

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Inmuno histoquímica como método de diagnóstico en
neoplasias cutáneas de origen epitelial en caninos**

TESIS

para optar el título profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Alexis Salas García

Lima – Perú

2006

DEDICATORIAS

A mis padres Gerardo y Nora por ser ejemplos en mi vida y fuentes de inspiración para seguir adelante día a día.

A mis hermanos César, Iván y Andrés quienes gracias a su apoyo incondicional y constante me ayudaron en la culminación de mi carrera y de éste trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Especialmente al Dr. Alfonso Chavera, quien me guió en el adecuado desarrollo de éste trabajo.

No me olvido de mis compañeros Fernando, Ignacio, Róbin y Walter, grandes amigos con quienes compartí momentos inolvidables durante nuestra vida universitaria.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	ix
SUMMARY.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. CITOESQUELETO.....	2
2.1. Polimerización.....	3
2.2. Microtúbulos.....	3
2.3. Microfilamentos.....	5
2.4. Filamentos intermedios.....	8
III. CITOQUERATINAS.....	12
3.1. Clasificación histológica.....	12
3.2. Anticuerpos anticitoqueratinas.....	13
3.3. Tipos de citoqueratinas.....	14
3.4. Citoqueratinas y desarrollo embrionario.....	14
IV. NEOPLASIAS.....	16
4.1. Etiopatogenia.....	16
4.1.1. Anomalías cromosomales en el cáncer.....	16
4.1.2. Anomalías numéricas.....	17
4.1.3. Anomalías estructurales.....	17
4.1.4. Telómeros y telomerasas.....	17
4.1.5. Oncogenes y protooncogenes.....	17
4.1.6. Activación de oncogenes.....	18
4.1.7. Antioncogenes o oncogenes supresores.....	18
4.2. Apoptosis.....	19
4.3. Clasificación.....	20
4.4. Tumores epiteliales.....	25
4.4.1. Tumores epidermales.....	25
4.4.2. Tumores foliculares.....	26

4.4.3.	Tumores sebáceos.....	27
4.4.4.	Tumores de las glándulas sudoríparas.....	28
4.4.5.	Tumores epiteliales ungueales.....	28
4.5.	Tumores mesenquimales.....	28
4.5.1.	Tumores fibrocíticos.....	28
4.5.2.	Tumores vasculares.....	29
4.5.3.	Otros tumores mesenquimales.....	29
4.5.4.	Tumores melanocíticos.....	30
4.5.5.	Tumores histiocíticos y de células cebada.....	31
4.5.6.	Tumores linfocíticos.....	31
V.	INMUNOHISTOQUÍMICA.....	32
5.1.	Historia.....	32
5.2.	Antígenos.....	35
5.3.	Anticuerpos.....	35
5.4.	Producción de anticuerpos.....	35
5.5.	Anticuerpos monoclonales.....	36
5.6.	Fijación de muestras y digestión enzimática.....	36
5.7.	Principales técnicas inmunohistoquímicas.....	37
5.8.	Técnica de inmunoperoxidasa.....	38
5.8.1.	Actividad endógena de la peroxidasa.....	39
5.8.2.	Método directo.....	39
5.8.3.	Método indirecto.....	40
5.8.4.	Método indirecto de tres pasos.....	40
5.8.5.	Método de la inmunoperoxidasa-antiperoxidasa (PAP).....	41
5.8.6.	Método avidita-biotina.....	41
5.8.7.	Método de la streptovidina-biotina marcada.....	41
5.9.	Técnica de fosfatasa alcalina.....	42
5.9.1.	Método de la fosfatasa alcalina-antifosfatasa-alcalina (APAAP).....	42
5.10.	Marcación inespecífica.....	42
5.11.	Interpretación.....	43
5.11.1.	Características del marcaje.....	43
5.11.2.	Efectos sobre la muestra.....	44
5.11.3.	Artefactos.....	44

VI.	APLICACIONES INMUNOHISTOQUÍMICAS EN MEDICINA VETERINARIA.....	46
6.1.	Citoqueratinas en las lesiones neoplásicas.	46
6.2.	Citoqueratinas en la epidermis canina.....	47
6.3.	Citoqueratinas en tumores epiteliales caninos.....	48
VII.	CONCLUSIONES.....	50
VIII.	RECOMENDACIONES.....	51
IX.	LITERATURA CITADA.....	52

LISTA DE FIGURAS:

- Figura 1. Estructura molecular de los microtúbulos
- Figura 2. Estructura molecular de los filamentos de actina.
- Figura 3. Estructura molecular de los filamentos intermedios.

LISTA DE CUADROS:

- Cuadro 1. Clasificación de los filamentos intermedios.
- Cuadro 2. Distribución de citoqueratinas en los epitelios normales en diferentes tejidos.
- Cuadro 3. Citoqueratinas en diferentes tumores orgánicos.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue el de recopilar la mayor información posible sobre el diagnóstico inmunohistoquímico de las neoplasias cutáneas epiteliales caninas, con el fin de que en un futuro, en nuestro medio éste método se pueda implementar como procedimiento auxiliar y de ayuda para el diagnóstico definitivo de neoplasias indiferenciadas difíciles de diagnosticar por el ojo del patólogo. Dentro de éstas neoplasias se encuentran los tumores cutáneos epiteliales, que poseen una compleja estructura celular formada por el citoesqueleto y éste a su vez de unas proteínas denominadas citoqueratinas, entre otras. Se sabe que éstas derivan de células de origen ectodermal, el hallazgo o no de las citoqueratinas permitirá el diagnóstico definitivo de una neoplasia pobremente diferenciada, facilitando el tratamiento y un adecuado monitoreo de la mascota.

Palabras clave: Neoplasias, epiteliales, cutáneas, caninos, citoesqueleto, citoqueratinas, inmunohistoquímica.

SUMMARY

The objective of the present work was to compile to a greater extend the current information on immunohistochemistry diagnosis of canine neoplasms to be implemented as an auxiliary procedure in definitive diagnosis specially of undifferentiated cutaneous neoplasms of epithelial origin. Within these neoplasms there are some of them which have a complex cellular structure composed of the cytoskeleton and proteins or cytokeratins which derived from ectodermal origin. The finding of these cytokeratins allowed the definitive diagnosis and to classify the poorly differentiated neoplasms in order to monitoring the patient.

Key words: Cutaneous, neoplasms, epithelial, canine, cytoskeletons, cytokeratins, immunohistochemistry.

I. INTRODUCCIÓN

La historia de la inmunohistoquímica comenzó en los años 40, cuando se desarrollaron las técnicas de inmunofluorescencia, sin embargo esas técnicas presentaron muchas limitaciones. Esas limitaciones estimularon la búsqueda de nuevos métodos y es así que el empleo de anticuerpos marcados con enzimas se desarrolló en la década del 60 (principalmente la peroxidasa de rábano picante) permitiendo la localización y observación de proteínas (citoqueratinas) en la estructura celular de tejidos fijados y procesados por métodos histológicos convencionales (Gimeno *et al.*, 2002).

Actualmente, se sabe que la expresión inmunohistoquímica de diversos tipos de citoqueratinas en los epitelios queratinizados y no queratinizados, sirve para diferenciar los tumores epiteliales de los no epiteliales. Más recientemente, algunos estudios inmunohistoquímicos han servido para precisar diferencias en diversos tipos de citoqueratinas, y lograr un diagnóstico más certero de las neoplasias epiteliales. La inmunohistoquímica al combinar técnicas histológicas, inmunológicas y bioquímicas, nos permite localizar componentes tisulares definidos “in situ” mediante el empleo de anticuerpos específicos (García, 2002).

San Martín (2005), analizando los archivos del laboratorio de Histología, Embriología y Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM, encontró una mayor incidencia de neoplasias de origen epitelial en caninos, éste hallazgo fue uno de los motivos de ésta investigación. En la actualidad no se cuenta con anticuerpos comerciales de uso veterinario disponibles en nuestro medio para las técnicas inmunohistoquímicas, el cual es el principal obstáculo en la aplicación de éste método en el diagnóstico patológico.

El objetivo planteado en el presente trabajo, fue el de recopilar la mayor información posible de la aplicación de éste método en el diagnóstico de neoplasias cutáneas caninas, con énfasis en aquellas de origen epitelial usando anticuerpos anti-citoqueratinas humanas contra las citoqueratinas caninas, pues se sabe que presentan reacción cruzada entre ellas, y de ésta forma sentar las bases para una posterior práctica como método de diagnóstico dentro de cualquier laboratorio de Patología Animal.

II. CITOESQUELETO

Con la introducción de la microscopia electrónica como herramienta de estudio celular, además de observarse las organelas conocidas y obtener un mejor detalle de ellas, se pudo notar en el citoplasma y el núcleo celular una serie de fibrillas y estructuras filamentosas que formaban un verdadero andamiaje intracelular, al cual se le dio el nombre de citoesqueleto.

El citoesqueleto es una red de filamentos proteicos del citoplasma que ocupa el interior de todas las células animales y vegetales. Adquiere una relevancia especial en las células animales que carecen de pared celular rígida, ya que mantiene la estructura y la forma de la célula. Actúa como bastidor para la organización de la célula y la fijación de organelas y enzimas. También, es responsable de muchos de los movimientos celulares. En muchas células, el citoesqueleto no es una estructura permanente, sino que se desmantela y se reconstruye sin cesar. En el citoesqueleto se pueden encontrar tres tipos de fibras citoplasmáticas de polímeros ordenados a partir de monómeros unidos por enlaces no covalentes, los microfilamentos con un diámetro de 5 a 9 nm; los filamentos intermedios de 10 nm de diámetro y los microtúbulos de 25 nm (Shwartz, 2001).

Cada tipo de filamento está formado por una unidad proteica distinta, actina para los microfilamentos; tubulina alfa y beta para los microtúbulos y una familia de proteínas fibrosas relacionadas y denominadas citoqueratinas, vimentinas, desminas, etc. para los filamentos intermedios. En conjunto posibilitan que la célula tenga variadas formas, se deslice sobre un sustrato, se contraiga, cambie para los movimientos intracelulares y se pueda organizar internamente (Alberts *et al.*, 2002).

En cada uno de los tres principales tipos de proteínas del citoesqueleto, miles de moléculas proteicas se ensamblan formando un filamento lineal, que puede ser lo suficientemente largo como para ir de un lado de la célula hasta el lado opuesto, éste proceso es de vital importancia y está dado por la polimerización. Estos filamentos conectan complejos proteicos y organelas de regiones distintas de la célula y actúan a modo de rieles para el transporte entre ellos (Alberts *et al.*, 2002).

2.1. POLIMERIZACIÓN.

Es el proceso mediante el cual un péptido puede asociarse a otras proteínas de la misma o diferente secuencia de aminoácidos y adoptar diferentes configuraciones. Igualmente, a nivel tridimensional las proteínas tienen que ordenarse con precisión. La interacción entre sus diferentes dominios resulta en asociaciones específicas tanto con moléculas diferentes como con moléculas del mismo tipo. Cuando esto último sucede, la interacción no covalente de subunidades trae como resultado la formación de una estructura polimérica (Meza and Frixione, 1996).

Éste fenómeno de ensamblaje o polimerización tiene las siguientes ventajas:

- a. Construye una estructura a partir de subunidades iguales de modo que la información para hacer una sola de ellas es suficiente.
- b. Se puede controlar tanto el ensamblaje como el desensamblaje, y para esto se requiere relativamente poca energía.
- c. El ensamblaje permite corregir más fácilmente errores que darían si cada vez se tuviera que sintetizar toda la estructura.

Para que se realice el ensamblaje se requiere solamente que una proteína tenga un sitio de unión que sea complementario a otra región de su propia superficie. Así se pueden formar dímeros, que es el caso más simple, trímeros y hasta polímeros, en los cuales hay miles de subunidades o monómeros asociados. En el caso del citoesqueleto las estructuras subcelulares que lo componen, tanto los diferentes tipos de filamentos como los microtúbulos, se forman por polimerización de sus subunidades proteicas (Meza and Frixione, 1996).

2.2. MICROTUBULOS.

Los microtúbulos están constituidos por moléculas de tubulina, cada una de las cuales es un dímero formado por dos subunidades globulares fuertemente unidas entre sí, llamadas alfa-tubulina y beta-tubulina (*Fig. 1*). En los mamíferos existen por lo menos 6 formas de alfa-tubulina y otras 6 de beta-tubulina, cada una de las cuales está codificada por un gen distinto. Éstas formas son muy parecidas y todas ellas

copolimerizan entre sí formando un mismo microtúbulo. El ensamble de estos dímeros para formar un microtúbulo requiere de la hidrólisis de GTP, un nucleótido trifosfato que contiene la base guanina en lugar de adenina, como en el ATP, y que se encuentra asociado a cada dímero. La energía provista por la hidrólisis del GTP favorece la polimerización en un extremo del túbulo denominado “MAS” que aumenta de tamaño y es de crecimiento rápido (Alberts *et al.*, 2002).

El otro extremo denominado “MENOS” al no crecer se empieza a despolimerizar. Por ésta razón los microtúbulos son muy inestables y pueden polimerizarse y despolimerizarse con gran rapidez. Los dímeros al polimerizar, forman filamentos alargados que posteriormente se asocian en grupos de 13 y dejan una luz central que le da a la estructura el carácter de túbulo en el citoplasma. Los microtúbulos de aproximadamente 25nm, se forman de manera espontánea partiendo de centros de nucleación llamados organizadores de microtúbulos (MTOC) en donde se encuentran las subunidades de tubulina, con base en éstas estructuras se organizan los microtúbulos que radian hacia el citoplasma. Los organizadores de microtúbulos forman los ásteres en la mitosis y también los cuerpos basales de los cilios y flagelos en muchas células (Alberts *et al.*, 2002).

La estructura tubular más organizada es tal vez el axonema de los cilios y flagelos, en el cual 9 pares exteriores de microtúbulos se arreglan alrededor de un par central, todos conectados entre si por un gran número de proteínas diversas que ayudan a que éste axonema lleve a cabo el movimiento de deslizamiento, que resultara en el movimiento batiente de los cilios y de látigo o tirabuzón de algunos flagelos. En el caso de cilios y flagelos los microtúbulos son muy estables y no se despolimerizan con facilidad. Cada par exterior tiene asociada una proteína con actividad ATPasa, que se conocen como “dinaina”, y que al hidrolizar el ATP genera la energía necesaria para permitir el deslizamiento de los túbulo y por consiguiente, de los flagelos o cilios (Lodish *et al.*, 2003).

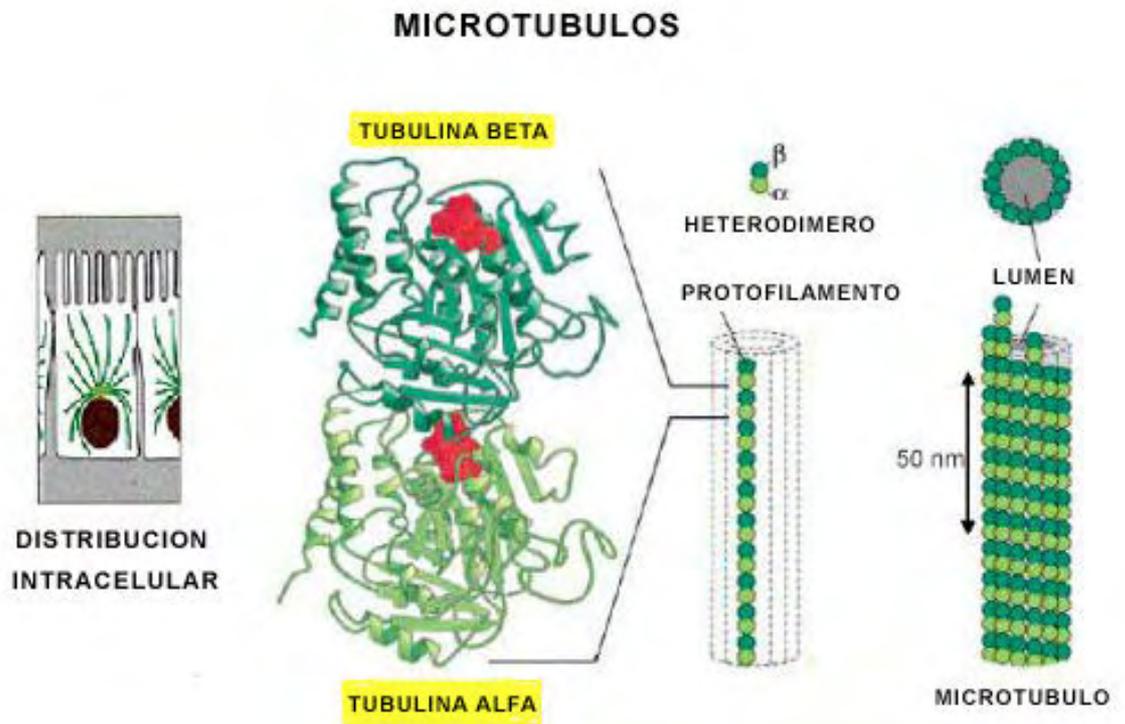


Figura 1. Estructura molecular de los microtúbulos. (Fuente: www.uv.es/benso/09-citoesqueleto.pdf)

La polimerización de los microtúbulos puede inhibirse por temperatura, presión, falta de cationes como Ca y Mg y por drogas, como la colchicina, que al interactuar con los dímeros de tubulina impide que éstos se integren al microtúbulo que está creciendo en un extremo, causando la despolimerización del otro extremo. Ya que un microtúbulo está en un equilibrio dinámico entre dímeros y polímeros, cualquier factor que interrumpe éste equilibrio interferirá con su funcionamiento. Es por esto que la colchicina es un inhibidor de la mitosis, del transporte axonal y de otras funciones que requieren la participación de los microtúbulos, acción similar tienen la colcemida, vinblastina y vincristina. Otra droga denominada taxol actúa en forma contraria a la colchicina, esto es, estabilizando al polímero de modo que los microtúbulos no pueden despolimerizarse, con la consecuente inhibición del equilibrio dinámico y de los procesos ya mencionados, en los que participan los microtúbulos (Shwartz, 2001).

2.3. MICROFILAMENTOS.

La actina es la proteína intracelular más abundante de las células eucariontes, dado que forman estructuras que deben cubrir grandes espacios celulares. La actina existe en la célula como monómero globular, denominado actina G, y como polímero filamentoso denominada actina F, que es una cadena lineal de sub-unidades de actina G (Lodish *et al.*, 2003).

En las células los filamentos de actina pueden formar estructuras estables y estructuras lábiles. Los filamentos de actina están formados por una apretada hélice de monómeros de actina G orientados uniformemente y se encuentran en toda la célula, pero especialmente están concentrados bajo la membrana plasmática formando el cortex celular donde forman una tupida red conectada a la membrana (*Fig. 2*). También se encuentran formando parte de las microvellosidades de algunos epitelios, en lamelipodios y en fibras del stress (Shwartz, 2001).

El polímero de actina es una estructura polar ya que las proteínas no son simétricas, de ésta forma, el filamento de actina posee un extremo MAS y un extremo MENOS, sin embargo aquí la diferencia de velocidades es mucho más notable, el extremo MAS crece 10 veces más rápido que el extremo MENOS (Shwartz, 2001).

Durante la polimerización el fosfato terminal de una molécula de ATP, que está regularmente asociado con los monómeros, se hidroliza proveyendo la energía necesaria para el ensamble. La actina despolimerizada, llamada también soluble, forma una solución poco viscosa, pero al polimerizarse hay un rápido aumento de viscosidad que al medirse muestra la indicación de velocidad con que se asocian los monómeros de actina para formar un filamento.

Cada microfilamento tiene dos cadenas de monómeros de actina enrollados en espiral, la cual crece siempre en el extremo MAS, puesto que sus extremos son estructuralmente diferentes por la molécula de ATP ó ADP que se halla asociada a los monómeros ensamblados. Ésta polaridad de la molécula es muy importante en la asociación de los filamentos con otras proteínas y en la forma como se desensambla un filamento. Éste desensamble se puede producir aumentando los niveles de calcio y también por la acción de algunas drogas, como las citocalasina (moléculas sintetizadas por hongos). El desensamble siempre ocurre a partir del extremo MENOS del filamento (Shwartz, 2001).

FILAMENTOS DE ACTINA

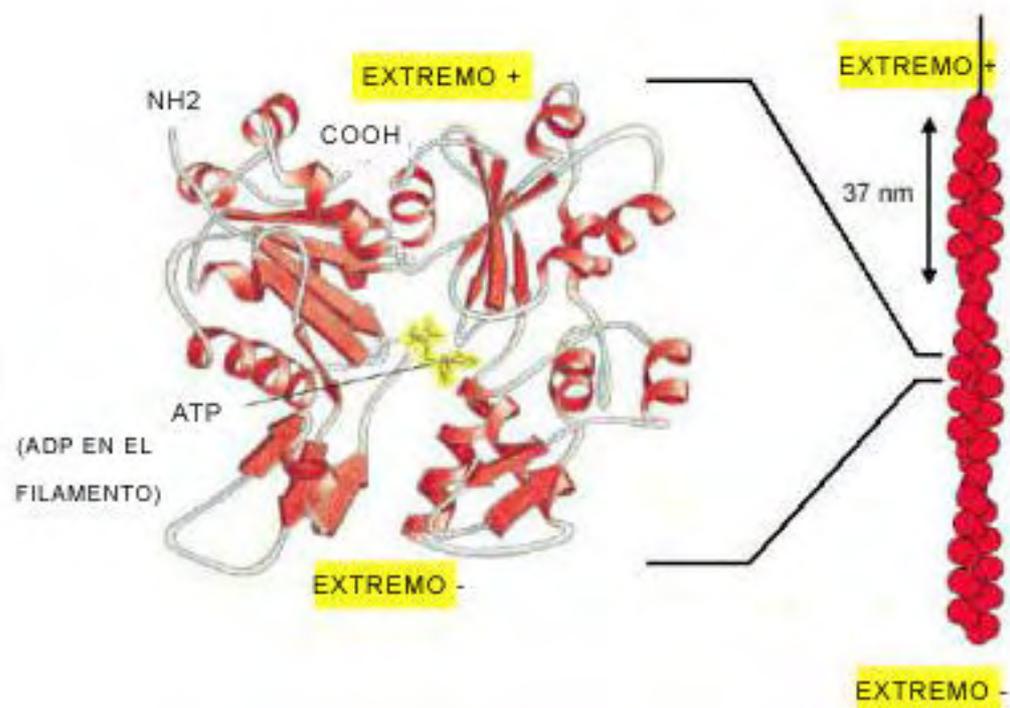


Figura 2. Estructura molecular de los filamentos de actina. (Fuente: www.uv.es/benso/09-citoesqueleto.pdf)

Los filamentos de actina interactúan con otras moléculas para poder funcionar. Su interacción va a depender del tipo de célula en la que se encuentre y de las funciones que ésta lleve a cabo. En los diferentes tipos de músculos la actina interactúa con la miosina para producir la contracción muscular. En otros tipos de células los filamentos de actina forman redes y haces que dan más resistencia al citoplasma y permiten el desplazamiento de las células. Algunas proteínas favorecen el entrecruzamiento de los filamentos para formar redes y entre ellas están las ABP, la filamina y la alfa-actinina, otras proteínas rompen los filamentos, como la gelsolina y

la severina facilitando la despolimerización y la repolimerización (Meza y Frixione, 1996).

En los sitios de contacto de filamentos con la membrana celular se encuentran proteínas como la ankirina, la espectrina y la fodrina. En áreas de contacto de las células con el sustrato se encuentran los filamentos de actina asociados a proteínas como vinculina y talina. Asimismo, proteínas como la profilina se asocian a los monómeros de actina inhibiendo su polimerización y manteniendo la actina en la célula en forma soluble. Toda ésta gama de proteínas regula de manera precisa la forma en que la actina participa en los movimientos celulares y determina cuándo y cómo se debe inducir la polimerización, así como la despolimerización de los microfilamentos (Meza y Frixione, 1996).

2.4. FILAMENTOS INTERMEDIOS.

Los filamentos intermedios se encuentran en casi todas las células de organismos multicelulares; en algunas células como las epidérmicas y los axones de las neuronas, los filamentos intermedios son 10 veces más abundantes que los microtúbulos o los microfilamentos (Shwartz, 2001).

La organización de los filamentos intermedios (FI) y su asociación con las membranas plasmáticas sugiere que su función principal es estructural. La función más importante de los filamentos intermedios es la de proporcionar un soporte mecánico a la membrana plasmática en los sitios donde entra en contacto con otras células o con la matriz extracelular. A diferencia de los microfilamentos y de los microtúbulos, los filamentos intermedios no participan en la movilidad celular (Alberts *et al.*, 2002).

Todas las proteínas de las sub-unidades de FI tienen una estructura de dominio común, un dominio central alfa helicoidal flanqueado por dominios globulares amino y carboxilo terminales. El dominio central helicoidal, conservado en todas las proteínas FI, está compuesto por cuatro largas hélices alfas separadas por tres regiones no helicoidales. Las posiciones de estos elementos espaciadores también están conservadas en todas las proteínas FI. Los segmentos alfa helicoidales se aparean para formar un dímero de resorte enrollado. Experimentos con anticuerpos

marcados demuestran que los dímeros de un tetrámero tienen orientación antiparalela, y que la sub-unidad para el ensamblaje de los filamentos intermedios es el tetrámero, y no el dímero. Los tetrámeros se unen de extremo a extremo para formar protofilamentos de 2 a 3 nm de espesor que se aparean y forman protofibrillas, y cuatro protofibrillas forman un solo filamento intermedio de 10nm de diámetro. Las colas que se extienden desde los tetrámeros que componen un protofilamento a menudo se visualizan como proyecciones a lo largo de un filamento ensamblado por completo. Dado que el tetrámero no es simétrico, es interesante destacar que no siempre un filamento intermedio tiene polaridad, como el filamento de actina o del microtúbulo (Lodish *et al.*, 2003).

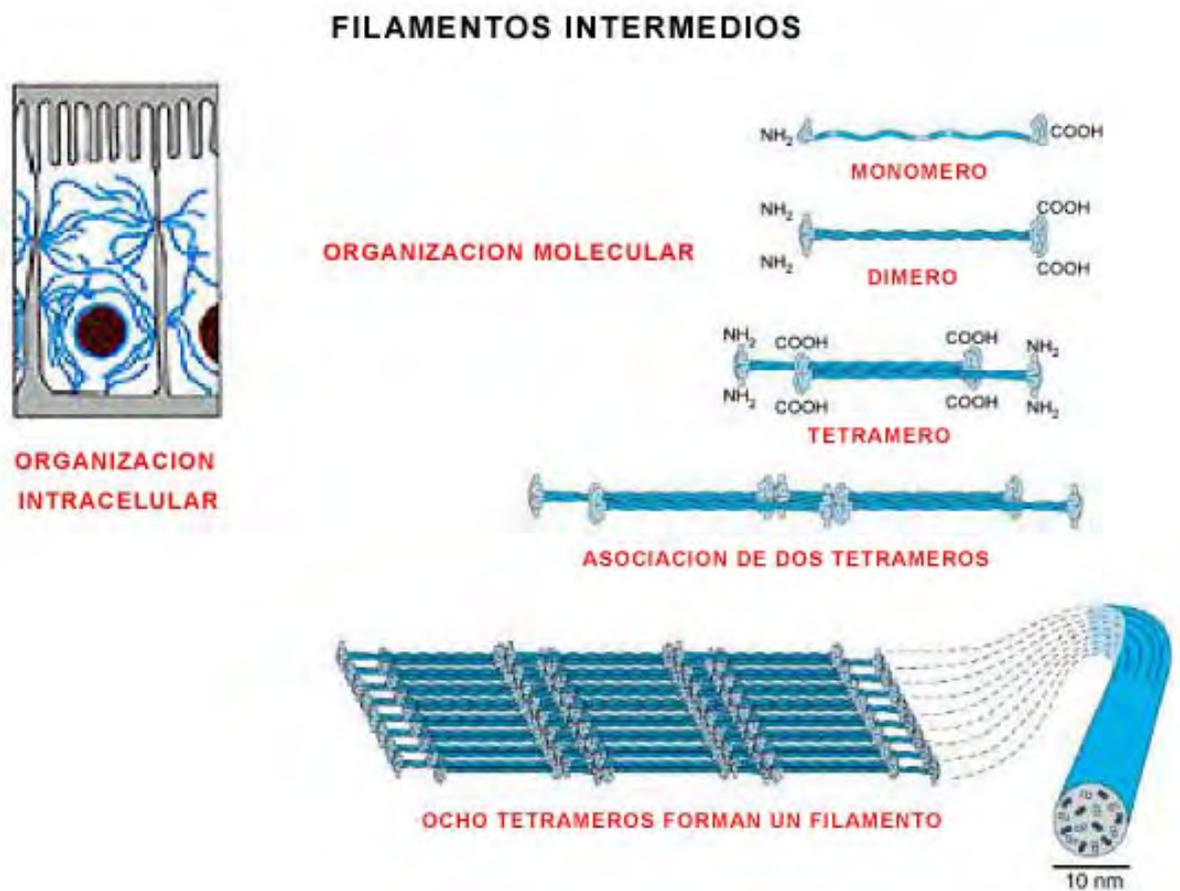


Figura 3. Estructura molecular de los filamentos intermedios (FI). (Fuente: www.uv.es/benso/09-citoesqueleto.pdf)

Algunas proteínas FI pueden formar filamentos homopoliméricos, mientras que otros solo forman filamentos heteropoliméricos. La vimentina, la desmina, la proteína ácida fibrilar glial y los neurofilamentos pueden formar homodímeros que se

ensamblan a homopolímeros, éstas proteínas también se pueden ensamblar en heteropolímeros. En contraste, las citoqueratinas ácidas y básicas, que forman heterodímeros entre sí, solo generan filamentos de citoqueratina heteropoliméricos obligados. Pero las citoqueratinas no forman heteropolímeros con otras clases de proteínas FI, a diferencia de otros, por ejemplo, vimentina y las proteínas neurofilamentos (NF) que se pueden ensamblar para formar un heteropolímero (Lodish *et al.*, 2003).

Varias propiedades físicas y químicas diferencian los filamentos intermedios de los microfilamentos y de los microtúbulos. Primero, los filamentos intermedios son muy estables, mientras que los microfilamentos y los microtúbulos se despolimerizan en sus sub-unidades solubles. Segundo, estos filamentos difieren en tamaño de las otras dos fibras citoesqueléticas, además en contraste son proteínas fibrosas alargadas en vez de globulares (Shwartz, 2001).

Cuadro 1. Clasificación de los filamentos intermedios (Fuente:Lodish *et al.*, 2003)

Proteína FI	PM (10 ³)kD	Distribución tisular
Tipo I		
Citoqueratinas ácidas	40-57	Epitelio
Tipo II		
Citoqueratinas básicas	53-67	Epitelio
Vicentina	57	Mesénquima
Desmina	53	Músculo
Proteína ácida fibrilar glial	50	Células gliales y astrocitos
Periferina	57	Neuronas
NF-L	62	Neuronas maduras
NF-M	102	Neuronas maduras
NF-H	110	Neuronas maduras
Internexina	66	Sistema nervioso central

Filensina	83	Células fibrosas del cristalino
Facinina	45	Células fibrosas del cristalino
Lamina A	70	Núcleo de todas las células
Lamina B	67	Núcleo de todas las células
Lamina C	67	Núcleo de todas las células
NF = neurofilamentos: L, M y H = peso molecular bajo, medio y alto, respectivamente.		

Los filamentos intermedios pueden agruparse hasta en siete clases. A diferencia de los microfilamentos y de los microtúbulos, estos filamentos son muy divergentes y varían mucho en su peso molecular. A continuación la clasificación según Lodish *et al.* (2003).

- **Las citoqueratinas ácidas y básicas**, son expresiones típicas de las células epiteliales. Éstas son la clase más diversa de proteínas de los filamentos intermedios y se expresan en numerosas isoformas, que se pueden dividir en dos clases: unas 10 queratinas son específicas para los tejidos epiteliales duros, que dan origen a las uñas, pelo y lana; unas 20 denominadas citoqueratinas, que suelen encontrarse en todos los epitelios. Cada tipo de epitelio siempre expresa una combinación de características de citoqueratinas I y II.
- **La vimentina**, es el filamento intermedio más abundante y de más amplia distribución, se encuentra en la mayoría de células de origen mesodérmico como los leucocitos, células endoteliales de los vasos sanguíneos, algunas células epiteliales y fibroblastos, además muchas células expresan la vimentina transitoriamente durante el desarrollo. Las redes de vimentina también ayudan a mantener el núcleo y otras organelas en un lugar definido dentro de la célula.
- **La desmina**, se encuentra principalmente en las fibras musculares estriadas y lisas, son responsables de la estabilización de los sarcómeros en el músculo en contracción.
- **La proteína ácida fibrilar glial**, forma los filamentos gliales en los astrocitos del sistema nervioso central y en algunas células de Schwann de los nervios periféricos.

- **La periferina**, se encuentra en las neuronas del sistema nervioso periférico, pero es muy poco lo que se sabe de ésta.
- **Neurofilamentos (NF)**, son las más abundantes, se extienden a lo largo del axón y forman su componente citoesquelético primario, especialmente en las células nerviosas maduras. En los mamíferos se han descrito tres tipos de proteínas de los neurofilamentos: llamadas NF-L, NF-M, NF-H, debido a diferencias en su peso molecular (refiriéndose a sus siglas en inglés: L de bajo, “low”; M de medio, “middle”; y H de alto, “high” respectivamente).
- **Las lamininas**, al contrario de lo que ocurre con la localización citosólica de las anteriores FI, éstas proteínas solo se encuentran en el núcleo. De las tres lamininas, dos son productos empalmados de forma alternada, codificados por un gen común, mientras que la tercera es codificada por un gen distinto. En conjunto forman un reticulado fibroso que sostiene la membrana nuclear. Las células epiteliales de los órganos y la piel se mantienen enlazadas mediante uniones celulares especializadas denominadas desmosomas y hemidesmosomas. Los primeros median la adhesión intercelular, y los segundos son responsables de la fijación de la célula a la membrana basal subyacente. Por lo tanto los filamentos intermedios de una célula están en conexión directa con los filamentos intermedios de la célula vecina a través de los desmosomas (Meza y Frixione, 1996).

III. CITOQUERATINAS

Son proteínas de los filamentos intermedios que forman parte del citoesqueleto de las células epiteliales. También denominadas bajo el término español de Citoqueratinas ó Keratinas, el anglosajón Cytokeratins y/o Keratins, y que para nuestro entender serán denominadas bajo las siglas Ck. Éstas comprenden una compleja familia multigénica de proteínas relacionadas, en los diferentes tipos de células epiteliales. Se han caracterizado hasta el momento 20 polipéptidos diferentes de Citoqueratinas que van de Ck 1 a la Ck 20 (Moll *et al.*, 1982).

Tseng *et al.* (1982), clasifican las Ck, ateniéndose a su peso molecular y a su punto isoeléctrico, dentro de dos tipos:

- ❶ Citoqueratinas tipo I: son de peso molecular bajo, (56.5 kD) y de punto isoeléctrico ácido y comprende las Ck 9 a la Ck 20.

- ② Citoqueratinas tipo II: son de mayor peso molecular (65 a 67 kD) y de un punto isoeléctrico relativamente básico y comprende a las Ck 1 a la Ck 8.

Generalmente, cada una de las Ck ácidas se coexpresan con otra Ck básica específica, formándose pares de Ck. Dentro de cada par, el componente básico es más grande que el ácido en aproximadamente 8-10 kD. La coexpresión de la mayoría de ambos tipos de Ck sigue reglas bien definidas que están principalmente relacionadas con tres factores:

- a) El tipo de epitelios (simples o estratificados).
- b) El programa de diferenciación de cada tejido epitelial.
- c) El crecimiento celular (normal o hiperproliferativo).

3.1. CLASIFICACION HISTOLOGICA.

Moll *et al.* (1982), consideran tres grandes grupos del catálogo humano de Citoqueratinas:

- a) Las Ck del epitelio simple. Las Ck 7, 8, 18 y 19, son las únicas Ck presentes en epitelio simple, pero al menos las Ck 8 y 18 pueden también expresarse en ciertos tipos de glándulas y en epitelios estratificados.
- b) Las Ck de los epitelios de alta complejidad celular, que incluyen los glandulares, ductales, pseudoestratificados, y estratificado no queratinizados, así como el urotelio, en los que se pueden expresar las Ck 4-6, 13-15 y 17.
- c) Las Ck de la diferenciación suprabasal de la epidermis que incluyen las Ck 1, 2, 5, 9-11 y 16., también están presentes en otros epitelios estratificados, como son el gingival, vaginal, exocervical y en la mucosa peneana.

3.2. ANTICUERPOS ANTI-CITOQUERATINAS.

En general las Ck ácidas Tipo I, se pueden identificar con un anticuerpo monoclonal que es grupo específico denominado **AE1** y las Ck básicas tipo II, son identificadas con el anticuerpo monoclonal grupo específico **AE3** (Moll *et al.*, 1982).

Tipo de anticuerpo	Tipo de citoqueratinas identificadas
AE1	Ck 10; Ck 13; Ck 14; Ck 15; Ck 16; Ck 19
AE3	Ck 1; Ck 2; Ck 3; Ck 4; Ck 5; Ck 6; Ck 7; Ck 8

Estos anticuerpos monoclonales permiten estudiar, los siguientes procesos:

- La localización de Ck específicas en los diferentes estratos epidérmicos.
- La determinación de la distribución tisular de varias Ck
- El estudio de la expresión de Ck en cultivos celulares de patologías epiteliales.
- Valorar los cambios de la expresión de Ck durante el desarrollo embrionario.
- Estos anticuerpos son ampliamente usados para precisar la histogénesis de carcinomas pobremente diferenciados, lo que puede condicionar una actitud terapéutica correcta en cada paciente (Woodcock-Mitchell *et al.*, 1982).

Las Ck intactas con actividad antigénica se pueden obtener de la epidermis humana fresca (sin congelar), en un buffer acuoso y posterior ruptura de las proteínas solubles con urea 9 M. En una situación ideal, se debería obtener un anticuerpo (un anti-pan-Ck) que reconociese la mayoría o todas las Ck pero que no produjera reacciones cruzadas con otros filamentos intermedios. Un ejemplo de anticuerpo anti-pan-Ck ampliamente usado en el diagnóstico patológico de tumores indiferenciados, es el complejo de Ck AE1/AE3 (positivo en los carcinomas pobremente diferenciados), que reconoce a la mayoría de las citoqueratinas ácidas y básicas. Por último, se pueden usar Ck procedentes de epitelios estratificados hiperproliferativos (epidermis de pacientes con soriasis o cultivos de queratinocitos), con el fin de crear un marcador de hiperproliferación celular (Rojas *et al.*, 1998).

3.3. TIPOS DE CITOQUERATINAS.

Cuadro 2: Distribución de las diversas citoqueratinas en los epitelios normales en diferentes tejidos (Fuente: García, 2002).

Epitelio	Citoqueratina II	Citoqueratina I	Distribución
Epitelios simples	8	18	Mayoría de células secretoras.
	7	19	Epitelios de conductos: biliares, pancreáticos, túbulos renales y epitelio gastrointestinal
		20	Epitelio gastrointestinal. Células de Merkel de piel y mucosa oral.
Epitelios estratificados	5	14	Células basales del epitelio plano, glandular, del mioepitelio y mesotelio
	8	15	Epitelio escamoso
		18,19	Ep. planoestratificado no queratinizado

Células suprabasales	1	10/11	Epidermis todo lo suprabasal
		9	Epidermis de palmas y plantas de manos / pies
	2		Epidermis (capas superficiales)
	2	12	Encía y paladar duro
	3	13	Epitelio de la córnea
	4	16,17	Ep. Planoestratificado no queratinizado de órganos
	6		Epitelio escamoso hiperproliferativo

3.4. CITOQUERATINAS Y DESARROLLO EMBRIONARIO.

Se ha demostrado que durante el desarrollo fetal humano se expresan progresivamente las mismas Ck que están presentes en los tejidos de animales adultos, y por ello, no existen Ck que sean únicamente de tipo fetal. El par de Ck 8 y 18 es el primero que se expresa durante el inicio de la diferenciación embrionaria de las células epiteliales. Durante el desarrollo fetal, algunos epitelios presentan el patrón de Ck característico de los epitelios pseudoestratificados y estratificados. En embriones y fetos humanos, la Ck 5 está presente en la epidermis; la Ck 1 también se expresa en la capa de células intermedias de la epidermis en el embrión humano de 13 semanas, cuando el proceso de queratinización aún no ha comenzado y las Ck 1, 2 y 10 comienzan a expresarse en el momento de la estratificación epidérmica y se incrementan a medida que avanza el desarrollo. Contrariamente, las Ck 8 y 19, están presentes en estadios tempranos del desarrollo de la epidermis, aunque desaparecen cuando comienza la queratinización. La expresión de Ck típicas del epitelio estratificado (Ck 5 y 15) precede a la estratificación del epitelio escamoso y la expresión de Ck típicas de queratinización (Rojas *et al.*, 1998).

IV. NEOPLASIAS

Son nuevos crecimientos de tejidos, los cuales se desarrollan más rápido de lo normal, realizándolo de una manera incoordinada y persistente, por lo que no responden a los mecanismos normales de control, alejándose así del fenotipo normal; pudiendo ser benignas o malignas (Pfeifer y Wick., 1996).

Éstas células escapan a los controles que regulan su multiplicación, crecen y se dividen en forma descontrolada, muy al margen de las necesidades del organismo de más células de éste tipo. Éstas células tienen descendencia propensa a proliferar sin responder a la regulación, resultando clones capaces de expandirse en forma indefinida, formando así una masa denominada “tumor” (Lodish *et al.*, 2003).

Un tumor está formado por las células proliferantes, y un estroma de sostén que contiene tejido conectivo y vasos sanguíneos, éste no tiene objeto, ataca al huésped y es prácticamente autónomo. Ataca al huésped en la medida en que el crecimiento del tejido neoplásico compite con los tejidos y células normales por el suministro de energía y los sustratos nutritivos. Es autónomo en tanto que medra un animal y lo conlleva a perder su vitalidad, aunque muchas veces es evidente que ésta autonomía no es total (Cotran *et al.*, 2000).

4.1. ETIOPATOGENIA.

Desde que Boveri en 1914 sentó el paradigma “mutaciones en las células somáticas causan la proliferación celular llamada cáncer”, han transcurrido más de 50 años para que la revolución tecnológica confirmara ésta hipótesis, y solo 20 años para llegar a la conclusión de que eran moléculas cancerosas, más propiamente que células cancerosas, la base de la enfermedad maligna (Solidoro, 2005). A continuación describimos la clasificación hecha por el Dr. Solidoro:

4.1.1. Anomalías cromosomales en el cáncer.

Las anomalías cromosomales pueden ser estructurales o numéricas, y a su vez, pueden ser constitucionales y dar a lugar a anomalías congénitas, o somáticas adquiridas y condicionar la aparición de neoplasias malignas. Las anomalías cromosomales somáticas o adquiridas ocurren después de la concepción y por lo general están presentes solo en tejidos específicos. Las anomalías cromosomales constitucionales se determinan en la concepción y pueden estar presentes en todos los tejidos somáticos del individuo.

4.1.2. Anormalidades numéricas.

Normalmente se posee dos copias de cada cromosoma, situación normal que se denomina “disomía”. Por el contrario, tener un cromosoma extra se denomina “trisomía”, y la falta de un cromosoma se denomina “monosomía”.

- Trisomías y monosomías son frecuentes en cáncer. Una de las monosomías más frecuentes en cáncer humano es la monosomía 7 en los desordenes mieloides.
- Diploidia es el termino que reconoce el estado normal celular con dos sets de cromosomas; la “poliploidia” ocurre cuando la célula tiene más de dos sets de cromosomas.

4.1.3. Anormalidades estructurales.

Las anomalías estructurales se refieren a los cambios en la parte de uno o más cromosomas. Por definición, se trata de rupturas en la secuencia del ADN. Estos rearrreglos estructurales son deletéreos por lo que la naturaleza ha previsto varios mecanismos para reducir la frecuencia de aberraciones cromosomales. La alta incidencia de anomalías estructurales que se ven en el cáncer, claramente escapan a estos mecanismos de control.

4.1.4. Telómeros y telomerasas.

Los telómeros son las numerosas secuencias repetitivas de secuencias cortas de la cadena de ADN (TTAGGG) en los extremos terminales de los cromosomas. Los telómeros protegen la punta de los cromosomas de los fenómenos de degradación y previenen la pérdida de información genética durante la replicación. La telomerasa es una enzima que tiene por función la adición de tandems de telómeros a los extremos de los cromosomas; la telomerasa se encuentra en cantidades significativas y tiene gran actividad en la célula neoplásica y en todas las células de rápida división; en cambio no se encuentra en cantidades significativas en las células somáticas normales.

4.1.5. Oncogenes y proto-oncogenes.

Los cromosomas contienen el total de ADN de cada célula. El ADN es el material genético fundamental; se estima que cada célula humana contiene seis billones de pares de bases que a su vez albergan la información transmitida por herencia. Ésta información se organiza en genes o unidades funcionales, del que número para el hombre se estima entre 50,000 y 100,000.

La información heredada en un gen está escrita en un código que se descifra según la secuencia de bases de una de las hebras de la molécula ADN. La secuencia de bases en un gen se lee como “codones”, cada codón codifica un aminoácido particular. De éste modo el orden lineal de aminoácidos en una proteína en particular se determina por el orden lineal de codones en el gen para la proteína. Las alteraciones en la secuencia del ADN provocados por mutaciones interfieren en cualquiera de los múltiples pasos que se precisan para la expresión normal de un gen.

Los genes “transformantes” de origen viral, y otros activados por carcinógenos, han sido colectivamente denominados oncogenes. Su contraparte celular normalmente funcionante se conoce como proto-oncogen. Los productos de los proto-oncogenes son importantes reguladores del proceso biológico que expresan en diferentes estados del ciclo celular y que están comprometidos en la cascada de eventos que sirven para mantener el orden a través del ciclo celular.

4.1.6. Activación de oncogenes.

Los oncogenes son formas alteradas de genes normales (que se conocen como proto-oncogenes). Los cambios que pueden convertir a un proto-oncogen en oncogen son:

- a) Mutaciones.
- b) Amplificación de genes.
- c) Traslocación.
- d) Recombinación.

4.1.7. Antioncogenes o genes supresores.

Como su nombre lo describe son genes encargados normalmente de suprimir el crecimiento tumoral. Su ausencia o mutación es, a su vez, decisiva en la formación de algunas neoplasias. El cáncer, debido a la inactivación de la función de un gen supresor, requiere de la presencia de dos lesiones independientes. A diferencia de los oncogenes que se activan por cambios en células somáticas, los antioncogenes pueden sufrir deleciones o mutaciones en la línea de células germinales y por lo tanto, ser hereditarios.

4.2. APOPTOSIS.

Es una forma de muerte celular cuyo objetivo es el de eliminar las células del huésped que ya no son necesarias a través de la activación de una serie coordinada y programada de acontecimientos internos, que se inician por un grupo de productos génicos cuya función específica es precisamente ésta (Balbarrey *et al.*, 2001).

Se puede observar en los siguientes contextos generales:

- a) Durante el desarrollo.
- b) Como mecanismo homeostático para el mantenimiento de las poblaciones celulares en los tejidos.
- c) Como mecanismo de defensa en reacciones inmunitarias.
- d) Cuando las células son lesionadas por enfermedad o por agentes lesivos.
- e) Durante el envejecimiento.

Éste proceso es realizado por una familia de proteasas intracelulares llamadas “caspasas”. Ésta muerte fisiológica culmina en fragmentación de células hacia cuerpos envueltos en membranas que son limpiadas vía fagocitosis por células vecinas sin incitar reacciones inflamatorias ni cicatrices (Cotran *et al.*, 2000).

Las alteraciones de los procesos que controlan la apoptosis pueden prolongar la vida media celular contribuyendo a una expansión neoplásica celular. Éstas fallas de la apoptosis normal son factores de carcinogénesis al crear una atmósfera permisiva para la inestabilidad genética, acumulación de mutaciones y resistencia a los mecanismos inmunológicos de destrucción permitiendo la desobediencia en los puntos del ciclo celular en que normalmente se induce apoptosis; se facilitaría así la sobrevida celular mediada por factores de crecimiento (Guerrero, *et al.*, 2003).

El p53 funciona como un gen supresor guardián del material genético. Cada vez que un insulto ocasiona un error importante en el ADN, la proteína que se produce bajo las instrucciones del p53, interviene deteniendo la división celular hasta que la célula pueda reparar el daño. La inactivación o destrucción de la proteína del gen p53 por los agentes carcinogénicos es uno de los pasos requeridos para que una célula se convierta en neoplásica. La desregulación de la apoptosis en el tumor puede ser factor de resistencia a drogas y, en ésta situación la quimioterapia solo afectaría a las células saludables (Pérez-Requena *et al.*, 2002). El p53 es un marcador genético, identificado hace pocos años por correlacionar con la capacidad de la célula de cometer suicidio (apoptosis) y del mismo modo para “inmortalizarse” y hacerse resistente a la quimioterapia. Se ha encontrado que en más de 50 por ciento de neoplasias malignas, la pérdida del gen p53 correlaciona con un mal pronóstico (Solidoro, 2005).

4.3. CLASIFICACION.

Se clasifican como **benignas** y **malignas**, y esto se debe principalmente al conocimiento de su conducta biológica y su aspecto microscópico, ambos tipos de tumores contiene células neoplásicas proliferantes que constituyen su parénquima, y un estroma de sostén constituido por tejido conectivo y vasos sanguíneos. Aunque las células parenquimatosas constituyen el “borde agresivo” de la neoplasia y, en consecuencia determinan la naturaleza de éstas, el crecimiento y la evolución de las mismas dependen de su estroma. Les es indispensable un adecuado aporte sanguíneo al estroma y el tejido conjuntivo de éste es el que proporciona el soporte necesario (Pfeifer y Wick, 1996).

Neoplasias benignas: en general son de crecimiento lento, presentan características microscópicas carentes de atipias, presentan bordes definidos pudiendo llegar a encapsularse, generalmente ejercen efectos mínimos sobre los tejidos circundantes y no producen metástasis.

Neoplasias malignas: de crecimiento muy rápido, son invasivas, no suelen encapsularse, pudiendo tener bordes irregulares, muestran gran actividad mitótica, y producen metástasis (Unidad Técnica CIE-9-MC, 2001).

Lee (1992) clasificó las neoplasias caninas más comunes en la piel de la siguiente manera:

TUMORES EPITELIALES

Tumores epidermales

- Queratosis actínica
- Nevus pigmentado epidermal
- Papiloma escamoso
- Papiloma exofítico
- Verruga plana

- Papiloma invertido
- Papiloma escamoso idiopático
- Carcinoma de células escamosas
 - Carcinoma de células escamosas bien diferenciado
 - Carcinoma de células escamosas pobremente diferenciado
 - Carcinoma de células escamosas acantolítico
 - Carcinoma de células escamosas fusiforme
- Carcinoma de células escamosas multicentrico in situ
- Carcinoma de células basales
 - Carcinoma de células basales sólido
 - Carcinoma de células basales keratinizante
 - Carcinoma de células basales de células claras

Tumores foliculares

- Quiste folicular
 - Quiste infundibular
 - Quiste istmo catagénico
 - Quiste matricial
 - Quiste híbrido
- Quiste dermoide
- Poro dilatado
- Hamartoma folicular
- Displasia anexa focal
- Tricofoliculoma
- Tricoepitelioma
- Acantoma infundibular keratinizante
- Tricolemoma
- Tipo bulboso
- Tipo istmo catagénico
- Pilomatricoma

- Tricoblastoma
 - Tipo lazo
 - Tipo trabecular
 - Tipo granular celular
- Carcinoma matricial

Tumores sebáceos

- Quiste sebáceo ductal
- Hiperplasia nodular sebáceo
- Nevus sebáceo
- Adenoma sebáceo
 - Adenoma sebáceo simple
 - Adenoma glandular y componente ductular
- Epitelioma sebáceo
- Carcinoma sebáceo
- Hiperplasia nodular de las glándulas perianales
- Adenoma de las glándulas perianales
- Carcinoma de las glándulas perianales

Tumores de las glándulas sudoríparas

- Quiste apócrina
- Cistomatosis apócrina
- Cistoadenoma apócrino
- Adenoma apócrina
 - Adenoma glandular apócrino
 - Adenoma apócrino mixoide
 - Adenoma apócrino ductular canino

- Carcinoma apócrino
 - Cistoadenocarcinoma apócrino
 - Adenocarcinoma apócrino bien diferenciado
 - Carcinoma apócrino pobremente diferenciado
 - Adenocarcinoma apócrino mixto
- Carcinoma écrino.

Tumores epiteliales ungueales

- Quiste epitelial inclusión ungueal
- Papiloma escamoso invertido ungueal
- Keratoacantoma ungueal
- Carcinoma de células escamosas ungueal

TUMORES MESENQUIMALES

Tumores fibrocíticos

- Nevo colagenoso
- Dermatofibrosis nodular
- Dermatofibroma
- Fibroma
- Fibrosarcoma
- Mixoma
- Mixosarcoma

Tumores vasculares

- Hamartoma vascular escrotal
- Hemangioma
- Hemangiosarcoma

- Linfagioma
- Linfagiosarcoma

Otros tumores mesenquimales

- Lipomatosis
- Lipoma
- Fibrolipoma
- Lipoma infiltrativo
- Liposarcoma
 - Liposarcoma bien diferenciado
 - Liposarcoma mixoide
 - Liposarcoma pleomórfico
- Hemangiopericitoma
- Neuroma de la punta de cola
- Schwannoma
- Schwannoma maligno
- Leiomioma
- Leiomiosarcoma
- Rabdomiosarcoma
- Histiocitoma fibroso benigno
- Histiocitoma fibroso maligno
 - Tipo células gigantes
 - Tipo pleomórfico estoriforme
 - Tipo dermatofibrosarcoma

Tumores melanocíticos

- Melanocitoma
 - Melanocitoma completo
 - Melanocitoma dermal
 - Melanocitoma células globosas

- Lentigo
- Melanoma acantoma
- Melanoma maligno

Tumores histiocíticos y de células cebadas

- Histiocitoma cutáneo
- Mastocitoma
 - Grado 1
 - Grado 2
 - Grado 3

Tumores linfocíticos

- Plasmocitoma cutáneo extramedular
- Linfoma maligno
 - No epiteliotrópico
 - Epiteliotrópico
- Linfoma granulomatoso

4.4. TUMORES EPITELIALES.

4.4.1. Tumores epidermales.

a) Queratosis actínica.- resultan de la demasiada exposición solar, las lesiones se aprecian en la nariz, zona del vientre y alopecias, se aprecian como lesiones rosadas o escamosas, se consideran como malignas, las razas más afectadas son las razas blancas como el Dálmata, American staffordshire terrier, Beagle, Bassett hound.

b) Nevus pigmentado epidermal.- neoplasia benigna, aparecen como zonas ovoides y placas circulares pigmentadas circunscriptas en el vientre, tórax y miembros anteriores, además de ser congénitos hay una predisposición por los Pug y Schnauzers.

c) Papiloma escamoso.- Neoplasia benigna producida por un Papilomavirus, muestra lesiones verrucosas, generalmente en la cara y en la mucosa oral, afecta a los

animales jóvenes menores de 3 años de edad, presenta las variantes siguientes: papiloma exofítico, verruga plana y papiloma invertido.

d) Carcinoma de células escamosas.- es la neoplasia maligna más común de la piel canina, afecta a los animales de edad avanzada y raramente afecta a los cachorros, las lesiones se presentan como maculas o pápulas hiperqueratósicas de milímetros a centímetros de diámetro, se observa también alopecia, eritema y ulceración, son muy invasivos, las zonas más afectadas son la ventral y la región sub-ungueal. Las razas más afectadas son los Dálmatas, Bull terrier, Beagle, American staffordshire; existen varios tipos pero la mayoría de estos carcinomas son bien diferenciados y las metástasis no son frecuentes.

e) Carcinoma de células escamosas multicentrica “*in situ*”.- también conocida como enfermedad de Bowen, es muy rara en caninos, las lesiones son bien parecidas al carcinoma de células escamosas. Por su rareza existe muy poca literatura.

f) Carcinoma de células basales.- neoplasia de baja malignidad, originada en las células epiteliales de la capa basal de la epidermis, poco frecuente en caninos, afectan a caninos a partir de los 7 años, los tumores asientan con mayor frecuencia en la cabeza, cuello y tórax con lesiones bien delimitadas y solitarias. Existen tres variantes de carcinoma de células basales: sólido, keratinizante y de células claras. El sólido es común en gatos, el keratinizante es el más común en caninos y el de células claras es raro en caninos.

4.4.2. Tumores foliculares.

a) Quiste folicular.- son neoplasias benignas, se originan en el folículo y de acuerdo de su localización se clasifican en infundibular, catagénico que es común en caninos, el matricial no es común en caninos y el híbrido es la combinación de los tres tipos pero raramente se presenta en caninos.

b) Quiste dermoide.- raro en caninos, su localización es dermal o subcutáneo, mayormente se presenta solo y tiene la apariencia de un quiste folicular, afecta usualmente a animales jóvenes.

c) Hamartoma folicular.- suele confundirse con el nevo pigmentado, pero la diferencia está en que el nevo se encuentra circunscrito, mientras que éste muestra una agresividad expansiva en su crecimiento.

d) Tricoepitelioma.- neoplasia benigna rara en caninos, localizadas en la dermis, lesiones solitarias de crecimiento lento, se han descrito en Cocker spaniel, Bassett hound y Poodle.

e) Pilomatricoma.- neoplasia poco común en caninos, son sólidas a quísticas elevadas y bien delimitadas de la matriz folicular, a menudo sufren ulceración, suelen ser solitarias, aparecen en el cuello, tórax y lomo. No presentan metástasis.

f) Tricoblastoma.- neoplasias muy comunes y generalmente benignas, se originan en el germen tricoblástico (germen piloso primitivo), afectan a animales mayores de cinco años, las lesiones suelen ser solitarias y se localizan sobre la cabeza y el cuello y sobre todo en la base de la oreja, las metástasis son raras. Presentan tres variantes: tipo lazo, (más común en caninos), tipo trabecular (común en gatos) y el tipo granular muy raro.

g) Carcinoma matricial.- conocido también como Pilomatricoma maligno, es muy raro en caninos.

4.4.3. Tumores sebáceos.

a) Hiperplasia nodular sebáceo.- muy común en animales gerontes, las lesiones son blanquecinas, amarillas, firmes y alopecicas.

b) Adenoma sebáceo.- neoplasia benigna, muy común en caninos, la edad promedio es de 9 a 10 años, se localizan sobre los párpados y los miembros, las lesiones suelen ser solitarias bien delimitadas verrugosas, grasientas e hiperqueratósicas y a menudo ulceradas. Las razas con más predisposición son Beagle, Cocker spaniel, Poodle, Dachshund y Schnauzer miniatura.

c) Epitelioma sebáceo.- neoplasia común en los caninos adultos, las lesiones suelen ser firmes, solitarias, nodulares frecuentemente se ulceran y se presentan en la zona de la cabeza y cuello. Los Cocker spaniel y Poodle son las razas más afectadas y son potencialmente malignas.

d) Carcinoma sebáceo.- neoplasias malignas pero raras en caninos, usualmente se presentan como nódulos firmes, solitarios y a menudo ulcerados, afecta a animales mayores de 9 años y parece haber una predisposición por los Cocker spaniel.

e) Adenoma de las glándulas perianales.- neoplasias benignas muy comunes afectan a animales mayores de 9 años, los adenomas son 9 veces más frecuente en machos que en hembras, suelen ser múltiples y están influenciada por hormonas

androgénicas, se localizan principalmente en el perineo, pero también en el rabo, prepucio y región lumbosacra.

f) Carcinoma de las glándulas perianales.- neoplasias malignas pero no suelen ser comunes, su localización es exclusivamente perianales, se confunden con los adenomas, son firmes, difusos y suelen ulcerarse. La predisposición racial es para ambas neoplasias y las razas como Cocker spaniel, Bulldog, Samoyedo, Afgano y Dachshund son las más afectadas.

4.4.4. Tumores de las glándulas sudoríparas.

a) Quiste apócrina.- es poco común, resulta de la obstrucción del conducto de la glándula. Afecta animales adultos y gerontes, no hay predilección racial.

b) Cistomatosis apócrina.- rara en caninos, caracterizada por la presentación de racimos císticos dilatados de las glándulas sudoríparas, no existe predilección racial.

c) Cistoadenoma apócrino.- neoplasia benigna rara en caninos, derivada de la porción secretoria de la glándula, afecta animales mayores de 6 años, no hay predilección racial.

d) Adenoma apócrina.- tumor benigno raro en caninos, surge de la porción secretoria o ductal de la glándula, son solitarias y circunscritas, alopécicas pero no ulceradas, afectan a animales mayores de 6 años, no existe predilección racial.

e) Carcinoma apócrino.- neoplasia maligna, pero poco frecuente en caninos, las lesiones son solitarias, como nódulos firmes bien circunscritos de 1 a 10 centímetros de diámetro, su firmeza se debe al componente cartilaginoso, que muchas veces está presente, tiene cuatro variantes, posee un potencial metastásico medio, los reportes indican que lo sufren animales de 8 a 13 años y no existe una predilección racial.

f) Carcinoma écrino.- extremadamente raro en caninos, porque las glándulas écrinas están limitadas a las almohadillas plantares, que son en número bajo en comparación con las glándulas sudoríparas apócrinas, pero se sabe que son altamente metastásicos, aunque no se ha establecido una predilección por razas.

4.4.5. Tumores epiteliales ungueales.

a) Carcinoma de células escamosas ungueal.- nacen en el epitelio del lecho ungueal, son muy raros en caninos, se observan lesiones como deformidad digital, pérdida de la uña e invasión del periostio adyacente; la ulceración está presente, afectan a animales mayores de siete años. No se ha observado predilección racial.

4.5. TUMORES MESENQUIMALES.

4.5.1. Tumores fibrocíticos.

a) Nevo colagenoso.- es una lesión común en los caninos, caracterizada por el exceso de fibras colágenas en la dermis, usualmente aparece en solitario, como nódulos firmes de 1 centímetro de diámetro, hay alopecia y frecuentemente hiperpigmentación. Éstas lesiones ocurren comúnmente en la cabeza, el cuello y los miembros anteriores, afecta a animales de edad avanzada, no se sabe si hay predilección por raza.

b) Fibroma.- no son comunes en caninos, aparecen como nódulos firmes y solitarios, o masas circunscritas de forma ovoide. No existe predilección racial.

c) Fibrosarcoma.- neoplasia maligna, de forma irregular y difusa, van desde 1 centímetro hasta los 15 centímetros de diámetro, se presenta en animales gerontes de más de 12 años de edad, no existe una predilección racial.

d) Mixosarcoma.- neoplasia maligna pero de presentación muy baja en caninos, se presentan como masas difusas y pobremente circunscritas en la dermis, su capacidad metastásica es baja, no se conoce predilección racial.

4.5.2. Tumores vasculares.

a) Hemangioma.- neoplasia benigna del endotelio vascular, común en caninos, suelen ser solitarias y bien circunscritos, no se conoce predilección racial.

b) Hemangiosarcoma.- neoplasias muy malignas del endotelio vascular, pero no son comunes en los caninos, se presume que los caninos no pigmentados y de manto corto tienen mayor predisposición para sufrir ésta enfermedad, existe una predisposición racial y entre ellas destacan los Dálmatas, Beagle, y American staffordshire.

c) Linfangiosarcoma.- es una neoplasia maligna extremadamente rara en caninos, se reportó que animales jóvenes sufrieron ésta neoplasia. No existen datos de predisposición racial.

4.5.3. Otros tumores mesenquimales.

a) Lipoma.- tumor benigno de tejido adiposo muy común en caninos, las lesiones son masas subcutáneas bien circunscritas y de forma ovoide, afecta a animales a partir de los 8 años, no existe una predilección racial.

b) Liposarcoma.- neoplasia maligna del tejido adiposo, poco comunes en caninos, afecta a los caninos mayores de 12 años, su frecuencia de metástasis es baja.

c) Hemangiopericitoma.- neoplasia subcutánea común en caninos, desarrollada en los pericitos vasculares de la dermis, presenta lesiones solitarias multilobuladas firmes y bien circunscriptas, hay alopecia, hiperpigmentación y ulceración, las lesiones se presentan frecuentemente en los miembros anteriores, posee una capacidad metastásica considerable.

d) Schwannoma.- son neoplasias benignas raras en caninos, ubicadas en la dermis y el subcutis, aparecen como masa lobuladas firmes circunscriptas de 2 a 5 centímetros de diámetro. Afecta a los animales de edad media y no existe predisposición racial.

e) Schwannoma maligno.- es una neoplasia como su nombre indica, ubicada en la dermis y subcutis de los caninos, pero de presentación rara. Aparecen como lesiones solitarias lobuladas, pobremente circunscritas de consistencia variable. Afecta animales de edad media para gerontes, no existe una predilección racial.

f) Leiomioma.- neoplasia rara en caninos, afecta los músculos pili erectores y los músculos de la dermis profunda, son solitarios bien circunscriptos de forma ovoide. Suelen presentarse en la cabeza, cuello y vulva, no se ha reportado predilección racial.

g) Leiomiosarcoma.- neoplasia maligna rara en caninos, las lesiones son masas no circunscritas y ulceradas menores de 2 centímetros de diámetro, se cree que la metástasis es baja, tampoco se ha demostrado predisposición racial.

e) Rbdomiosarcoma.- son tumores malignos derivados de las células del músculo estriado. El rbdomiosarcoma cutáneo aparece como un nódulo subcutáneo o una lesión tumoral excrecente de consistencia firme, que infiltra profundamente adhiriéndose a los tejidos subcutáneos. La localización más frecuente es la cara, sobre todo alrededor de la órbita y el pabellón auricular. Éstas neoplasias tienden a ser invasivas localmente, sin embargo puede haber metástasis a pulmones, hígado, bazo, riñones y glándulas adrenales. No se ha establecido una predilección racial, pero afecta a animales jóvenes.

4.5.4. Tumores melanocíticos.

a) Melanocitoma.- son relativamente comunes en caninos, se presentan como maculas solitarias circunscriptas pigmentadas (marrón a negro), alopécicos y menores de 1 centímetro de diámetro, la edad promedio de aparición de ésta neoplasia son los 8 años, aunque también se ha reportado en caninos jóvenes. Se ha visto la incidencia en razas blancas y negras.

b) Melanoma maligno.- neoplasia cutánea poco común en caninos, las lesiones van desde milímetros hasta los 10 centímetros, son de color marrón a negro, la ulceración es común en éstas lesiones, aparecen en los párpados y dedos; la edad promedio va desde los 9 años hasta caninos jóvenes de 3 años, entre las razas con más predisposición están Cocker spaniel, Scottish terriers y Aireadle terriers.

4.5.5. Tumores histiocíticos y de células cebadas.

a) Histiocitoma cutáneo.- es una neoplasia común en caninos, las lesiones son de rápido crecimiento, eritematosas y alopecicas de 0.5 a 1 centímetro de diámetro, aparecen en todo el cuerpo, el rango de edad es de 6 meses a tres años y la frecuencia baja con el aumento de la edad. Ente las razas más predispuestas están, el Doberman, Schnauzer, Scottish terrier, Bóxer y Cocker spaniel.

b) Mastocitoma.- neoplasia maligna común en caninos, las lesiones se muestran alopecicas, eritematosas, pobremente circunscriptas de unos milímetros a unos centímetros de diámetro, se presentan por todo el cuerpo. La edad promedio es de 8 años aunque se han reportado casos de animales de 4 meses, y entre las razas más predispuestas están los Bóxer, Boston terrier, Bullterrier, American stafordshire, Fox terrier, Bulldog inglés y Dachshund. La metástasis no es común.

4.5.6. Tumores linfocíticos.

a) Linfoma maligno.- es la neoplasia hematopoyética más común en caninos pero con lesiones muy raras en la piel, denominada “linfoma cutáneo”, se presentan en animales con 9 a 11 años en promedio, y parece no haber predilección por razas.

V. INMUNOHISTOQUIMICA

5.1 HISTORIA.

La historia de la inmunohistoquímica comenzó en los años 40, cuando se desarrollaron las técnicas de inmunofluorescencia. No obstante, la inmunofluorescencia presenta varias limitaciones, requiere microscopios de luz ultravioleta de alto costo, material fresco o especialmente procesado, los preparados pueden conservarse por un periodo limitado y la citomorfología tisular resulta pobremente definida, y es debido a éstas razones, la inmunofluorescencia no tuvo, en general, aceptación en los laboratorios de patología, salvo en aplicaciones especiales (Gimeno *et al.*, 2002).

Estos inconvenientes estimularon la búsqueda de nuevos métodos y es así que el empleo de anticuerpos marcados con enzimas se desarrollo en la década del 60 (principalmente la peroxidasa en rábano picante) esto permitió la localización y observación, mediante el microscopio, de proteínas (determinantes antigénicos) en la intimidad de células y tejidos fijados y procesados por los métodos histológicos convencionales, asimismo la obtención de cortes permanentes. Los grupos de Avrameas (1969) y de Nakane (1966) fueron pioneros en los primeros métodos inmunohistoquímicos. En la actualidad, la inmunohistoquímica se ha expandido de forma explosiva en todas las ramas de las ciencias biológicas y es una de las técnicas básicas en histopatología, y su empleo en el diagnóstico patológico es creciente (Gimeno *et al.*, 2002).

La inmunohistoquímica se ha convertido en una herramienta de diagnóstico práctica y ampliamente usada en patología humana desde hace más de tres décadas, como se menciona anteriormente. No obstante, su aplicación en el diagnóstico veterinario no es común, debido a la falta de anticuerpos específicos. Para superar éste inconveniente, están siendo aplicados anticuerpos contra antígenos de tejidos humanos que presentan reacción cruzada contra antígenos de tejidos animales.

La inmunohistoquímica práctica, se basa en un método de anticuerpos y enzimas conocido como “inmunoperoxidasa” y en ésta técnica, el tejido congelado,

desparafinado y rehidratado se recubre con un anticuerpo primario bien caracterizado y específico dirigido contra un antígeno de valor diagnóstico. Tras una incubación controlada y la posterior eliminación del reactivo primario, los cortes del tejido se exponen a un segundo anticuerpo específico para el primero, y éste puede marcarse con biotina, proporcionando un puente para la posterior unión de un complejo avidina-biotina-peroxidasa que completa el conjunto inmunoquímico. La enzima peroxidasa cataliza una reacción de oxidación-reducción en presencia de un colorante que precipita en el lugar donde se ha fijado el anticuerpo, pudiéndose comprobar la presencia del antígeno en cuestión con un simple microscopio óptico (Pfeifer y Wick, 1996).

A pesar de los grandes esfuerzos realizados hasta hoy, no se han obtenido hasta el momento marcadores o anticuerpos que permitan evaluar el grado de malignidad de las neoplasias. No obstante en algunos tumores se han encontrado correlación entre la expresión de ciertos antígenos y el grado de malignidad inferido del pronóstico clínico y/o histopatológico.

Entre los principales antígenos a detectar de acuerdo con Gimeno (2005) encontramos a:

- ✦ **Microorganismos:** es de gran utilidad en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, ya que el agente y sus antígenos pueden identificarse en los cortes de tejido, apreciando su distribución y relación con las lesiones. En medicina humana existen anticuerpos comerciales para varios agentes, pero en el diagnóstico veterinario el número de anticuerpos disponibles recién está creciendo.
- ✦ **Depósitos inmunes:** la detección de anticuerpos depositados en los tejidos es un buen indicador para el diagnóstico de enfermedades autoinmunes. Entre las enfermedades están el lupus eritematoso, las glomerulonefritis y la amiloidosis, que es una enfermedad caracterizada por el depósito de proteínas, que tienen características químicas y físicas en común; en patología veterinaria es conocida la amiloidosis sistémica en caninos y gatos; los anticuerpos para amiloidosis humana pueden aplicarse para el estudio de la amiloidosis de los animales.
- ✦ **Hormonas:** su uso es general en la gran mayoría de enfermedades endocrinas. Las firmas comerciales ofrecen anticuerpos contra muchas hormonas peptídicas; éstas no tienen especificidad de especie, lo que permite su empleo en el estudio de enfermedades animales.

- ✦ **Marcadores neurológicos:** dentro de estos se encuentran los neurofilamentos y la proteína ácida fibrilar glial, que son marcadores específicos de neuronas y astrocitos; la enolasa específica neuronal, que es una enzima presente en todas las neuronas; la proteína S-100 que es detectable en células gliales, células de Schwann, melanocitos y algunas células extraneurales. La proteína S-100 es un excelente marcador para melanomas especialmente los amelanicos, cuyo diagnóstico patológico no es fácil. En medicina humana existen anticuerpos comerciales para marcadores neurológicos que se pueden emplear en tejidos animales sin ningún problema.
- ✦ **Proteínas superficiales leucocitarias:** en medicina humana se han identificado numerosos marcadores superficiales de leucocitos, y se comercializan sus anticuerpos monoclonales específicos. Estos marcadores se clasifican por medio del sistema CD “cluster designation” (por sus siglas en inglés). En animales, varios marcadores leucocitarios han sido identificados, entre ellos están los del ratón, bovino, ovino y algunos se consideran equivalentes a los antígenos CD de medicina humana, pero la información aún es insuficiente para la aplicación de los anticuerpos comerciales humanos en el diagnóstico veterinario.
- ✦ **Filamentos intermedios:** la distribución tisular de estos filamentos es específica, y por lo tanto constituyen una herramienta muy efectiva para determinar el origen de los tumores. Un ejemplo de ellos son las citoqueratinas que son marcadores de células epiteliales y tumores de origen epitelial, que como sabemos muestran una amplia variedad en su distribución. Por ésta razón es importante conocer el espectro de distribución del subtipo de citoqueratina que reacciona con cada anticuerpo de origen comercial. Los filamentos de vimentina que se consideran el tipo más primitivo, están ampliamente distribuidos en los tejidos mesenquimáticos normales y tumorales. Los filamentos de desmina que constituyen un excelente marcador para diagnóstico de tejidos musculares. Los anticuerpos de uso en medicina humana pueden ser aplicados en el diagnóstico veterinario.
- ✦ **Productos oncogénicos:** en los últimos años numerosos oncogenes han sido aislados a partir de tumores y virus oncogénicos tanto en el hombre como en los animales. El empleo de modernas técnicas de biología molecular, han permitido la síntesis de productos oncogénicos en el laboratorio; y la elaboración de anticuerpos dirigidos contra estos han permitido investigar su presentación y distribución en células

normales y neoplásicas. En medicina veterinaria los estudios en ésta dirección se encuentran recién en sus comienzos.

5.2. ANTÍGENOS.

Los antígenos tienen dos características principales. La primera es la “immunogenicidad,” la cual se refiere a la habilidad de inducir la formación de anticuerpos. La segunda es la “reactividad específica”, que significa que el antígeno solo puede reaccionar con el anticuerpo que lo hizo ser producido. La reacción entre el antígeno y anticuerpo es una de las más específicas en la biología, y es la razón por la cual, las reacciones inmunohistoquímicas son más precisas que las técnicas histoquímicas ordinarias (Bourne, 1983).

El antígeno entonces, es una sustancia extraña al hospedero que estimula la formación de un anticuerpo específico, y éste solo reaccionará con el. Ésta reacción produce la formación de complejos inmunes. Estos complejos pueden hacerse muy grandes de forma que precipiten y pueden ser medidos entonces por varias técnicas (Bourne, 1983).

5.3. ANTICUERPOS.

Un anticuerpo es una proteína que está formada en respuesta a la exposición de un antígeno, y reacciona específicamente con éste, para formar complejos inmunes en el cuerpo o en el laboratorio. La producción de anticuerpos es la reacción del cuerpo a un material extraño (un antígeno), y es producido para sacar éste invasor del cuerpo.

Los anticuerpos o gammaglobulinas pueden ser divididos en cinco clases basados en el peso molecular, estructura, función y otros criterios. Las clases son IgA, IgD, IgE, IgG y IgM. La mayoría de soluciones de anticuerpos utilizados en marcapos inmuistoquímicos contienen mayormente anticuerpos tipo IgG (Bourne, 1983).

5.4. PRODUCCION DE ANTICUERPOS.

El primer paso para la producción de anticuerpos en el laboratorio, es la purificación del antígeno. Una gran fuente de antígenos es el suero, la orina, y tejidos, los cuales sufren procedimientos como precipitación, centrifugación, diálisis,

cromatografía y electroforesis para obtener un antígeno de alta pureza. El antígeno es luego inyectado a un animal, de diferentes especies que la fuente del antígeno. El animal identificará al antígeno como una molécula extraña y producirá un anticuerpo dirigido específicamente contra éste. La producción de anticuerpos comienza veinte minutos después de la inyección, ésta se puede prolongar por largo tiempo, a través de inyecciones constantes de antígenos para mantener una buena producción de anticuerpos (Bourne, 1983).

5.5. ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Una sola molécula de antígeno contiene muchas características ó determinantes antigénicos, también denominados epítopes. Cuando el antígeno es inyectado en el animal, el linfocito B, será la célula encargada de la producción de anticuerpos. Un linfocito B puede formar anticuerpos contra solo un antígeno ó epítope. Como hay tantas células B produciendo anticuerpos contra éste epítope, estos serán llamados “anticuerpos policlonales” (Bourne, 1983).

En muchas técnicas es deseable tener un anticuerpo específico para cada epítope, y como éste es producido por una sola línea de células B (llamado clon), es llamado “anticuerpo monoclonal” (de una sola línea celular). La obtención de suficientes cantidades de anticuerpos monoclonales, se realiza de la misma forma que en la obtención de anticuerpos policlonales. Un ratón es inyectado con un antígeno purificado y comenzará a producir anticuerpos contra éste. Cuando grandes cantidades de anticuerpos estén siendo producidas, el ratón será sacrificado y luego se obtendrá el bazo conteniendo grandes cantidades de células B. Una suspensión de células B será unida con las células del mieloma en un medio que causara la fusión celular. Las células no fusionadas o inadecuadamente fusionadas morirán, mientras que los hibridomas deseados vivirán y crecerán en cultivos. Las hibridomas son clasificados para determinar cual clon está produciendo los anticuerpos contra el deseado epítope. Éste es el procedimiento que lleva más tiempo y el más difícil. Una vez que la línea celular apropiada es identificada puede ser inyectada otra vez al ratón donde producirá un tumor. El fluido ascítico del tumor contendrá altas concentraciones de anticuerpos, así como otras inmunoglobulinas y proteínas del ratón (Bourne, 1983).

5.6. FIJACIÓN DE MUESTRAS Y DIGESTIÓN ENZIMÁTICA.

Según lo mencionado por Bourne (1983), la fijación es el aspecto más crítico en las técnicas de inmunoperoxidasa. Las muestras y/o tejidos solo tienen una cantidad finita de antígenos y cada paso en el procesamiento de la muestra destruye estos antígenos. La técnica de la inmunoperoxidasa sólo puede localizar los antígenos reconocibles por los anticuerpos y no los antígenos alterados en su morfología.

No existe un fijador ideal que preserve todos los antígenos en todas las muestras o tejidos. El proceso de fijación se debe controlar, al extremo de identificar el tiempo de inmersión más corto que asegure la preservación de la morfología de la muestra y de los antígenos. Al contrario inmersiones prolongadas en fijadores pueden destruir los antígenos que son necesarios para la clasificación patológica.

La sobrefijación de tejidos de las muestras en formalina causa la formación de un exceso de enlaces aldehídos, el cual ocultará los antígenos y evitará su localización por el anticuerpo primario. Para desenmascarar los sitios antigénicos, los enlaces aldehídos pueden ser digeridos con enzimas proteolíticas favoreciendo la reacción inmunohistoquímica. El tiempo de digestión se define dependiendo del tiempo en que el tejido estuvo expuesto al fijador. Las enzimas proteolíticas más usadas son: tripsina, ficina, pepsina, pronasa y DNAasa.

Ventajas

- ⊙ La digestión del tejido puede reducir la tinción no específica, y amplificar la reacción inmunológica deseada.
- ⊙ Permite que los anticuerpos se expresen con diluciones mayores.
- ⊙ Facilita el uso de una multitud de anticuerpos, en tejidos fijados con formalina.

Desventajas

- ⊙ Puede causar la pérdida del tejido.
- ⊙ Éstas digestiones solamente ayudan a los tejidos que han sido fijados excesivamente.
- ⊙ Aumentan otro paso a la técnica inmunohistoquímica.

5.7. PRINCIPALES TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS.

Todos los métodos inmunohistoquímicos se basan en la conjugación de distintos marcadores con inmunoglobulinas. Luego de producida la unión antígeno-anticuerpo, el marcador es localizado de distintas maneras, generalmente por una reacción

tintorial; de esa manera se logra detectar en que estructuras se localiza el antígeno problema. Las técnicas más difundidas se basan en la marcación con peroxidasa de rábano (enzima del rábano), con fosfatas alcalina, o con oro coloidal. (Gimeno *et al.*, 2002).

En todos los métodos inmunoenzimáticos se utiliza una reacción enzima sustrato que transforma un cromógeno incoloro en un producto final coloreado. La eficiencia catalítica de éstas enzimas es extremadamente alta, 1 mol de enzima puede catalizar la transformación de 10000 a 100000 moles de sustrato por minuto.

Gimeno *et al.*, (2002), describen como principales técnicas inmunohistoquímicas a la de inmunoperoxidasa y la de fosfatasa alcalina y dentro de ellas algunas variantes que describiremos en el siguiente punto.

5.8. TÉCNICA DE INMUNOPEROXIDASA.

Permiten la visualización de los componentes de la célula en una variedad de especímenes incluyendo secciones de parafina, secciones congeladas, frotis, improntas. Permiten también la determinación del tipo celular que está comprometido en la producción de los antígenos en cuestión (tejidos normales o neoplasias), niveles de sustancia producida, identificación de células de origen desconocido y la determinación de la diferenciación del tumor.

Todos los métodos de éste grupo tienen en común el empleo de la peroxidasa, una vez que la ésta se ha localizado en los tejidos, su presencia es detectada mediante el revelado de la misma. Ello se logra haciendo reaccionar a la enzima (E) con un sustrato (S), con lo cual se obtiene un producto (P). En las técnicas de inmunoperoxidasa, la peroxidasa (Px) va interactuar con el sustrato (H₂O₂) originando un complejo y éste a su vez reacciona con un donante de electrones, dando como resultado final un producto coloreado (polímero insoluble) y agua.



La enzima que cataliza la reacción no se gasta; queda libre y en condiciones de reaccionar nuevamente con H₂O₂ para formar otra molécula coloreada y así sucesivamente. Existen distintos cromógenos capaces de reaccionar con el complejo Px.H₂O₂ y dar un precipitado coloreado soluble.

El cromógeno más usado es la 3',3' diaminobencina (DAB); es específico para la Px, barato, fácil de conseguir y origina un precipitado marrón, visible con el microscopio óptico y muy estable, permitiendo la realización de cualquier tratamiento histológico o histoquímico posterior.

La enzima peroxidasa tiene las siguientes **ventajas**:

- ⊙ Su pequeño tamaño no impedirá la ubicación de anticuerpos hasta en los sitios más difíciles.
- ⊙ Es fácil de obtener en formas altamente purificadas, y así la oportunidad de contaminación es mínima.
- ⊙ Es estable, y por consiguiente puede permanecer invariable durante su obtención, almacenaje y aplicación.
- ⊙ Solo pequeñas cantidades están presentes en los tejidos y la actividad endógena de la peroxidasa es reducible fácilmente.
- ⊙ Hay una gran disponibilidad de cromógenos que pueden ser usados por la peroxidasa para formar un producto final coloreado que precipitará al lado del antígeno a ser localizado.
- ⊙ Es económico.

5.8.1. Actividad endógena de la peroxidasa.

La reacción “sustrato cromógeno y peroxidasa” usada para visualizar la reacción, no puede ser distinguida entre la enzima usada para la localización del antígeno celular, y la actividad enzimática similar presente en la muestra antes del procedimiento. Ésta actividad endógena de la peroxidasa está confinada mayormente a las células rojas y blancas. Si no es quitada antes de añadir la enzima marcadora, se observara una marcación positiva que es debido no solamente al antígeno específico, sino también debido a la actividad de la peroxidasa endógena ya presente en la muestra.

La mayoría de los tejidos no contienen gran cantidad de células sanguíneas ni peroxidasa endógena, y ésta actividad es usualmente confinada a muestras sangrientas.

Hay muchas maneras de inhibir la actividad de la peroxidasa endógena, y éstas técnicas deberían ser hechas al comienzo del procedimiento de marcaje. La técnica más fácil y rápida es la de poner de 4 a 6 gotas de peróxido de hidrógeno al 3% directamente en la muestra e incubarlo por 5 minutos antes de su proceso.

5.8.2. Método directo.

Es la manera más simple de localizar un antígeno, usando un anticuerpo directo específicamente contra éste. En el método directo de la inmunoperoxidasa, éste anticuerpo específico, está químicamente conjugada a la peroxidasa. Éste conjugado es aplicado al espécimen y reaccionará con el antígeno. Luego es aplicado el sustrato, y éste producirá un producto final coloreado precipitando en el sitio y marcando la localización del antígeno.

La técnica directa puede ser realizada muy rápida con bajas probabilidades de reacciones no específicas. El principal inconveniente es que por cada antígeno a ser localizado es necesario un diferente anticuerpo conjugado. Si el anticuerpo no puede ser conjugado, entonces el usuario puede hacer la conjugación por sí mismo ó escoger otro procedimiento. Los antígenos más comúnmente identificados son IgG, IgA, IgM, C3 y C4.

5.8.3. Método indirecto.

En la aplicación indirecta, un anticuerpo localizará al antígeno en el espécimen. Para localizar ésta adhesión, es necesario un segundo anticuerpo, que resulta ser un anti-anticuerpo conjugado con peroxidasa, específico contra el primer anticuerpo, posteriormente el sustrato es agregado para localizar la reacción. Por ejemplo, si el primer anticuerpo fue hecho en un conejo, el segundo anticuerpo debe ser dirigido específicamente contra éste anticuerpo del conejo resultando ser un anti-anticuerpo.

Éste método es más versátil que el método directo porque hay variedad de anticuerpos primarios hechos en los mismos animales que pueden ser usados con un mismo anticuerpo secundario conjugado. Por eso, éste proceso puede ser usado con ventaja con cualquier anticuerpo primario siempre y cuando un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa esté disponible. Sin embargo, el procedimiento toma aproximadamente el doble de tiempo que en el método directo, y hay mayor oportunidad para que ocurran reacciones no específicas, pero la sensibilidad es 4 ó 5 veces mayor que en el método directo.

5.8.4. Método indirecto de tres pasos.

En éste método, un segundo anticuerpo marcado con la enzima se agrega a la técnica anteriormente descrita. Los dos anticuerpos marcados se aplican secuencialmente. El agregado de un tercer anticuerpo amplifica aún más la señal, dado que más anticuerpos son capaces de combinarse al reactivo secundario

previamente unido. Éste procedimiento es particularmente útil para la coloración de antígenos con un número limitado de epítopes. Éste método proporciona una manera simple de incrementar aun más la intensidad de coloración.

5.8.5. Método de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP).

Éste método utiliza tres agentes: anticuerpos primarios, anticuerpos secundarios y el complejo PAP compuesto por tres moléculas de peroxidasa y dos de inmunoglobulina antiperoxidasa. El anticuerpo primario es específico para el antígeno. El secundario o anticuerpo “enlace” es capaz de unir al primario y al complejo PAP, porque ambos son producidos en la misma especie animal.

El hecho de que el método de PAP es aplicable a muestras fijadas en formalina y embebidos en parafina evita la necesidad de tejidos congelados y por lo tanto permite estudios retrospectivos.

5.8.6. Método avidina-biotina.

La técnica de avidina-biotina representa una de los más recientes desarrollos de inmunoperoxidasa. Ésta técnica se fundamenta en la fuerte afinidad que existe entre la avidina y la biotina, entre ambas sustancias existe una afinidad que es 1 millón de veces más fuerte que la reacción antígeno anticuerpo. La avidina es una glicoproteína de alto peso molecular presente en la clara de huevo; la biotina es una vitamina del complejo B de bajo peso molecular. La biotina se puede conjugar fácilmente con la fracción Fc de las inmunoglobulinas, sin afectar en nada la capacidad de estos para unirse a los antígenos específicos. La biotina también puede acoplarse a la peroxidasa y varias de ellas pueden acoplarse a una misma molécula de peroxidasa. En una molécula de anticuerpo se pueden conjugar hasta 150 moléculas de biotina, y la avidina posee cuatro sitios por los que se puede unir a la biotina de manera irreversible.

En ésta técnica se usan cuatro reactivos, el primero es el anticuerpo primario no conjugado, seguido por un segundo anticuerpo conjugado con biotina y capaz de unirse al anticuerpo primario. El tercer reactivo es la avidina, y el cuarto es la peroxidasa biotinilada.

5.8.7. Método de la streptavidina-biotina marcada.

La avidina tiene tendencia a unirse en forma inespecífica a membranas celulares y ácidos nucleicos, pero éste inconveniente ha sido subsanado utilizando la

streptovidina, una proteína aislada del *Streptomyces avidini* que posee una afinidad a la biotina equivalente a la avidina de la clara de huevo, pero muestra menos tendencia a unirse a elementos celulares.

En el primer paso se incuba el anticuerpo primario, luego con el anticuerpo biotinilado y por último con una solución de Streptovidina marcada con peroxidasa.

5.9. TÉCNICA DE FOSFATASA ALCALINA.

5.9.1. Método de la fosfatasa alcalina-antifosfatasa-alcaldina (APAAP).

Ésta técnica se basa en el empleo de un complejo inmune compuesto por dos moléculas de fosfatasa alcalina (AP) y una de inmunoglobulina antifosfatasa alcalina. Al igual que la técnica de PAP, el método APAAP utiliza un complejo inmune soluble; la principal ventaja de éste procedimiento radica en la ausencia de interferencia con la actividad de la peroxidasa endógena. En consecuencia su empleo resulta particularmente recomendable en los frotis sanguíneos y en cortes de alta concentración de peroxidasa endógena como el bazo y medula ósea.

5.10. MARCACIÓN INESPECÍFICA.

El marcaje positivo de una muestra que no es el resultado de la unión antígeno-anticuerpo es determinado como marcaje inespecífico. La causa más común, es el acoplamiento de proteínas de colágeno y de tejido conectivo en la muestra. Los anticuerpos son proteínas y la primera solución de proteínas aplicada al tejido o muestra son los anticuerpos primarios, y estos pueden enlazar inespecíficamente a estos sitios. El anticuerpo secundario se puede unir al anticuerpo primario y la reacción de la peroxidasa ocurrirá. Si existe un marcaje positivo en estos sitios no será debido a la localización de los antígenos de los tejidos o muestras, si no a los acoplamientos inespecíficos de los anticuerpos a proteínas de colágeno y tejido conectivo.

La manera más efectiva de prevenir éste marcaje inespecífico es añadiendo una solución de proteína inocua a la muestra o tejido antes de aplicar el anticuerpo primario. Ésta proteína llenará los campos cargados, no dejando ningún espacio para absorción del anticuerpo primario. La principal fuente de soluciones de proteínas, es el suero no inmune de la misma especie animal que produjo el anticuerpo secundario.

Esto evitara un marcaje positivo debido a la unión del anticuerpo secundario a componentes en la solución de proteínas.

El suero no inmune es usado concentrado a diluciones de 1:5 a 1:20. Además de la adición de 2.5% albúmina de suero de bovino (BSA) incrementará la concentración de proteína y luego reducirá el marcaje inespecífico.

Otras causas de marcaje no específico, son la disolución de anticuerpos inapropiados, eliminación incompleta de la parafina, enjuague inapropiado de las muestras y una incubación con sustratos incorrectos.

5.11. INTERPRETACIÓN.

Bourne (1983), dice que el aspecto más difícil del método de inmunoperoxidasa está en la evaluación del producto acabado. Mientras que la interpretación actual depende del antígeno localizado, otros factores también juegan un rol importante. Como son la condición del tejido, extensión de fijación y posibles artefactos, y su relación para una interpretación acertada.

5.11.1. Características del marcaje.

A la marcación de antígenos celulares vía la enzima peroxidasa en combinación con un anticuerpo específico, es añadido un cromógeno que reaccionara con la enzima y precipitara en el sitio del antígeno. La cantidad de cromógeno precipitado y la intensidad de la reacción, es proporcional al monto de antígeno presente. Los antígenos contenidos en células y componentes celulares serán contrastados por un contador de marcaje.

Cuando se observa una muestra marcada y depósito del cromógeno coloreado indican la presencia del antígeno y representa marcaje positivo específico. Hay tres patrones importantes de marcaje específico de antígenos que puede ser observados: citoplásmico, nuclear y superficie. Muchos de los antígenos son encontrados en el citoplasma de células. Dependiendo en el contenido del antígeno, la marcación puede envolver todo el citoplasma o solamente una parte. La mayoría de los virus ocupan los núcleos de las células, y puede localizarse allí por éste método. Marcaje positivo por marcadores superficie aparecen en la periferia celular.

La marcación puede ser dividida en patrones focales y difusos. El marcaje focal estará localizado en ciertas áreas discretas de la célula. El marcaje difuso envuelve grandes áreas de la célula, y con frecuencia a muchas de las células adyacentes.

Algunos antígenos producen patrones de marcaje característico que ayudan a hacer la interpretación más fácil.

No todas las células contienen la misma cantidad de antígeno, y por tanto el marcaje variara de intensidad. La ausencia de ésta variable de marcaje entre células sugiere marcaje no específico.

Mientras el marcaje específico es localizado en células, el marcaje no específico es usualmente encontrado en el colágeno y tejidos conectivos. El marcaje inespecífico no será reducido a una sola célula, por el contrario envuelve grupos celulares con un patrón no particular. La excepción a esto, es la actividad endógena de la peroxidasa que usualmente está reducido a células rojas y blancas.

La interpretación es una comparación del marcaje específico e inespecífico de la muestra con el control. La fuente del tejido, las características del antígeno localizado, y el procedimiento usado debe ser considerada también. Sólo cuando todos estos factores han sido tomados en cuenta puede evaluarse el patrón de marcaje.

5.11.2. Efectos sobre la muestra.

El protocolo de fijación debería de haber concebido la producción de una buena morfología celular sin destruir el antígeno. Es difícil de lograr éste balance perfecto, por la diferencia en los tipos de muestra y antígeno. Una débil fijación puede preservar el antígeno, pero la morfología puede ser pobre, causando dificultades en la interpretación. En cambio, fijaciones prolongadas pueden producir mejor morfología, pero grandes cantidades de antígenos puede ser alterados o destruidos, y si algunas porciones de tejidos no son expuestos al fijador, resultará en marcaje inespecífico.

La interpretación de los patrones de marcaje, deberán ser hechos en áreas propiamente fijadas y procesadas. La marcación en porciones de muestra pobremente fijadas será inespecífico y deberá ser ignorado.

La interpretación de muestras que han sido tratadas con enzimas proteolíticas puede ser difícil al principio. Desde que la digestión expone los sitios antigénicos, la marcación será más intensa que la observada en muestras no digeridas. Es importante que los controles positivos y negativos sean digeridos junto con las muestras para la comparación e interpretación.

5.11.3. Artefactos.

Hay muchos artefactos que pueden encontrarse en las muestras que producirá marcaje e interferirá con la correcta interpretación. Estos pueden ser divididos en cuatro categorías: precipitados, tejido artefacto, célula artefacto y resumen de marcaje específico.

Varios precipitados son confundidos con marcaje positivo. Estos pueden distinguirse por el hecho que ellos no están reducidos entre células, al contrario, están propagados al azar a través de la muestra. Muchas veces se aprecian gránulos de cromógenos no reactivos, y esto sucede cuando éstas soluciones no son adecuadamente filtradas. Otro tipo de precipitado es relacionado a la fijación. El uso de fijadores no bufferados, ocasionará un precipitado negro. Tejidos artefacto usualmente ocurren cuando las secciones son cortadas, y si son muy gruesas, los reactivos pueden quedar atrapados entre las capas de las células. Esto también pasa en áreas donde el tejido es doblado. Cualquier marcaje que ocurra en el borde de la muestra o junto a las marcas de cuchillo es siempre inespecífico.

Marcación positiva en células necróticas y aplastadas son siempre inespecíficas. Éstas células se distinguirán de las células verdaderas positivas por el hecho de que todas ellas se marcan con la misma intensidad. Células que sufrieron autólisis, y tejido hemorrágico también exhibirán éstas clases de marcaje inespecífico. Sólo el patrón de marcación de células viables deberá de considerarse para la interpretación.

6.1. CITOQUERATINAS EN LAS LESIONES NEOPLÁSICAS.

Cuadro 3. Citoqueratinas en diferentes tumores orgánicos (Fuente:García, 2002)

Queratina 7 Positiva Adenocarcinomas de origen glandular pulmón, ovario, mama, glándula salival, útero, páncreas, tiroides, colangiocarcinoma, carcinoma transicional. Pueden ser positivos, pero no es lo común adenocarcinoma del colon y del recto, adenocarcinoma gástrico, carcinomas neuroendocrinos (20-40%), carcinoma del cuello uterino, carcinomas del riñón (papilar, de los túbulos colectores, cromóforo), mesoteliomas (60%).
Queratina 20 Positiva Cáncer del colon, carcinoma de células de Merkel, carcinoma de células transicionales, carcinoma gástrico, adenocarcinoma del páncreas, enfermedad de Paget del ano, adenocarcinoma tipo intestinal de los senos nasales.
Queratina 7 y Queratina 20 Positivas Carcinoma transicional de la vejiga urinaria, carcinoma del páncreas, colangiocarcinoma y cáncer gástrico.
Queratina 7 y Queratina 20 Negativas Carcinoma de la corteza suprarrenal, hepatoma, carcinoma de la próstata, tumores carcinoide del pulmón y del tubo digestivo y el carcinoma de células claras del riñón.
Queratina 7 Positiva y Queratina 20 Negativa Cáncer de la mama, del pulmón, el endometrio, ovario, glándulas salivales, tiroides y el 75% de los mesoteliomas.
Queratina 7 Negativa y Queratina 20 Positiva Carcinoma colorectal, carcinoma de células de Merkel y adenocarcinoma gástrico.
Otras Queratinas Queratina 5/6: carcinoma epidermoide, carcinoma basocelular, carcinomas de glándulas salivales, adenocarcinomas con diferenciación epidermoide y el 84% de los mesoteliomas bifásicos. Queratina 14: carcinoma epidermoide y carcinoma basocelular, tumores mixtos de glándulas salivales, timoma. Queratina 19 (de muy bajo peso molecular): carcinoma de células claras del riñón y carcinoma papilar de tiroides. Queratina 8 y 18 (de bajo peso molecular): carcinoma de células transicionales y

mesotelios. También se detectan en tumores de músculo liso y en fibroblastos.

Está establecido que los epitelios simples y sus carcinomas normalmente exhiben una composición más sencilla de Ck que los epitelios estratificados y el carcinoma de células escamosas. Sin embargo, no se conocen completamente los cambios que experimentan las Ck, en relación a lesiones degenerativas o hiperproliferativas de los epitelios de revestimiento simples y de los epitelios ductales (Rojas *et al.*, 1998).

En lesiones premalignas y malignas de la epidermis (queratosis actínica, enfermedad de Bowen y carcinoma epidermoide), la expresión de las Ck típicas de la diferenciación (Ck₁ y Ck₁₀) se pierden en las zonas de displasia y de carcinoma epidermoide, adquiriéndose las Ck₈ y Ck₁₈, las cuales, en la piel sólo están presentes durante el desarrollo embrionario. La Ck₈ se detecta en el 76% de los carcinomas epidermoides y la Ck₁₉ en el 95% de los casos. Los carcinomas basoescamosos de la piel y también los de cabeza y cuello son positivos con los anticuerpos AE₁/AE₃ y CAM 5.2 (Rojas *et al.*, 1998).

6.2. CITOQUERATINAS EN LA EPIDERMIS CANINA.

Walter (2001), usando electroforesis en gel, western blott e inmunohistoquímica (técnica fosfatasa antifosfatasa alcalina) encontró en la piel de 25 perros (Pastor alemán, Bóxer, Cocker spaniel, Yorkshire terrier y Mongrels) que la epidermis canina expresa las siguientes citoqueratinas: 1, 5, 6, 10/11, 14 y 16. No encontró diferencias significativas en la expresión Ck entre las razas examinadas, con la excepción de un polimorfismo individual en Ck₁ y Ck_{10/11}. Su estudio demostró a la CK₁₄ en la capa de células basales, CK_{10/11} en la capa de las células suprabasal de la epidermis. Sorprendentemente, la expresión de CK₆, conocida como la citoqueratina del “stress”, fue demostrado en todas las pruebas. Estos resultados indican que hay coexpresión de las citoqueratinas en diferentes razas, la cual puede ser útil en la investigación y caracterización de enfermedades de piel canina.

Por otra parte Kozaki *et al.* (2001), encontraron que los siguientes anticuerpos monoclonales comerciales: No4, OV-TL 12/13, 35betaH11, 4.1.18, CAM5.2, NCL5D3, Ks.13.1, Ks. 18.04, Ks. 19.1, 170.2.4 y Ks.20.8. reaccionaron en los folículos pilosos, conductos de las glándulas sudoríparas, pero no en la epidermis. Además encontraron que los anticuerpos 34b etaB4, AE3, 34betaE12, LP34, RCK 102, MNF116, AE1, KLI, DE-K10 y DE-K13, marcaron en todas las capas de la

epidermis, en los folículos pilosos y en los conductos de las glándulas sudoríparas; siendo estos resultados similares a los reportados en la piel humana concluyendo que la investigación inmunohistoquímica con anticuerpos comerciales desarrollados para exámenes de piel humana está disponible para la investigación del origen de tumores de piel en caninos.

6.3. CITOQUERATINAS EN TUMORES EPITELIALES CANINOS.

Walter (2001), usando inmunohistoquímica y un panel de anticuerpos monoclonales contra diferentes citoqueratinas humanas, encontró que en la piel de caninos la expresión de las citoqueratinas fue de la siguiente manera:

Citoqueratina 6	Todos los tumores epiteliales excepto pilomatricoma
Citoqueratina 14	Células basales de tumores de las glándulas sebáceas y perianales
Citoqueratina 10/11	Células del estrato espinoso
Citoqueratina 8/18	Tumores de las glándulas sudoríparas

Rabanal *et al.* (1989), emplearon técnicas de inmunoperoxidasa contra S-100, citoqueratinas, vimentina y desmina en 65 tumores epiteliales caninos que incluyeron: 8 carcinomas de células escamosas, 8 fibrosarcomas, 8 melanomas, 8 mastocitomas, 8 hemangiosarcomas, 8 leiomiomas, 5 liposarcomas y 12 tumores pobremente diferenciados, encontraron lo siguiente:

Las citoqueratinas sólo fueron detectadas en carcinomas de células escamosas. La vimentina estuvo presente en fibrosarcomas, melanomas, hemangiosarcomas, mastocitomas, leiomiomas y liposarcomas. La S-100 fue detectada en melanomas, hemangiosarcomas, liposarcomas y leiomiomas. Sólo en leiomiomas fue detectada desmina. De acuerdo con esos resultados clasificó a los doce tumores pobremente indiferenciados como carcinomas, fibrosarcomas y melanomas malignos (Rabanal *et al.*, 1989).

Sueiro *et al.* (2005), en un análisis retrospectivo, obtuvieron muestras de los archivos del Departamento de Patología Veterinaria, Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias de la Universidad Estatal Paulista (UNESP/Jaboticabal) y del Laboratorio de Patología Experimental de Campinas-Sao Paulo, y usando anticuerpos para patología humana encontraron lo siguiente:

Tejido	Animal	Número de casos	Positivo a anticuerpos
Melanoma	Canino	4	S-100, HMB45 y vimentina
Mastocitoma	Canino	9	CD117, AE1/AE3, PCNA y c-kit
TVT	Canino	2	AE1/AE3, c-myc protein, Ki-67 y Ki-S-5
Histiocitoma cutáneo	Canino	10	AE1/AE3, Mieloperoxidasa y lisozima
Tumor neuroendocrino	Canino	3	NSE y Sinaptofisina
Hemangiosarcoma	Canino	1	CD31

Fuente: Sueiro *et al.*, 2005.

II. CONCLUSIONES

- 1.- Las neoplasias cutáneas caninas pobremente diferenciadas pueden ser evaluadas mediante técnicas inmunohistoquímicas para determinar su estirpe y su real clasificación.**
- 2.- Los anticuerpos monoclonales comerciales anti-citoqueratinas humanas, pueden ser usados en pruebas inmunohistoquímicas para el diagnostico de neoplasias epiteliales cutáneas caninas porque presentan reacción cruzada para las citoqueratinas caninas.**
- 3.- Las técnicas inmunohistoquímicas permiten identificar el origen tisular de un tumor, mas no el grado de malignidad de éste.**
- 4.- En el Perú, la inmunohistoquímica es una técnica diagnóstica muy común en Medicina Humana, pero aún no se ha hecho extensa su aplicación en Medicina Veterinaria.**

VIII. RECOMENDACIONES

- 1.- Debe continuarse la búsqueda de información científica con el fin de ampliar los conocimientos sobre ésta técnica y su aplicación en las neoplasias cutáneas mesenquimales y orgánicas, para poder ponerla en práctica en el más breve plazo.**
- 2.- Es importante aprovechar toda la información que se pueda obtener del laboratorio de Histología, Embriología y Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM.**

IX. LITERATURA CITADA

- 01.- Adegboyega, P.; N. Boromound and D. Freeman. 2005. Diagnostic utility of cell cycle and apoptosis regulatory proteins in verrucous squamous carcinoma. *Appl. Immunoh.* 13 (2): 171-176.
- 02.- Alberts, B.; D. Bray; L. Lewis; M. Raff; K. Roberts y J. Watson. 2002. *Biología molecular de la célula*. 3^{ra} Ed., p. 843-895. Ediciones Omega S.A., Barcelona.
- 03.- Balbarrey, H; J. Picena; C. Poy y E. Guibert. 2001. Apoptosis e insuficiencia cardíaca. *Rev. Fed. Arg. Cardiol.* 30: 71-77.
- 04.- Bernal, S.; S. Baylin; J. Shaper; A. Gazdar and L. Chen. 1983. Cytoskeleton-associated proteins in human lung cancer cells. *Cancer. Res.* 43: 1798-1808.
- 05.- Bourne, J. 1983. Immunoperoxidase staining methods. *Immunochemistry Laboratory Dako Corporation. USA-Sta. Bárbara.*
- 06.- Brown, J. 2001. Immunocytochemistry in effusions/fetsch and abati. *Cancer cytopathology. Am. Cancer. Soc.* 93 (5): 297-298.
- 07.- Cotran, R.S.; V. Kumar y T. Collins. 2000. *Patología estructural y funcional de Robbins*. 6^{ta} Ed., p. 19-27. Interamericana McGraw-Hill, México DF.
- 08.- Demikesen, C.; N. Hoede and R. Moll. 1995. Epithelial markers and differentiation in adnexal neoplasms of the Skin: an immunohistochemical study including individual cytokeratins. *J. Cutan. Pathol.* 22 (6): 518-35.
- 09.- De Robertis, H. 2003. *Fundamentos de biología celular y molecular*. 4^{ta} Ed., p. 396-402. Editorial el Ateneo. Avellaneda.
- 10.- Ferri, G.; M. Gaudio; F. Castello; C. Tirolo and F. Chiolerio. 1999. Multiple biotin-avidin amplification for multiple immunostaining. *Appl. Immunoh. & Molec. Morphol.* 7 (1): 73-80.
- 11.- García J. 1994. Muerte celular. *Invest. Clin.* 35: 119-122.

- 12.- **García, J. 2002. La inmunohistoquímica en el cáncer metastásico. Acad. Biomed. Digit. Vol 13. Disponible en:**
<http://caibco.ucv.ve/Vitae/VitaeTrece/Articulos/AnatomiaPatologica/ArchivosHTML/Introduccion.htm>.
- 13.- **Gimeno, E.; A. Massone y E. Portiansky. 2002. Introducción a las técnicas de inmunohistoquímica. En: Décimo Quinto Curso Internacional 25-29 Agosto. La Plata, Argentina.**
- 14.- **Guerrero, I.; W. Rodríguez; E. Amorin; R. Mejía y A. Chang. 2003. Oncoproteínas virales, apoptosis y proliferación celular en la carcinogénesis de pulmón: E5-E7, p53, Bcl-2, Bax y PCNA. Rev. Acta. Cancerol. 1 (32): 22-26.**
- 15.- **Jubb, K.; P. Kennedy y N. Palmer. 1991. Patología de los animales domésticos. 3^{ra} Ed., p. 453-458. Editorial Hemisferio Sur, Montevideo.**
- 16.- **Kozaki, M.; Y. Nakamura; M. Iguchi; R. Kano; S. Watanabe; K. Fujiwara and A. Hasegawa. 2001. Immunohistochemical analysis of cytokeratin expression in dog skin. J. Vet. Med. Sci. 63 (1): 1-4.**
- 17.- **Lee, T; P. Ihrke and E. Walder. 1992. Veterinary dermatopathology. 1st Ed., p. 112-555. Mosby Year Book, Missouri.**
- 18.- **Lodish, H.; A. Berk; S. Zipursky; P. Matsudaire; D. Baltimore y J. Darnell. 2003. Biología molecular y celular. 4^{ta} Ed., p. 751-803, 1054-1081. Editorial Médica Panamericana, Madrid.**
- 19.- **López, A.; I. Barañon y C. Ortiz. 2004. Utilidad de la inmunohistoquímica en el diagnóstico de rhabdomyosarcoma variante sólida. Asoc. Med. Hosp. ABC. 49 (3): 151-155.**
- 20.- **Martín, C. and A. Badran. 1998. Evaluation of antibody crossreactivity in mouse tissues: study of a panel of antibodies reacting to human antigens. Appl. Immunoh. 6 (2): 84-88.**
- 21.- **Meza, I. y E. Frixione. 1996. Máquinas vivientes ¿Cómo se mueven las células? 1^{ra} Ed., p. 21-24, 38-42. Fondo de Cultura Económica. México DF.**

- 22.- Moll, R.; W. Franke; L. Schiller; B. Geiger and R. Krepler. 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cell. *Cell*. 31: 11-24.
- 23.- Pérez-Requena, J.; J. Palomo; M. Baena y J. Córdoba. 2002. Valor pronóstico de la expresión inmunohistoquímica de la proteína p53 en el cáncer de mama. *Rev. Esp. Patol.* 35 (3): 315-324.
- 24.- Pfeifer, J. y M. Wick. 1996. Valoración anatomopatológica de las enfermedades neoplásicas. En: *Oncología clínica. Am. Cáncer. Soc.* 559. G. Murphy; W. Lawrence and R. Lenkard (edts). 2^{da} Ed. OPS.
- 25.- Rabanal, R.; D. Fondevila; V. Montane; M. Domingo and L. Ferrer. 1989. Immunocytochemical diagnosis of skin tumors of the dog with special reference to undifferentiated types. *Res. Vet. Sci.* 47 (1): 129-33.
- 26.- Rodríguez, A.; M. Rojas; M. Montenegro y J. Regadera. 2000. Expresión de filamentos intermedios durante el desarrollo embrionario de cerdo (*Sus scrofa*) y bovino (*Bos taurus*). *Rev. Chil. Anat.* 18 (2): 237-244.
- 27.- Rojas, M.; F. Martínez-García; P. Cobo; J. Palacios; M. Nistal y J. Regadera. 1998. Keratinas: Biología celular y significado funcional normal y patológico. *Rev. Chil. Anat.* 16 (1): 15-31.
- 28.- San Martín, M. 2005. Neoplasias caninas: Evaluación estadística período 1990-1994. Tesis de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria, Univ. Nacional Mayor de San Marcos, Lima. 54p.
- 29.- Scott, D.; W. Millar y C. Griffin. 2002. Dermatología en pequeños animales. 6^{ta} Ed., p. 1286-1457. Editorial Inter-Médica, Buenos Aires.
- 30.- Shigihara, Y. and R. Lloyd. 1997. Apoptosis and cellular proliferation in skin neoplasms. *Appl. Immunoh.* 5 (1): 29-34.
- 31.- Shwartz, M. 2001. Morfología del citoesqueleto. Disponible en: <http://news-service.stanford.edu/news/2001/july11/kinesin-711.html>.
- 32.- Solidoro, A. 2005. Apuntes de cancerología. 1^{ra} Ed., p. 11-16, 73-92, 513-532. Concytec, Lima.

- 33.- Sueiro, F.; A. Alessi.; C. Chagas; G. Pinto and J. Vasallo. 2005. **Immunohistochemistry in diagnostic veterinary pathology: Critical review. Bras. Patol. Med. Lab. 41 (4): 263-270**
- 34.- Tseng, S.; M. Jarvinem; W. Nelson; J. Huang; J. Woodcock-Mitchell and T. Sun. 1982. **Correlation of specific keratins with different types of epithelial differentiation monoclonal antibody studies. Cell. 30: 361-372.**
- 35.- Unidad Técnica de la CIE-9-MC. 2001. **Neoplasias. Cataluña.18 (7): 33.**
- 36.- Upasani, O.; M. Vaidya and A. Bhisey. 2004. **Database on monoclonal antibodies to cytokeratins. Oral. Oncol. 40 (3): 236-256.**
- 37.- Walter, J. 2000. **A cytokeratin profile of canine epithelial skin tumors. J. Comp. Pathol. 122 (4): 278-287.**
- 38.- Walter, J. 2001. **Cytokeratins in the canine epidermis. Vet. Dermatol. 12 (2): 81.**
- 39.- Woodcock-Mitchell, J.; R. Eichner; W. Nelson and T. Sun. 1982. **Immunolocalization of keratin polypeptides in human epidermis using monoclonal antibodies. J. Cell. Biol. 95: 580-588.**