL, Hammond ME, Rees W, Belnap T, Rowley B, Catmull S, et al. Variable specimen handling affects hormone receptor test results in women with breast cancer: a large multihospital retrospective study. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134(4):606-612.
146. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM, et al. Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK). *J Natl Cancer Inst*. 2005;97:1180-1184.
147. Alonso SR, Ortiz P, Pollán M, Pérez-Gómez B, Sánchez L, Acuña MJ, et al. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study. *Am J Pathol*. 2004;164(1):193-203.
148. Niezabitowski A, Czajewski K, Ryś J, Kruczak A, Gruchała A, Wasilewska A, et al. Prognostic evaluation of cutaneous malignant melanoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study. *J Surg Oncol*. 1999;70(3):150-160.

149. Hasan J, Byers R, Jayson GC. Intra-tumoural microvessel density in human solid tumours. *Br J Cancer*. 2000;86(10):1566-1577.
150. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer*. 1996;32A(14):2474-2484.
151. Simpson JF, Ahn C, Battifora H, Esteban JM. Endothelial area as a prognostic indicator for invasive breast carcinoma. *Cancer*. 1996;77(10):2077-2085.
152. Lee JS, Jung JJ, Kim J. Quantification of angiogenesis by a computerized image analysis system in renal cell carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol*. 2000;22(6):469-474.
153. Olewniczak S, Chosia M, Kołodziej B, Kwas A, Kram A, Domagała W. Angiogenesis as determined by computerised image analysis and the risk of early relapse in women with invasive ductal breast carcinoma. *Pol J Pathol*. 2003;54(1):53-59.
154. Kim NT, Elie N, Plancoulaine B, Herlin P, Coster M. An original approach for quantification of blood vessels on the whole tumour section. *Anal Cell Pathol*. 2003;25(2):63-75.

155. Vlems F, van der Worp E, van der Laak J, van der Velde C, Nagtegaal I, van Krieken H. A study into methodology and application of quantification of tumour vasculature in rectal cancer. *Virchows Arch.* 2004;445(3):263-270.
156. Barbareschi M, Gasparini G, Morelli L, Forti S, Dalla Palma P. Novel methods for the determination of the angiogenic activity of human tumors. *Breast Cancer Res Treat.* 1995;36(2):181-192.
157. Visscher DW, Smilanz S, Drozdowicz S, Wykes SM. Prognostic significance of image morphometric microvessel enumeration in breast carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol.* 1993;15(2):88-92.
158. Sevastre B, van Ederen AM, Terlouw M, Gruys E, Nederbragt H. Immunohistochemical expression of tenascin in melanocytic tumours of dogs. *J Comp Pathol.* 2007;136(1):49-56.
159. Frese K. Developmental studies on melanoma of the skin and mouth mucosa of dogs. *Vet Pathol.* 1978;15(4):461-473.
160. Hahn KA, DeNicolat DB, Richardson RC, Hahn EA. Canine oral malignant melanoma: Prognostic utility of an alternative staging system. *J Small Anim Pract.* 1994; 35:251-256.
161. Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J.* 2003;17(9):984-992.
162. Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, Kawano Y, Miyahara R, Li M, et al. Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between

- anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody. *Clin Cancer Res.* 2001;7(11):3410-3415.
163. Takase Y, Kai K, Masuda M, Akashi M, Tokunaga O. Endoglin (CD105) expression and angiogenesis status in small cell lung cancer. *Pathol Res Pract.* 2010;206(11):725-730.
164. Ziemssen F, Wegner R, Wegner J, Tatar O, Süsskind D, Gelisken F, et al. Analysis of neovasculature in uveal melanoma by targeting the TGFbeta-binding receptor endoglin: is there prognostic relevance of proliferating endothelium? *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2006;244(9):1124-1131.
165. Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, Kaiser HE. Immunocytochemical detection of endoglin is indicative of angiogenesis in malignant melanoma. *Anticancer Res.* 1998;18(4A):2701-2710.
166. Folberg R, Hendrix MJ, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol.* 2000 ;156(2):361-381.
167. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol.* 1999;155(3):739-752.
168. Cuitiño MC, Aralda C, Diaz LI. Efecto de la decoloración de la melanina en la inmunomarcación de neoplasias melanocíticas caninas. Presentado en sesión de posters en: XI Congreso Argentino de Ciencias Morfológicas, mayo de 2008, Córdoba.

169. Suthipintawong C, Leong AS, Vinyuvat S. Immunostaining of cell preparations: a comparative evaluation of common fixatives and protocols. *Diagn Cytopathol.* 1996;15(2):167-174.

ANEXOS

ANEXO I

TÉCNICA DE FONTANA-MASSON

- Desparafinar e hidratar
- Colocar en solución diaria de nitrato de plata (Fontana, anexo V) en horno a 37 °C durante 1 hora, o hasta que los cortes se tornen de color pardo claro.
- Realizar 3 enjuagues con agua destilada
- Colocar en la solución diaria de cloruro de oro durante 10 minutos (anexo V)
- Enjuagar con agua destilada
- Colocar en la solución de tiosulfato de sodio durante 5 minutos (anexo V)
- Enjuagar con agua destilada
- Contrastar con la solución de rojo nuclear resistente durante 5 minutos (anexo V)
- Enjuagar con agua destilada
- Deshidratar y montar

ANEXO II

TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA

La técnica aquí descrita fue empleada para todos los marcadores. Sólo se modificó la recuperación antigénica según el caso.

- Obtener y montar cortes de 5 μ m de espesor en portaobjetos con carga positiva
- Desparafinar mediante 2 pasajes por xilol, de 10 minutos cada uno
- Hidratar mediante 2 pasajes por alcohol 100°, de 5 minutos cada uno, 2 pasajes por alcohol 96°, de 3 minutos cada uno, 1 pasaje por alcohol 80°, de 3 minutos y 1 pasaje por alcohol 70°, de 3 minutos
- Lavar con PBS durante 10 minutos (anexo V)
- Bloquear la actividad de la peroxidasa endógena mediante la incubación con solución de peroxidasa durante 5 minutos (kit de detección LSAB2[®] System HRP, Dako)
- Proceder a la recuperación antigénica (ver métodos al final de este mismo anexo)
- Lavar con PBS durante 10 minutos
- Bloquear las uniones inespecíficas incubando con solución de leche descremada al 2,5% (anexo V) durante 40 minutos
- Volcar el exceso de leche
- Colocar el antisuero primario. Incubar durante toda la noche a 4° C
- Realizar 2 lavados con PBS, de 5 minutos cada uno
- Incubar con el anticuerpo biotinilado durante 15 minutos (kit de detección LSAB2[®] System HRP, Dako)

- Lavar con PBS durante 10 minutos
- Incubar con la solución de estreptavidina-peroxidasa durante 15 minutos (kit de detección LSAB2[®] System HRP, Dako)
- Lavar con PBS durante 10 minutos
- Incubar con solución de diaminobencidina (DAB) de 2 a 5 minutos (kit de detección LSAB2[®] System HRP, Dako)
- Lavar con agua destilada o agua corriente
- Proceder a la decoloración de la melanina mediante la técnica del agua oxigenada (anexo III)
- Realizar la coloración de contraste (hematoxilina de Gill)
- Hidratar y montar

Métodos de recuperación antigénica

Calor húmedo a presión atmosférica (“vaporiera”)

- Precalentar el buffer hasta que la temperatura alcance los 95-100 °C
- Colocar los portaobjetos en el buffer e incubar durante 20 a 40 minutos
- Retirar los portaobjetos y dejar enfriar a temperatura ambiente durante 20 minutos

Horno de microondas

- Colocar los portaobjetos en el buffer
- Realizar 4 ciclos de calentamiento de 2,5 minutos cada uno, a potencia máxima

- Dejar reposar unos minutos luego de cada ciclo y reponer el volumen de buffer perdido
- Retirar los portaobjetos y dejar enfriar a temperatura ambiente durante 20 minutos

Método enzimático: proteinasa K

- Precalentar la cámara húmeda en estufa a 37°C durante 10 minutos
- Colocar los portaobjetos en la cámara húmeda y cubrir los cortes con la solución de proteinasa K (100 ug/ml)
- Incubar en estufa a 37°C durante 40 minutos

Protocolos de recuperación antigénica utilizados en cada caso

Los protocolos que primero se evaluaron fueron, en todos los casos, los sugeridos por la bibliografía, aunque luego se aplicaron aquellos con los que se obtuvieron los mejores resultados en la inmunomarcación.

Vimentina y proteína S100

- Buffer de citrato (anexo V) en “vaporiera” durante 40 minutos

Melan A

- Buffer de tris-EDTA (anexo V) en “vaporiera” durante 20 minutos

Tirosinasa

- Buffer de citrato y buffer de tris-EDTA en “vaporiera” durante 30 minutos

- Buffer de tris-EDTA en horno de microondas (como se describió previamente)

PCNA

- Buffer de citrato (anexo V) en “vaporiera” durante 40 minutos

Ki67

- Buffer de tris-EDTA en horno de microondas (como se describió anteriormente)

Factor de von Willebrand

- Proteínasa K (tal como se describió anteriormente)

MMP-2

- Buffer de citrato en horno microondas, en 2 ciclos de 10 minutos cada uno
- Buffer de citrato en “vaporiera” durante 40 minutos

Cabe mencionar que, para algunos marcadores (melan A, tirosinasa), el buffer EDTA, pH 8 (anexo V) era el recomendado por la bibliografía para la recuperación antigénica. Si bien se evaluó la utilidad del mismo en este trabajo, se comprobó que los cortes perdían completamente la adherencia al portaobjetos antes de completar el tiempo recomendado para la recuperación antigénica, por lo que, finalmente, no fue utilizado.

ANEXO III

DECOLORACIÓN DE LA MELANINA: TÉCNICA DEL AGUA OXIGENADA

Se evaluó la utilidad de varias técnicas de decoloración, aplicadas antes y después de la inmunomarcación (168). La técnica aquí descrita proporcionó los mejores resultados. La misma se aplicó al finalizar la inmunomarcación, evitando así posibles interferencias en la inmunorreactividad.

- Sumergir los portaobjetos con los cortes de tejido a decolorar en una solución de agua oxigenada al 15% en PBS-Tween (anexo V)
- Incubar durante 48 horas a temperatura ambiente
- Lavar con abundante agua corriente, durante, por lo menos, 10 minutos

ANEXO IV

TÉCNICA DE INMUNOCITOQUÍMICA

Todos los pasos de la técnica se realizan a temperatura ambiente

- Secar los extendidos al aire durante 24 horas
- Fijar en solución de van der Griendt (anexo V) entre 2 y 48 horas
- Retirar de la solución salina y sumergir en alcohol 96° durante 10 minutos (*)
- Lavar con PBS durante 5 minutos
- Proceder a la recuperación antigénica
 - colocar los portaobjetos en el buffer de citrato
 - realizar 1 ciclo de calentamiento de 10 minutos, a potencia máxima
 - retirar el recipiente con los portaobjetos y dejar enfriar a temperatura ambiente durante 20 minutos
- Lavar con PBS durante 5 minutos
- Bloquear la actividad de la peroxidasa endógena mediante la incubación con solución de peroxidasa durante 5 minutos (kit de detección LSAB2[®] System HRP, Dako)
- Lavar con PBS durante 5 minutos
- Bloquear las uniones inespecíficas mediante incubación con suero equino durante 10 minutos (Vector Lab.)
- Volcar el exceso de suero
- Colocar el antisuero primario. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente
- Realizar 2 lavados con PBS, durante 5 minutos

- Incubar con el anticuerpo biotinilado durante 10 minutos (kit de detección LSAB2[®] System HRP, Dako)
- Lavar con PBS durante 5 minutos
- Incubar con la solución de estreptavidina-peroxidasa durante 10 minutos (kit de detección LSAB2[®] System HRP, Dako)
- Lavar con PBS durante 5 minutos
- Revelar mediante incubación con solución de diaminobencidina (DAB) de 2 a 5 minutos (kit de detección LSAB2[®] System HRP, Dako)
- Sumergir los cortes en PBS o en agua destilada
- Realizar la coloración de contraste (hematoxilina de Gill)
- Deshidratar y montar

(*) Siguiendo las recomendaciones de la bibliografía, luego de la fijación, los extendidos se conservaron hasta una semana a temperatura ambiente (169).

ANEXO V**SOLUCIONES UTILIZADAS****Solución de nitrato de plata al 10%**Nitrato de plata (NO_3Ag)----- 10 g

Agua destilada ----- 100 ml

Solución matriz de nitrato de plata de Fontana

Nitrato de plata 10% ----- 95 ml

Añadir hidróxido de amonio concentrado, gota a gota, hasta que el precipitado que se forma se aclare. Agregar nitrato de plata al 10%, gota a gota, hasta que la solución aparezca ligeramente turbia. Dejar reposar durante la noche antes de usarlo.

Solución diaria de nitrato de plata de Fontana

Solución matriz de nitrato de plata de Fontana----- 25 ml

Agua destilada ----- 75 ml

Filtrar antes de usar.

Solución matriz de cloruro de oro al 1%Cloruro de oro (AuCl_3) ----- 1 ml

Agua destilada ----- 99 ml

Solución diaria de cloruro de oro al 1%

Solución matriz de cloruro de oro al 1% ----- 10 ml

Agua destilada ----- 40 ml

Solución de tiosulfato de sodio al 5%

Tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)----- 5 g

Agua destilada ----- 100 ml

Buffer de fosfato 0,1 M (PB), pH 7,4

a) Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)-----11,4 g

b) Fosfato de sodio monobásico dihidrato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)-----3,3 g

Agua destilada-----1000 ml

Buffer salino de fosfato 0,01 M (PBS), pH 7,2

Cloruro de sodio (NaCl)-----8,5 g

PB 0,1 M -----100 ml

Agua destilada hasta ----- 1000 ml

Buffer de citrato 10 mM, pH 6,0

Ácido cítrico monohidrato ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) -----2,1 g

Agua destilada-----1000 ml

Ajustar el pH a 6,0 utilizando NaOH 2N.

Buffer de EDTA 1 mM, pH 8,0

EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$)-----0,37 g

Agua destilada -----1000 ml

Ajustar el pH a 8,0 utilizando NaOH 1N.

Buffer de tris-EDTA-tween, pH 9,0

Tris [(HOCH ₂) ₃ CNH ₂]	-----	1,21 g
EDTA (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	-----	0,37 g
Agua destilada	-----	1000 ml

Agregar 0,5 ml de tween 20.

Solución de leche descremada al 2,5%

Leche descremada en polvo	-----	0,5 g
PBS	-----	20 ml

Solución de agua oxigenada al 15% en PBS-tween

Agua oxigenada de 100 volúmenes	-----	500 ml
PBS	-----	500 ml

Agregar 0,5 ml de tween 20.

Solución de van der Griendt (formaldehído al 0,1% en PBS)

Formol (formaldehído al 40% en agua)	-----	2,5 ml
PBS hasta	-----	1000 ml

Abreviaturas utilizadas

Act UDE: actividad en la unión dermoepidérmica

AE: área endotelial

c: citoplasmática

Cens: censura

D: débil

Di: difusa

DMV: densidad de microvasos

E: epitelióide

F: fuerte (en inmunomarcación)

F: fusiforme (en tipo celular)

G: globoso

H: hembra

He: heterogénea

Ho: homogénea

IC: intermedia-corta

IP: índice de proliferación

L: larga

M: macho

M: mixto

M: moderada

MA: melan A

Mel: grado de melanización

Mit10CMA: mitosis cada diez campos de mayor aumento

n: nuclear

nc: nuclear y citoplasmática

NC: no consignado

NE: no evaluable

NR: no realizado

P: polar

S100: proteína S100

SPV: supervivencia

T. cel: tipo celular

Vim: vimentina