



**Universidad  
Andrés Bello®**

UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE TECNOLOGIA MÉDICA

**“ESTUDIO INMUNOMORFOMÉTRICO COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD  
ANGIOGÉNICA Y PROLIFERATIVA EN MASTOCITOMA CANINO DE BAJO Y  
ALTO GRADO DE MALIGNIDAD, ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON  
MASITINIB.”**

- Memoria para optar al título de Tecnólogo Médico, menciónn morfofisiopatología y citodignóstico -

AUTOR: PAMELA MEJIAS RUIZ

PROFESOR GUIA: DR. CARLOS GONZALEZ

SANTIAGO - 2014

## Agradecimientos

*Una vez leí que sin olvidar lo importante que es alcanzar el logro que te propusieras, era más importante el proceso que se asume para llevarlo a cabo, pues era en ese proceso cuando uno aprende realmente. No en el comienzo, ni tampoco en el final. Sino que cuando el cansancio te hace dudar de tus capacidades y cuando la ruta a veces se hace más complicada de lo que creíste. Cuando estas en ese punto de incertezas lo que te impulsa inconscientemente es la fuerza de voluntad y la ilusión ferviente de lograr lo que te propusiste. Sin embargo, lo que te impulsa conscientemente es el apoyo y constancia de tus seres queridos.*

*Es por esto que hoy correspondo con amor, el cariño y la fe que en mí depositaron quienes creyeron y aseguraron que llegaría a concretar este sueño y nunca me abandonaron en este trayecto.*

*Quisiera agradecer en primera instancia a mis padres, Carlos y Fernando, y a mi madre Úrsula, por su amor incondicional y ser ellos el mejor apoyo y soporte en este largo proceso.*

*A mi nana Luz, por su amor de madre y hermosa compañía en estos 26 años. A mi hermano Víctor, que pese a la distancia, siempre ha sido un gran ejemplo y confidente de todas mis decisiones.*

*A mis amigos. A Andrea Künsemüller por su amistad incondicional. A Lorena Gutierrez por su apoyo y constancia. A Mariana Plummer por su alegría y confianza hacia mí. A Fabiola Salinas por su lealtad y cariño. A Alejandro Julio por su disposición y entrega durante todos estos años.*

*A mis profesores, quienes han sido mi mayor influencia. A Denise Rougier, que desde el primer día en que la conocí ha sido mi gran consejera en estos años, haciéndome creer que uno siempre puede lograr lo que se propone. A mi Profesor Guía, Carlos González, quien me entregó la confianza para elaborar este proyecto, por su dedicación y perseverancia. A Patricia Toledo, quién me mostró que siempre hay nuevos caminos. A*

*Pamela Cárdenas por su apoyo, entrega y cariño. A todos ustedes, les quiero dar las gracias, pues como buenos educadores, dejan huellas en sus estudiantes.*

*Y finalmente, me gustaría dar las gracias al equipo de trabajo del Laboratorio de Medicina Veterinaria – UNAB, quienes hicieron posible este proyecto de la forma más amena posible, especialmente al TM Iván Contreras.*

*Estoy sinceramente muy agradecida de todos y de cada uno en particular.*

**Dedicatoria.**

*A mi padre Carlos Mejías.  
Por ser mi compañero de lo trascendente.*

## INDICE

INDICE.....	v
INDICE DE TABLAS.....	vii
RESUMEN .....	x
CAPITULO 1. Recopilación bibliográfica .....	1
<b>1.1. Generalidades de los mastocitos.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. Descripción citológica.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.2. Desarrollo y diferenciación .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.3. Subpoblaciones de mastocitos .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.4. Fisiología de los mastocitos .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2. Receptores de la tirosin quinasa. ....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.1. Receptor c-kit.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.2. Mutaciones en c-kit.....</b>	<b>10</b>
<b>1.3. Mastocitos y angiogénesis .....</b>	<b>11</b>
<b>1.4. Mastocitos y su implicancia en neoplasias .....</b>	<b>12</b>
<b>1.5. Mastocitoma canino: .....</b>	<b>14</b>
<b>1.5.1. Comportamiento Biológico.....</b>	<b>14</b>
<b>1.5.2. Características Clínicas: .....</b>	<b>14</b>
<b>1.5.3. Pruebas diagnósticas .....</b>	<b>15</b>
<b>1.5.4. Estadios clínicos de los mastocitomas. ....</b>	<b>17</b>
<b>1.5.5. Gradación de los mastocitomas .....</b>	<b>18</b>
<b>1.5.6. Tratamiento actual .....</b>	<b>19</b>
<b>1.6. Masitinib.....</b>	<b>21</b>
CAPITULO 2. Hipótesis.....	22
CAPITULO 3. Objetivos .....	23
<b>3.1. Objetivo general.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>23</b>
CAPITULO 4. Materiales y métodos .....	24
<b>4.1. Tipo de estudio .....</b>	<b>24</b>
<b>4.2. Lugar de realización .....</b>	<b>24</b>
<b>4.3. Métodos de selección .....</b>	<b>24</b>
<b>4.3.1. Criterios de inclusión: .....</b>	<b>24</b>
<b>4.3.2. Criterios de exclusión:.....</b>	<b>25</b>
<b>4.4. Dosificación del Masitinib.....</b>	<b>27</b>

<b>4.5. Seguimiento de los pacientes y Ética.....</b>	<b>28</b>
<b>4.6. Procesamiento de Muestras .....</b>	<b>29</b>
<b>4.6.1. Construcción de Tissue MicroArray (TMA).....</b>	<b>29</b>
<b>4.6.2. Tinciones y técnicas aplicadas en el estudio.....</b>	<b>30</b>
<b>4.6.3. Evaluación de las placas obtenidas .....</b>	<b>30</b>
CAPITULO 7. Resultados.....	33
CAPITULO 8: Discusión.....	47
CAPITULO 9: Conclusiones.....	51
REFERENCIAS .....	52
ANEXO I.....	55
ANEXO II .....	61
ANEXO III .....	66
ANEXO IV .....	81

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Hipótesis de funciones fisiológicas de los mastocitos. ....	2
Tabla 2. Subpoblaciones de mastocitos.....	3
Tabla 3. Mediadores más relevantes de los mastocitos humanos.....	4
Tabla 4. Funciones fisiológicas del mastocito en mucosas .....	6
Tabla N° 5: Estadios clínicos en perros con mastocitoma .....	17
Tabla 6. Clasificación histológica de tumores de mastocitos sugerido por Patnaik, 1984..	18
Tabla N°7: Muestras presentes en el estudio. ....	25
Tabla 8: Distribución de área y porcentaje de marcación para c-kit en pacientes con mastocitoma de bajo grado, antes y después del tratamiento con MASITINIB ...	34
Tabla 9: Distribución de área y porcentaje de marcación para CD31 en pacientes con mastocitoma de bajo grado. ....	35
Tabla 10: Distribución de área y porcentaje de marcación para PCNA en pacientes con mastocitoma de bajo grado. ....	37
Tabla 11: Distribución de área y porcentaje de marcación TUNEL en pacientes con mastocitoma de bajo grado. ....	38
Tabla 12: Distribución de porcentajes de variación para cKIT, CD31, PCNA y TUNEL en pacientes con mastocitoma de bajo grado, después del tratamiento con MASITINIB por 7 días. ....	39
Tabla 13: Distribución de área y porcentaje de marcación para c-kit en pacientes con mastocitoma de alto grado. ....	41
Tabla 14: Distribución de área y porcentaje de marcación para CD31 en pacientes con mastocitoma de alto grado. ....	42
Tabla 15: Distribución de área y porcentaje de marcación para PCNA en pacientes con mastocitoma de alto grado. ....	43
Tabla 16: Distribución de área y porcentaje de marcación TUNEL en pacientes con mastocitoma de alto grado. ....	44
Tabla 17: Resumen de distribución de porcentajes de variación de los diferentes marcadores en pacientes con mastocitoma de alto grado, después del tratamiento con MASITINIB por 7 días. ....	45

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Reacción de los mastocitos frente a algún estímulo bioquímico.....	5
Figura 2: Diagrama de un receptor de tirosin kinasa.....	7
Figura 3: Diagrama esquemático del receptor kit.....	9
Figura 4: Beneficios o perjuicios de los mastocitos frente a un tumor .....	13
Figura 5: Ejemplificación de metodología Image Pro Plus ®.....	30
Figura 6: Área total de análisis.....	31
Figura 7: Distribución de porcentaje de área de marcación para c-kit en pacientes con mastocitoma de bajo grado, antes y después del tratamiento con MASITINIB .....	34
Figura 8 Distribución de porcentaje de área de marcación para CD31 en pacientes con mastocitoma de bajo grado, antes y después del tratamiento con MASITINIB.....	36
Figura 9: Distribución de porcentaje de área de marcación para PCNA en pacientes con mastocitoma de bajo grado, antes y después del tratamiento con MASITINIB.....	37
Figura 10: Distribución de porcentaje de área de marcación para TUNEL en pacientes con mastocitoma de bajo grado, antes y después del tratamiento con MASITINIB.....	39
Figura 11: Distribución de porcentajes de variación para cKIT, CD31, PCNA y TUNEL por pacientes, en mastocitoma de bajo grado, después del tratamiento con MASITINIB por 7 días.....	40
Figura 12: Distribución de porcentajes de variación por marcador, cKIT, CD31,PCNA y TUNEL, en pacientes con mastocitoma de bajo grado, después del tratamiento con MASITINIB por 7 días.....	40
Figura 13: Distribución de porcentaje de área de marcación para c-kit en pacientes con mastocitoma de alto grado, antes y después del tratamiento con MASITINIB .....	41
Figura 14: Distribución de porcentaje de área de marcación para CD31 en pacientes con mastocitoma de alto grado, antes y después del tratamiento con MASITINIB .....	42
Figura 15: Distribución de porcentaje de área de marcación para PCNA en pacientes con mastocitoma de alto grado, antes y después del tratamiento con MASITINIB .....	43
Figura 16: Distribución de porcentaje de área de marcación para TUNEL en pacientes con mastocitoma de alto grado, antes y después del tratamiento con MASITINIB .....	44

Figura 17: Distribución de porcentajes de variación para cKIT, CD31, PCNA y TUNEL por pacientes, en mastocitoma de alto grado, después del tratamiento con MASITINIB por 7 días ..... 45

Figura 18: Distribución de porcentajes de variación por marcador, cKIT, CD31, PCNA y TUNEL, en pacientes con mastocitoma de alto grado, después del tratamiento con MASITINIB por 7 días. .... 47

## RESUMEN

De las neoplasias caninas, una de las más comunes es el mastocitoma, constituyendo entre un 7-21% de los tumores cutáneos caninos y un 6% de los tumores en general. Se originan principalmente en la dermis o tejido subcutáneo y sus causas aún son desconocidas, sin embargo es comúnmente asociada a inflamaciones crónicas y sustancias irritantes.

Actualmente, el tratamiento para estos pacientes es mediante remoción quirúrgica con márgenes estandarizados, acompañado de quimioterapia. Sin embargo, los resultados no son los esperados, pues no existe remisión completa de la neoplasia. Por esto es necesario considerar el uso de terapia dirigida, que permita controlar a las células neoplásicas remanentes.

Evidencias recientes indican de que existen mutaciones en el proto-oncogén c-kit presente en los mastocitos y que esto conllevaría a la angiogénesis y desorden proliferativo celular en los mastocitomas. Por lo que en este estudio se investigó el efecto del bloqueo del receptor kit mediante tratamiento con Masitinib, comparando resultados previos y posteriores a la terapia con técnica Tissue Micro Array, histoquímica e inmunohistoquímica.

Los resultados obtenidos fueron los esperados según la hipótesis planteada y también son concordantes con estudios recientes realizados por otros investigadores, demostrando que Masitinib puede ser eficaz como terapia contra mastocitoma canino ya que induce una reducción sustancial en la proliferación celular y angiogénesis, junto a un aumento índice de apoptosis posterior al tratamiento de 7 días.

*Palabras clave: Masitinib, mastocitoma canino, angiogénesis, proliferación celular, apoptosis.*

## **CAPITULO 1. Recopilación bibliográfica**

### **1.1. Generalidades de los mastocitos**

Los mastocitos (MC) fueron descritos por primera vez en 1863 por el Dr Paul Ehrlich siendo nombrados “mastzellen” (al. *mast*, bien nutrido) ya que estas células son más numerosos en el tejido conectivo, cuya nutrición es mejorada (Ehrlich, P., 1878), sin embargo se tardó más de cien años antes de que se pudiera realmente estar seguro del rol que ejercían los mastocitos y además poder caracterizar las funciones fisiológicas que pueden cumplir (Maurer & Metz, 2003) y esto se debe a que alguna función que desempeña un papel fisiológico en algunas situaciones, puede desempeñar un papel patológico en otras situaciones. Es por esto que en algunas revisiones (Kitamura, 2003) los mastocitos han sido comparados con un rol actoral ya que puede desempeñar el personaje de bueno o de malo según el papel que desempeñe.

Varios científicos de renombre han ido aportando sobre características y beneficios a la lista iniciada por Paul Ehrlich, quien propuso que los mastocitos pueden modular el crecimiento de los tumores sólidos con el argumento de que se encontraban en abundancia en la cercanía de estos focos neoplásicos (Ehrlich, 1879) (Ver Tabla 1)

Probablemente, una de las funciones más conocidas y bien definidas de los mastocitos es el efector de reacciones de hipersensibilidad inmediata dependientes de IgE, sin embargo otros autores han sugerido nuevas funciones fisiológicas en base a la producción, almacenamiento y liberación de mediadores, algunos de los cuales no están directamente relacionados con el inicio de reacciones alérgicas, demostrando que éstos pueden ser activados por diversas señales independientes de IgE.

Tabla 1. Hipótesis de funciones fisiológicas de los mastocitos.

Hipótesis de la función de los mastocitos	Autor	Año
Protección contra el cáncer	Ehrlich	1892
Fagocitosis de patógenos	Metchnikoff	1892
Funciones endocrinas	Cajal	1893
Metabolismo de lípidos	Ciaccio	1913
Metabolismo de vitaminas	Tuma	1928
Crecimiento de tejido y proliferación celular	Sylvén	1941
Coagulación sanguínea	Baecheland	1950
Crecimiento capilar	Montagna	1951
Hematopoyesis	Messerschmitt	1955
Desintoxicación local de tejido	Higginbotham	1956
Regulación presión arterial	Keller	1957
Regulación pH	Caselli	1958
Regulación temperatura	LeBlanc	1959
Envejecimiento	Spicer	1960
Respuesta al stress	West	1962
Fijación de las partículas transmitidas por la sangre	Selye	1963
Secreción sudor	Szabo	1964

Tabla 1. Obtenida de “*What is the physiological function of mast cells?*” (Maurer & Metz, 2003)

### 1.1.1. Descripción citológica

Los mastocitos son células grandes a menudo ovales con un diámetro que oscila entre los 8 a 20  $\mu\text{m}$ . El núcleo es bastante pequeño, redondeado y basófilo. A menudo se encuentra oculto por la gran cantidad de gránulos citoplasmáticos que adquieren intensa coloración con colorantes básicos (Geneser, 2003) y es por estos mismos gránulos que adquieren una variación fenotípica en su morfología citoplasmática ya que también pueden poseer numerosas proyecciones llamadas pseudópodos que pueden entrelazarse con otras células. (Gurish & Castells, 1996)

### 1.1.2. Desarrollo y diferenciación

Los mastocitos se forman durante la hematopoyesis en la médula ósea a partir de estadios inmaduros que se liberan al torrente sanguíneo cuando aún no están diferenciados totalmente y sólo lograrán la diferenciación cuando lleguen a su destino (Geneser, 2003). Es por esta razón que algunos autores consideran que existen puntos de semejanza entre basófilos y mastocitos considerándolas líneas celulares independientes, aunque sugieren que posiblemente algunos basófilos abandonarían el torrente sanguíneo y se diferenciarían a mastocitos en los tejidos. (Enerbäck, 1997)

### 1.1.3. Subpoblaciones de mastocitos

La presencia diferencial de proteasas intragranulares, triptasa y quimasa marca la heterogeneidad de los mastocitos (Schwartz, Lewis, & Seldin, 1981). En un comienzo se describieron dos tipos de mastocitos, MCt que contenían triptasa y los MCtc que contenían quimasa, triptasa y carboxipeptidasa. (Schwartz, Irani, & cols., 1987) Actualmente se ha descrito un tercer tipo de mastocito que contiene solo quimasa, denominado MCc (Weidner & Austen, 1990). Estas subpoblaciones no sólo se diferencian según su contenido de proteasas, sino también en base a la localización y reactividad frente a fármacos antialérgicos.

Tabla 2. Subpoblaciones de mastocitos

Mastocitos	Localización in vitro	Contenido
MCt	Mucosa Nasal	$\alpha$ y $\beta$ triptasa
	Pared Alveolar	
	Mucosa Intestinal	
	Mucosa Bronquial	
MCtc	Piel	$\alpha$ y $\beta$ triptasa Quimasa Carboxipeptidasa
	Vasos Sanguíneos	
	Submucosa Intestinal	
	Membrana Sinovial	
	Pared Vascular	
MCc	Corazón	Quimasa
	Submucosa Nasal	
	Submucosa Intestinal	

Tabla 2. Modificada de “Estudio de la utilidad diagnóstica de la determinación de niveles séricos de triptasa en las reacciones adversas a medicamentos” (Ordoqui, 2002)

### 1.1.4. Fisiología de los mastocitos

Los mastocitos se caracterizan por la presencia de gránulos, que contienen moléculas que son liberadas al exterior en respuesta a determinados estímulos bioquímicos. Dentro de los cuales se encuentran Citoquinas que secretan: IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, el factor de necrosis tumoral alfa, (TNF- $\alpha$ ), factor de crecimiento de fibroblasto (FGFb), factor de crecimiento transformante (TGF $\beta$ ), factor de crecimiento celular y endotelial vascular (VEGF), proteoglicanos, Heparina e Histamina. (ver Tabla 3)

Tabla 3. Mediadores más relevantes de los mastocitos humanos.

Mediadores más relevantes de los mastocitos humanos.	
Mediadores pre formados	Histamina, Triptasa, Quinasa, Heparina, Carboxipeptidasa A, TNF- $\alpha$ , SCF, VEGF, Serotonina, Catepsina, MBP
Mediadores sintetizados <i>de novo</i>	Derivados de lípidos: PGE <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub> , LTB <sub>4</sub> , LTC <sub>4</sub> , PAF
Citocinas y factores de crecimiento	IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-18, IFN- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , GM-CSF, LIF, TNF- $\alpha$ , NGF, M-CSF, MIF, bFGF, EGF, PDGF CC: I309 (L1), MCP-1 (L2), MIP-1 $\alpha$ (L3), MIP-1 $\beta$ (L4) RANTES (L5), MCP-3 (L7), MCP-2 (L8), eotaxina (L11)
Quimiocinas	CXC: GRO $\alpha$ (L1), GRO $\beta$ (L2), GRO $\gamma$ (L3), IL-8 (L8), IP-10 (L10)
Neuropéptidos	CRH, urocortina
Otros ( factores de transcripción, señales de transducción, apoptosis, ciclo celular)	ARF6, BCL6, DUSP2, FUT4, HEC, KCNAB1, RASAL1, SLC16A6, SERPINB2, THBD, TOP2A, óxido nítrico, superóxido, PTX3.
<p>La nomenclatura de las quimiocinas se basa en la presencia y posición de los residuos de cisteína, así, CC indica 2 residuos juntos, y CXC, 2 residuos separados por un aminoácido, mientras que la L significa ligando.</p> <p>ARF6: factor de ribosilación de adenosindifosatos; CRH: hormona estimulante de la corticoprima; DUSP2: fosfatasa de doble especialidad; EGF: factor de crecimiento epidérmico; FUT4: fucosiltransferasa; GM-CSF: factor estimulante de colonias granulocíticas y microcíticas; GRO: oncogén relacionado con el crecimiento; HEC: alta expresión en cáncer de endometrio; I309: proteína de activación de células T; IFN: interferón; IL: interleucina; IP: proteína de potasio ligadas a voltaje, miembro beta 1; LARC: quimiocina relacionada con el hígado y la activación; LEC: quimiocina expresada en el hígado; MCP: proteína quimioatrayente de monocitos; M-CSF: factor estimulador de colonias de macrófagos; MDC: quimiocina derivada del macrófago; MIF: factor inhibidor de la migración de los macrófagos; MIP: proteína inflamatoria de macrófago; NGF: factor de crecimiento nervioso; PAF: factor activador de plaquetas; PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas; PG: prostaglandina; PTX3: pentaxina; RANTES: regulado por activación, expresado por células T normales y probablemente secretado; RASAL1: activador de proteínas tipo RAS 1; SCF: factor de células madre; SERPINB2: inhibidor de proteasas de serina (o cisteína), miembro 2M SLC16A6: transportador del ácido monocarboxílico de solutos, familia 16; TARC: quimiocina relacionada con el timo y la activación; TGF: factor transformador de crecimiento; THBD: trombosudulina; TNF: factor de necrosis tumoral; TOP2A: topoisomerasa (ADN) II alfa 170 k Da; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular.</p>	

Tabla 3. Modificada de “Stress-mast cell axis and regulation of gut mucosal inflammation: from intestinal health to an irritable bowel” (Ramos, Vicario, & Santos., 2007)

La Histamina es una amina biogénica derivada del aminoácido Histidina, considerada como la más importante para generar una respuesta inmune. En las reacciones alérgicas, el mastocito libera aminas bioactivas que ejercen su acción sobre el endotelio, el músculo liso y el epitelio, para generar los síntomas característicos de estas reacciones. La Heparina puede estimular la producción hepática de Histaminasa como elemento de homeostasia orgánica, desactivando la Histamina o inhibiendo la vía alterna del complemento, también puede generar las respuestas alérgicas tardías. La Triptasa (proteína específica de los mastocitos MCt) incrementa la permeabilidad vascular, degrada proteínas de la matriz extracelular; y la Quimasa que genera fenómenos quimiotáxicos para neutrófilos y basófilos. (Navia & Vásquez-López, 2011)

La liberación de los gránulos intracitoplasmáticos se produce por exocitosis mediante un proceso conocido como degranulación anafiláctica, activado por el entrecruzamiento de moléculas de inmunoglobulina E en la membrana externa u otros mediadores inmunológicos como inmunoglobulinas libres de cadena ligera, superalérgenos, fracciones del complemento, diferentes citoquinas, moléculas de adherencia y posiblemente también por la unión de inmunoglobulina E monomérica. (Ramos, Vicario, & Santos., 2007)

Figura 1. Reacción de los mastocitos frente a algún estímulo bioquímico

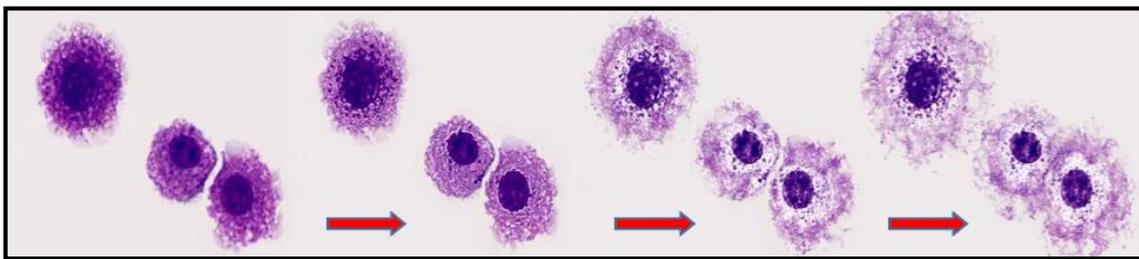


Figura 1: Microfotografía obtenida de “Degranulación mastocitaria no mediada por IgE” . (Rodríguez-Tafur, 2006) Hematoxilina Eosina.

Evidencias recientes invitan a pensar que el mastocito también desempeña una función sensora y de vigilancia en numerosos procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Esta función probablemente esté asociada a la liberación progresiva y selectiva del contenido granular mediante la formación de microvesículas, proceso conocido como desgranulación tipo piecemeal, o fragmentaria. Dicho proceso es típico de la activación por neuropéptidos y

otros estímulos no inmunitarios como neurotransmisores, factores de crecimiento, adenosintrifosfato y otros agentes físicos, químicos y biológicos. (Ramos, Vicario, & Santos., 2007)

Además, se ha descrito un fenómeno de transgranulación, por el que diferentes tipos celulares capturan las secreciones de los pseudópodos del mastocito y los remanentes de los gránulos extruidos (que contienen heparina, cimasa, carboxipeptidasa), permitiendo así la interacción del mastocito con otras células de su entorno. Estas funciones no puramente efectoras convierten al mastocito en una célula determinante en el control de la inflamación crónica en las mucosas, como también múltiples respuestas y roles efectores en diferentes respuestas fisiológicas del organismo. (tabla 4) (Bischoff, 2003)

Tabla 4. Funciones fisiológicas del mastocito en mucosas

Funciones fisiológicas del mastocito en mucosas.
<ul style="list-style-type: none"><li>• Vigilancia tumoral</li><li>• Angiogenia, aterogenia, fibrinólisis y neurogenia</li><li>• Inmunidad innata y adquirida: defensa bacteriana, viral y parasitaria</li><li>• Reparación y remodelación de tejidos</li><li>• Reacciones de hipersensibilidad e inflamación crónica</li><li>• Respuesta al estrés: inflamación de mucosas en el pulmón, intestino, piel, ojos, aparato genitourinario y condro-sinovial</li><li>• Modulación de la toxicidad de agentes físicos, químicos y biológicos</li><li>• Regulación de la permeabilidad y de la secreción epitelial.</li></ul>

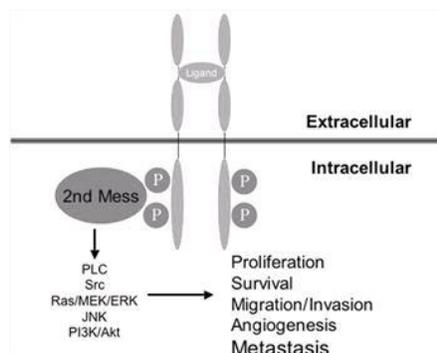
*Tabla 4. Obtenida de “Stress-mast cell axis and regulation of gut mucosal inflammation: from intestinal health to an irritable bowel” (Ramos, Vicario, & Santos., 2007)*

## 1.2. Receptores de la tirosin quinasa.

El cáncer es una enfermedad caracterizada por el crecimiento celular incontrolado, disminución de la apoptosis y estimulación de los procesos de migración celular, invasión y angiogénesis. Los mecanismos moleculares responsables de este comportamiento biológico son diversos y complejos, pero una de las familias de moléculas en las que se ha puesto gran atención especialmente por su potencial como diana de nuevas terapias contra el cáncer es la familia de receptores de la tirosin quinasa (RTK). Estas moléculas son receptores de factores extracelulares de crecimiento que facilitan la comunicación de señales extracelulares al interior celular, mediando funciones de crecimiento, supervivencia, invasión y angiogénesis. Casi todas las células tumorales expresan un abanico de diferentes RTK, que juegan papeles diferentes e importantes en la patogénesis neoplásica.

La mayoría de los RTKs están conformados como monómeros que se homodimerizan o heterodimerizan en el momento en que se produce la unión con el factor de crecimiento correspondiente, lo cual induce un cambio de conformación de la molécula que permite la fosforilación de residuos de tirosin en el dominio intracelular del receptor. Esta fosforilación va a desencadenar una cadena de señales intracelulares que inducen la proliferación celular y culminaran en una célula con expresión genética anómala y frecuentemente en un fenotipo de la célula tumoral con características adicionales de malignidad (Figura 2)

Figura 2. Diagrama de un receptor de tirosin quinasa



Bajo circunstancias normales los RTK solo se activan cuando el factor de crecimiento extracelular se une al receptor pero también puede darse una activación inapropiada por una serie de mecanismos como: 1) estimulación autocrina: las células tumorales producen el factor de crecimiento ellas mismas; 2) Sobreexpresión de RTK que lleva a la dimerización espontánea del receptor; 3) Mutaciones de los RTK que llevan a un cambio morfológico del receptor en el que existe una activación constante en la ausencia del factor de crecimiento o ligando. Cualquiera de estas alteraciones puede llevar a una señalización intracelular inapropiada que a su vez de lugar a un fenotipo neoplásico. (Lara, 2013)

### **1.2.1. Receptor c-kit**

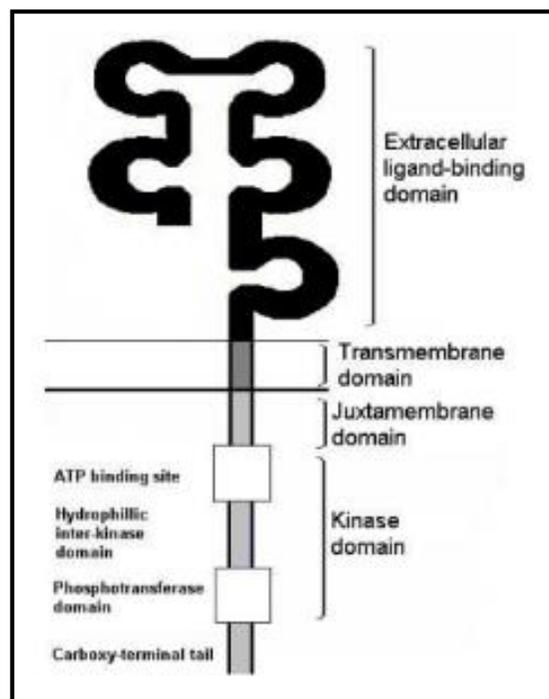
Los mastocitos expresan c-kit, que es el receptor para el factor de células madre (SCF), factor de crecimiento esencial para el desarrollo de los mastocitos (Gurish, Castells, & col, Mast cells: Surface receptors and signal transduction, 2013) Este factor es también conocido como ligando Kit (KL) o factor de acero o factor de crecimiento de mastocitos (Huang, Nocka, & DR, 1990). El receptor de superficie para SFC, y es un receptor kit de tirosina quinasa (CD117) generado a partir del proto-oncogen c-kit, que se ubica en el cromosoma 4q11-12 en humanos, así como en el cromosoma 13 en canes. (Gene Database, 2013)

Es expresado por las células madre hematopoyéticas y que se mantiene durante la diferenciación mieloide, por lo que es un marcador temprano de precursores de mastocitos. (Gurish & Castells, 1996) Los mastocitos continúan expresando c-kit durante todo su ciclo de vida a diferencia de las células de la línea mieloide (incluyendo basófilos), que pierden este marcador durante su desarrollo y dejan de responder a SCF (Boyce, 2004)

El receptor c-KIT se expresa en muchos tipos de células, incluyendo las células germinales, melanocitos, células precursoras hematopoyéticas y en particular en mastocito. Ha demostrado estar implicados en la supervivencia celular, proliferación, diferenciación, quimiotaxis y degranulación (Webster, Kiupel, & Yuzbasiyan-Gurkan, 2006), así como también se ha demostrado que juegan un papel en el desarrollo normal de células de la médula ósea y células intersticiales de Cajal (Trifa, y otros, 2010)

Este receptor se compone de un dominio extracelular de cinco bucles de tipo inmunoglobulina y un dominio tirosina quinasa (Zemke, Yamini, & Yuzbasiyan-Gurkan, 2002) como muestra la *figura 1*. Esta proteína que contiene varios exones, han sido fuente de estudio de ciertas mutaciones, por lo que su dominio de unión a ligando extracelular es codificada por los exones 1-9 de c-kit, el exón 10 codifica para un único segmento transmembrana, los exones 11 y 12 para el dominio juxtamembrana y el exón 13 para el dominio tirosina quinasa citoplasmática que es vinculado a ATP. (Takeuchi, y otros, 2013)

Figura 3. Diagrama esquemático del receptor kit



Obtenida de “Evaluation of the kinase domain of c-kit in canine cutaneous mastcell tumors” (Webster, Kiupel, & Yuzbasiyan-Gurkan, 2006)

### 1.2.2. Mutaciones en c-kit

Las mutaciones identificadas hasta la fecha en seres humanos y roedores están confinados a los dominios quinasa y juxtamembrana de c-kit y consisten en mutaciones puntuales y pequeñas deleciones. Mientras que mutaciones de c-kit canina que se han identificado recientemente se han encontrado exclusivamente en el dominio juxtamembrana, incluyendo mutaciones puntuales y duplicaciones en tandém en esta región (Zemke, Yamini, & Yuzbasiyan-Gurkan, 2002) (Welle, Bley, Howard, & Rüfenacht, 2008).

El efecto funcional de esta mutación es que este proto-oncogen c-kit, codifica el receptor tiroxina-quinasa transmembrana para el factor de las células madre pluripotenciales (*stem cell factor - SCF*); además, el factor de crecimiento mastocitario se une con la proteína producto del proto-oncogen c-kit. La activación del c-kit induce crecimiento celular y prolonga la supervivencia de las células al impedir su apoptosis, por lo que su mutación podría estar relacionada con la proliferación de los mastocitos. (Catalino & Ustáriz-García, 2011)

En humanos, estas mutaciones han estado implicadas en la patogenia de varias enfermedades neoplásicas, incluyendo mastocitosis, tumores de células germinales y tumores del estroma gastrointestinal (GISTs) (Webster, Kiupel, & Yuzbasiyan-Gurkan, 2006)

La mutación de c-kit se considera que está asociado con el desarrollo y la progresión de tumores de mastocitos cutáneos (MTC) caninos (Takeuchi, y otros, 2013) (Webster, Kiupel, & Yuzbasiyan-Gurkan, 2006)

### **1.3. Mastocitos y angiogénesis**

La angiogénesis o crecimiento de los vasos recién formados en el organismo adulto, sólo ocurre en ciertas condiciones patológicas ( Universitat de les Illes Balears, 2013) y representa un paso importante en el crecimiento y progresión del tumor tanto en tumores humanos como en animales. Los altos niveles de factores angiogénicos asociados con la evidencia histológica de un aumento de la neovascularización tumoral, mediante la medición de la densidad de microvasos, se considera que tienen valor pronóstico importante en la medicina humana en variados tumores sólidos. (Lavalle, Bertagnolli, Tavares, Ferreira, & Cassali, Mast cells and angiogenesis in canine mammary tumor, 2010) (Kalra, Rao, Nanda, & Rehman, 2013)

Existen numerosos trabajos que demuestran la necesidad del crecimiento de los vasos sanguíneos para el crecimiento y la metástasis de los tumores. Diversos estudios de microscopía o inmunohistoquímica han demostrado que el número y densidad de vasos sanguíneos en diferentes cánceres en humanos se correlaciona con la capacidad de invasión y metástasis. No todos los tumores angiogénicos producen metástasis pero la inhibición de la angiogénesis previene la migración de células tumorales y por tanto desarrollo de la carcinogénesis. ( Universitat de les Illes Balears, 2013)

Los vasos sanguíneos de tumores muestran muchas anormalidades estructurales y funcionales. Son irregulares en tamaño, forma y patrón de ramificación; carecen de la jerarquía normal y no muestran los rasgos reconocibles de arteriolas, capilares y vénulas. (Ribatti & Crivellato, 2012) ( Universitat de les Illes Balears, 2013)

Como se revisó en Fisiología de los Mastocitos, cuando ocurre activación dependiente de IgE, los mastocitos liberan mediadores pro angiogénicos que se encuentran almacenados en sus gránulos, tales como VEGF y bFGF, que promueven la angiogénesis incluso en la fase temprana de la inflamación alérgica. Sin embargo, estudios realizados en embrión de pollo han sugerido que son los gránulos quienes pueden estimular una reacción angiogénica, pero no así los mastocitos degranulados, por lo que la actividad angiogénica estaría parcialmente

inhibida por anticuerpos anti-bFGF y VEGF, indicando que son estas citoquinas quienes están implicadas en la reacción angiogénica. (Ribatti & Crivellato, 2012)

Los mastocitos, además almacenan grandes cantidades de proteasas de serina activas preformadas, como la triptasa y quimasa en sus gránulos de secreción. (Tabla 2) La triptasa estimula la proliferación de células endoteliales, promueve la formación de tubos vasculares en cultivo y también degrada la matriz de tejido conectivo para proporcionar espacio para el crecimiento neovascular. La quimasa degrada componentes de la matriz extracelular, por lo tanto el VEGF unido a esta matriz podría ser liberado de manera potencial. Por otra parte, la histamina y heparina estimula la proliferación de células endoteliales induciendo la formación de nuevos vasos sanguíneos. La histamina estimula la formación de nuevos vasos, actuando a través de los receptores H1 y H2. La heparina puede actuar directamente sobre los vasos sanguíneos o indirectamente mediante la inducción de la liberación de bFGF desde el sitio de almacenamiento extracelular. (Ribatti & Crivellato, 2012)

Otras citoquinas, tales como IL-8, TNF  $-\alpha$ , TGF- $\beta$ , NGF, han sido implicadas en angiogénesis normal y asociadas a tumores. (Aoki, Pawankar, Niimi, & Kawana, 2003)

#### **1.4. Mastocitos y su implicancia en neoplasias**

Como se ha revisado, los mastocitos representan una población muy heterogénea, con características fisiológicas muy variables, las cuales pueden desempeñar diversas funciones que pueden favorecer o perjudicar el tamaño, supervivencia y nutrición del tumor debido a su capacidad de poder secretar el contenido de sus gránulos o abstenerse de ello.

Los mastocitos se acumulan en los sitios de crecimiento del tumor y podrían ser reclutados por factores quimiotácticos, como MCP-1, RANTES y SCF, que generan moléculas beneficiosas para el tumor, las cuales incluyen factores de crecimiento, histamina mitogénica (H1) y un inmunosupresor (H2), heparina, VEGF e IL -8, que favorecen la formación de vasos; proteasas que permiten la formación de nuevos vasos sanguíneos y metástasis.

La degranulación puede ser bloqueada por inhibidores derivados del tumor, tales como poliaminas oxidadas o NO derivados de nuevos vasos sanguíneos. (Figura 4) (Theoharides & Conti, 2004)

Figura 4. Beneficios o perjuicios de los mastocitos frente a un tumor.

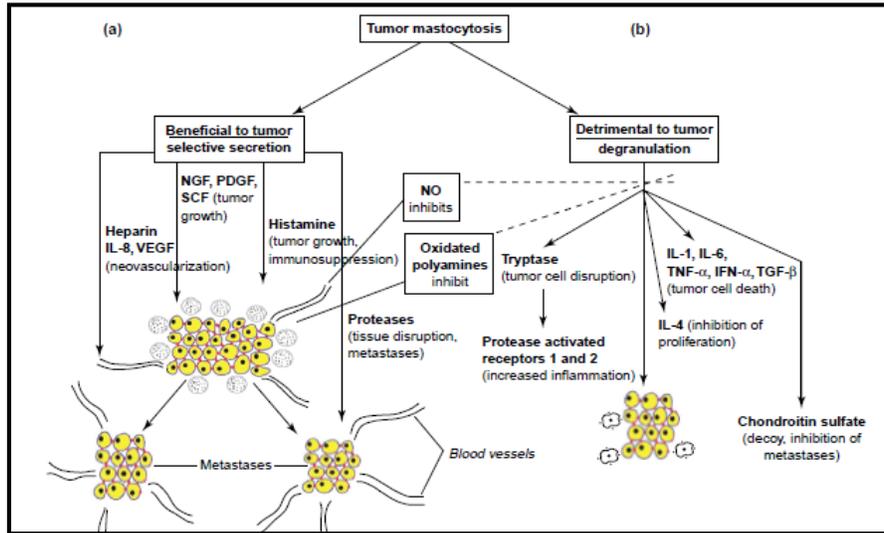


Figura Obtenida de “Mast cell: The JEKYLL and HYDE of tumor growth”

Sin embargo, los mastocitos pueden acumularse en la reacción al tumor, liberan su contenido granular y secretar moléculas, tales como IL-4 y TNF-, que inducen la apoptosis, IL 1-e IL-6, que son proinflamatorias, o triptasa, que estimula la activación del receptor de proteasa induciendo inflamación, así como el Condroitín Sulfato podría bloquear la metástasis. Abreviaturas: IFN- $\gamma$ , interferón- $\gamma$ ; IL-8, Interleuquina -8, MCP-1, Proteinasa 1 del mastocito; NGF, factor de crecimiento nervioso; NO, óxido nítrico; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas; SCF, factor crecimiento de stem cell; TGF- $\beta$ , factor de crecimiento transformante- $\beta$ ; TNF- $\alpha$ , factor de necrosis tumoral- $\alpha$ ; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular (Theoharides & Conti, 2004).

Se han reportado muchos casos donde el número de mastocitos ha aumentado en tumores malignos tanto en humanos y animales incluyendo carcinoma colorrectal, carcinoma mamario, carcinoma basocelular de la piel, tumores de tejido blando, melanoma, cáncer esofágico y cáncer pulmonar (Im & al., 2011)

## **1.5. Mastocitoma canino:**

Los perros tienen un riesgo de desarrollo de mastocitoma que representan entre el 7 a 21% de todos los tumores presentes en la piel canina, teniendo una incidencia de 129 en 100.000 perros por año en un estudio del Reino Unido. (Welle, Bley, Howard, & Rüfenacht, 2008)

La mayoría se producen en la dermis y tejido subcutáneo, aunque también se registran casos en los que se encuentran en sitios extra cutáneos, incluyendo mucosa conjuntiva, glándula salival, nasofaringe, laringe, cavidad oral o tracto gastrointestinal, uretra y columna vertebral. (Welle, Bley, Howard, & Rüfenacht, 2008)

### **1.5.1. Comportamiento Biológico.**

El comportamiento biológico de los mastocitomas es descriptible de carácter impredecible y muy variable. Puede oscilar desde benigno (que corresponde generalmente a tumores bien diferenciados) donde no progresan, estando presentes durante mucho tiempo antes de diseminarse (A- Rios). También se encuentran los extremadamente malignos. (Natalia, Fogel, & Vulcano, 2005), localmente invasivos con una expansión sistémica muy precoz. Es por esta razón que no se consiguen tratamientos exitosos y resulta casi imposible poder dar algún pronóstico exacto (Simón, 2009)

Sin embargo algunos estudios aseguran que el mastocitoma visceral afecta al bazo, hígado y médula ósea y generalmente es el resultado de la metástasis sistémica de un tumor cutáneo primario, aunque puede ocurrir como un síndrome independiente. En este último caso, se puede observar linfadenopatía, esplenomegalia, hepatomegalia y puede ocurrir derrame pleural y ascitis. (mastocitoma canino y felino)

### **1.5.2. Características Clínicas:**

No existe presentación típica para el mastocitoma canino. Clínicamente pueden aparecer como masas dermoepidérmicas (masas superficiales que se mueven con la piel) o como masas subcutáneas donde la piel que cubre al tumor se mueve libremente sobre el tumor. (Rios, 2008) El aspecto macroscópico es similar al de cualquier tumor cutáneo, por lo

que debe ser considerado en el diagnóstico diferencial de cualquier otro tumor de piel. (Morris & Dobson, 2002)

Existen diversas variaciones en la forma de presentación del tumor, ya que pueden ser blandos y fluctuantes o firmes, discretos o difusos, pequeños o grandes, con pelo o sin pelo (Vail, 2003) La mayoría se presentan como masas únicas, sin embargo se estima que el 15% de los casos aparecen de forma múltiple.

El tamaño de la masa tumoral varía de 1cm a 30cm de diámetro y por lo general, los mastocitomas bien diferenciados de bajo grado se presentan como un nódulo dérmico de crecimiento lento y solitario. Mientras que los más agresivos se pueden presentar como grandes masas mal definidas en tejidos blandos. Algunos tumores se ulceran a través de la piel y, en ciertos casos, la liberación de histamina por parte de las células tumorales hace que la lesión fluctúe en su tamaño y se enrojeczca con el paso del tiempo. (Natalia, Fogel, & Vulcano, 2005)

A nivel sistémico el signo más frecuente es la presencia de úlceras gastrointestinales como consecuencia de la liberación de histamina. Con esto pueden aparecer vómitos, diarrea, anorexia y anemia. Además otro factor, aunque poco frecuente, es la aparición de trastornos de coagulación, con hemorragias locales debido a la liberación de heparina (Vail, 2003)

### **1.5.3. Pruebas diagnósticas**

Debido al hecho de que el mastocitoma tiene la capacidad de generar metastasis, los pacientes deben ser clasificados dentro de estadios clínicos. Para esto se realizan pruebas diagnósticas, en las cuales las más importantes son: el análisis sanguíneo, aspiración por aguja fina en ganglios, evaluación de la cavidad abdominal y torácica.

Por otro lado para la confirmación de diagnóstico se realiza biopsia para análisis histopatológico con el fin de clasificar los tumores en diferentes grados. Por lo que los factores pronóstico en el mastocitoma incluyen grado histológico, estadio clínico, evolución del crecimiento, raza del animal y el índice mitótico.

### **1.5.3.1. Análisis sanguíneo.**

El análisis sanguíneo en conjunto con el análisis de orina deben ser realizadas en cualquier paciente con cáncer. Los animales con mastocitoma pueden presentar eosinofilia y en algunos casos anemia debido a hemorragias gastrointestinales.

### **1.5.3.2. Aspiración de ganglios linfáticos**

Debido a que el ganglio es el primer lugar de metástasis, la comprobación del ganglio es el procedimiento más importante para poder establecer el estadio clínico. Los ganglios pueden o no estar aumentados de tamaño, y este examen puede ser complicado ya que pueden existir mastocitos en ganglios normales. Sin embargo, en procesos metastásicos los mastocitos tienden a agruparse y suelen estar menos diferenciados que los mastocitos normales, debido al proceso inflamatorio.

Un factor importante a considerar es que la aspiración de aguja fina al ganglio debe realizarse antes de la extirpación quirúrgica del mastocitoma, puesto que la inflamación quirúrgica inducirá una migración de los mastocitos a los ganglios linfáticos y puede, de este modo, dificultar la interpretación.

En respuesta, si no hay afección ganglionar es muy poco probable que no se encuentren afectados órganos como el bazo, hígado y médula ósea. Desafortunadamente, existen varias partes del cuerpo, particularmente las del tronco, que no drenan a un único ganglio accesible y periférico, y en ese caso es drenado por un ganglio regional que puede estar en la cavidad torácica o abdominal, por lo que el acceso a la punción por aguja fina en ganglio también se delimita a este factor.

### **1.5.3.3. Evaluación cavidad torácica y abdominal.**

Esta evaluación se hace en primera instancia mediante radiografía torácica y se recomienda la aspiración con aguja fina del bazo y del hígado sólo cuando durante el estudio ecográfico se detecte alguna anomalía en dichos órganos.

#### 1.5.3.4. Análisis Histopatológico

Como se observó anteriormente, el diagnóstico por citología es muy sencillo, sin embargo los mastocitos anaplásicos pueden no contener los gránulos citoplasmáticos característicos, motivo por el cual este examen no puede sustituir una evaluación histológica. (Natalia, Fogel, & Vulcano, 2005) El examen histopatológico de los mastocitomas es muy importante, no solo para confirmar el diagnóstico, sino también para asegurar el grado de tumor y además para evaluar si se ha realizado una extirpación completa del tumor.

En mastocitomas bien diferenciados, las células presentan un elevado número de granulaciones de gran tamaño, lo que puede dificultar la evaluación nuclear. Cuando el tumor está menos diferenciado, los gránulos son menores, incluso dando un aspecto de macrófago o histiocito. En cuanto menor es la diferenciación, disminuye el número de gránulos y aumenta el pleomorfismo celular.

Aunque el diagnóstico del mastocitoma puede realizarse en la mayoría de los casos mediante citología, se necesita una biopsia con escisión para la gradación histológica, la cual tiene en cuenta factores como la morfología celular y el grado de afectación de los tejidos adyacentes.

#### 1.5.4. Estadios clínicos de los mastocitomas.

Una vez que se ha obtenido la información clínica de los puntos anteriores, el tumor debe clasificarse en un estadio para determinar el pronóstico y la opción terapéutica más adecuada.

Tabla N° 5: Estadios clínicos en perros con mastocitoma

Estadios Clínicos	Descripción
I	Tumor único limitado a la dermis. Sin afección ganglionar regional
II	Tumor limitado a la dermis Con afección ganglionar regional
III	Tumores múltiples o un único tumor grande e infiltrativo Sin afección ganglionar
IV	Cualquier tumor con metástasis a distancia.

*Tabla obtenida de "Mastocitoma canino y felino" (Rios, 2008)*

### 1.5.5. Gradación de los mastocitomas

Uno de los factores pronósticos más consistentes es el grado histopatológico propuesto por Patnaik en el año 1984 donde define a los tumores en tres grados. Grado I (bien diferenciado), grado II (intermedia – diferenciado) o grado III (pobrementemente diferenciado). Estas incluyen características histopatológicas, morfología celular, índice mitótico, celularidad, área del tejido afectado y reacción del estroma. (Takeuchi, y otros, 2013) (Tabla 6.)

Tabla 6. Clasificación histológica de tumores de mastocitos sugerido por Patnaik, 1984.

Grado histológico	I	II	III
Extensión del tumor	Dermis	Dermis y tejido subcutáneo	Invade tejido subcutáneo y tejidos profundos
Celularidad	Los mastocitos están separados por fibras de colágeno	Moderada a altamente celular	Altamente celular
Morfología Celular	Redonda, monomórficas, bordes celulares distintos. Gránulos de tamaño medio	Redonda a ovals. Moderadamente pleomórficas Células gigantes. Bordes celulares distintos. Gránulos finos	Pleomórficos, medianas, redondas ovoides o células en forma de huso, bordes celulares similares, gránulos finos o sin presencia de gránulos.
Morfología Nuclear	Redondo	Redondo. Nucléolo individual. Algunas células con doble núcleo	Núcleos con muescas o vesículas, con uno o más nucléolos. Células multinucleadas dispersas

Tabla 6. Obtenida de *Canine mast cell tumours: a review of pathogenesis, clinical features pathology and treatment* (Welle, Bley, Howard, & Rüfenacht, 2008)

Aunque el grado histopatológico se considera que es esencial para el pronóstico de mastocitoma canino, el sistema Patnaik tiene inconsistencias ya que el comportamiento clínico del grado II en perros aún no se encuentra bien definido, aunque la mayoría de los mastocitomas se incluyen en esta categoría.

En consecuencia, Kiupel y sus colegas propusieron dos niveles de clasificación histopatológica para los mastocitomas. (Kiupel, y otros, 2011) El sistema Kiupel clasifica a los tumores en dos grados, altos o bajos, de acuerdo a la frecuencia de aberraciones

citológicas de las células tumorales, donde incluye figuras mitóticas, núcleos con caracteres de malignidad, multinucleación y cariomegalia. Aunque en este sistema no se incluyen los criterios de invasión tumoral, reacción del estroma y gránulos citoplasmáticos propuestos en el sistema Patnaik, ésta nueva clasificación propuesta por Kiupel ha demostrado una consistencia del 96,8% entre los patólogos (Takeuchi, y otros, 2013)

#### **1.5.6. Tratamiento actual**

Las decisiones de tratamiento se basan en la presentación clínica de la enfermedad y de la presencia o ausencia de factores pronósticos. Actualmente, existen numerosas publicaciones donde se evalúan diferentes tratamientos y combinaciones de estos, pero con un sentido muy conservado, donde muchos de estos estudios informaron que fueron realizados de manera retrospectiva basada en un pequeño número de casos, donde además carecían de una organización por estadificación y gradación de los tumores.

Para los tumores de grado medio bien diferenciados, (según clasificación de Kiupel) el enfoque de tratamiento más práctico consiste en la resección quirúrgica completa, donde varios informes describen que se logró un control eficaz del tumor de aproximadamente 84% al 89% posterior a la extirpación, con resultados no favorables entre el 5% al 11% de los casos, metástasis a distancia entre un 5% a un 22%, y con hasta un 44% de generación de nuevos mastocitomas cercanos al sitio de extirpación. (Welle, Bley, Howard, & Rüfenacht, 2008)

La terapia adyuvante con radiación puede controlar de mejor forma el tumor bajo la incorporación de factores pronósticos como Ki67, ya que puede seleccionar a los pacientes que tienen mayores posibilidades de beneficiarse con la terapia local auxiliar. Por ejemplo en los tumores en extremidades, generalmente se opta por la amputación, pero con el uso de radioterapia y tasas de factores pronósticos se puede realizar la escisión quirúrgica marginal dando excelentes resultados. (Uranovet, 2013)

En los perros que presentan mastocitomas de alto grado la supervivencia es de alto riesgo, pues varía entre 3,5 a 20 meses después de la escisión quirúrgica y radioterapia. Es por esta razón, que a pesar de que puedan encontrarse algunos casos con resultados aceptables

con cirugía y radioterapia, la mayoría de los oncólogos veterinarios aseguran que la terapia local es insuficiente para un control óptimo de los mastocitomas de alto grado. (Welle, Bley, Howard, & Rüfenacht, 2008)

Los mastocitomas metastásicos o mastocitomas que presentan recidiva local deben tratarse basada en las reglas similares a las de la enfermedad inicial mediante el tratamiento sistémico con vinblastina/prednisona, puesto que es la elección recomendada de la quimioterapia. (Uranovet, 2013) sin embargo existen otros protocolos con combinación de fármacos como la vinblastina/ciclofosfamida/prednisona o vinblastina/CCNU (lomustina)/prednisona. Lamentablemente estos fármacos generan toxicidad prevalente de hasta un 26%, donde incluso debe suspenderse el tratamiento por hospitalización, vómitos y/o neutropenia. (Welle, Bley, Howard, & Rüfenacht, 2008)

Sin embargo existen otras modalidades de tratamiento, donde se incluyen:

Braquiterapia intralesional que consiste en la inserción de material radioactivo intralesional donde utiliza yodo 125, que es un isotopo de baja energía 35,5 KeV. Se inserta directamente en el tejido con una profundidad de 2cm y su vida media es de 60 días. (Jiménez, Duarte, Bittar, & Quintero, 2002)

Terapia fotodinámica que consiste en aplicar una crema que contiene el fotosensibilizante donde se deja incubar por tres horas mientras va ingresando al tumor. Posterior a las tres horas se ilumina con luz infrarroja y el tumor resulta selectivamente destruido (Jaén & Gilabert, 2014)

Corticosteroides intralesiales que implican su aplicación directamente en la lesión sobre la piel para obtener mejores resultados y de forma rápida.

Actualmente varios fármacos se han dirigido al receptor tirosin quinasa en KIT, siendo probados in vitro y se han reportado algunas respuestas variables en perros con mastocitoma en estudios de fase I con estos inhibidores.

## **1.6. Masitinib**

Masitinib es un principio activo que inhibe de forma potencial y selectiva al receptor c-kit de forma normal o mutaciones presentes en el dominio extracelular (exones 8 y 9) y el dominio yuxtamembrana (exón 11). (Zemke, Yamini, & Yuzbasiyan-Gurkan, 2002)

Diversos estudios han demostrado que paralelamente inhibe el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), proteína Lyn y FAK, abriendo nuevas perspectivas para el tratamiento de tumores y prevención de metástasis para ser utilizado como agente individual o acompañado de otros anticancerígenos. (Uranovet, 2013)

Su mecanismo de acción radica en el control de la proliferación, diferenciación y degranulación de los mastocitos que sugieren múltiples beneficios potenciales para otros procesos que cursan con disfunciones de estos. (Uranovet, 2013)

## **CAPITULO 2. Hipótesis**

El bloqueo del receptor c-Kit mediante Masitinib, conducirá a una disminución en la actividad proliferativa y angiogénica en el mastocitoma canino independiente del grado de malignidad

## **CAPITULO 3. Objetivos**

### **3.1. Objetivo general**

Evaluar el rol del receptor kit en la progresión del mastocitoma canino como posible blanco terapéutico.

### **3.2. Objetivos específicos**

- Evaluar el efecto del bloqueo del receptor KIT sobre actividad proliferativa en mastocitoma canino mediante marcador PCNA.
- Evaluar el efecto del bloqueo del receptor KIT sobre actividad angiogénica en mastocitoma canino mediante marcador CD31.
- Determinar la correlación entre actividad angiogénica y proliferativa en mastocitoma canino según grado de malignidad

## **CAPITULO 4. Materiales y métodos**

### **METODOLOGÍA:**

#### **4.1. Tipo de estudio**

Correlacional descriptivo

#### **4.2. Lugar de realización**

Toma de muestras y seguimiento de Pacientes fueron realizadas en Centros Veterinarios Ubicados en la Región Metropolitana de Chile.

Análisis histopatológico de biopsias se llevaron a cabo en el Laboratorio de Medicina Veterinaria – UNAB. Ubicado en Republica 440, comuna de Santiago de Chile.

#### **4.3. Métodos de selección**

Se estudiaron 15 pacientes que presentaban mastocitoma canino, correspondientes a casos de cada grado de diferenciación, provenientes de caninos entre 2 a 10 años de edad, sin distinción de sexo ni raza, ya que no constituyen un criterio de exclusión para el objetivo de este estudio. Fue necesario que las muestras a analizar presentaran proceso tumoral de mastocitoma confirmado mediante biopsia.

##### **4.3.1. Criterios de inclusión:**

Muestras de especímenes caninos con diagnóstico confirmado correspondiente con mastocitoma

### 4.3.2. Criterios de exclusión:

Pacientes caninos con metástasis o quienes hayan recibido tratamiento con quimioterapia y/o corticoides en un periodo de 6 meses previo al estudio.

Tabla N°7: Muestras presentes en el estudio.

Paciente	Raza	Sexo	Antecedentes Clínicos	Conclusión Biopsia
1	Mestizo	Hembra	Masa en codo. Citología anterior con Dx Células de mastocitoma. Requiere biopsia para confirmación histopatológica.	Mastocitoma de bajo grado
2	Bóxer	Macho	Piel zona femoral. Lesión única, bordes delimitados, curso crónico.	Mastocitoma de bajo grado
3	Mestizo	Hembra	Belfo superior izquierdo. Lesión proliferativa, única, esférica, delimitada, de 3x3x3cm, crónico, posiblemente traumático, aspecto maligno.	Mastocitoma de bajo grado
4	Mestizo	Macho	Neoplasia cutánea en región pre escapular izquierda, curso aprox 6 meses, sangrante, ulcerada, sin tratamiento, extracción completa.	Mastocitoma de bajo grado
5	Bóxer	Hembra	Biopsias de piel de dorso lumbar zona carpal MAD, aspecto benigno.	Mastocitoma de bajo grado

<b>6</b>	Mestizo	Hembra	Glándula mamaria torácica. Lesión proliferativa, única, esférica, delimitada, de 4x4x3cm, agudo, estidio de bordes.	Mastocitoma de bajo grado
<b>7</b>	Meztizo	Macho	Neoplasia subcutánea a nivel inguinal. Lesión múltiple (2), ovoide, no definido, crónico de 5cm. Rápido crecimiento	Mastocitoma de alto grado
<b>9</b>	Pitbull	Macho	Presenta lesión neoplásica en muslo izquierdo, proliferativa, multiple, bordes no definidos de curso crónico.	Mastocitoma de bajo grado
<b>10</b>	Bulldog	Macho	Neoplasia escrotal. Lesión no proliferativa, única, bordes delimitados, curso crónico.	Mastocitoma de bajo grado
<b>11</b>	Chihuahua	Macho	Neoplasia a nivel cutáneo, ulcerada, móvil, de curso crónico. Extraída de subcutáneo, posible linfonodo de zona axilar.	Mastocitoma de bajo grado
<b>12</b>	Labrador	Macho	Lesión en piel a nivel de tetilla, ulcerada, secreción purulenta, mal olor. Proliferativa, irregular y bordes delimitados.	Mastocitoma de bajo grado

13	Bóxer	Macho	Piel y subcutáneo cara caudal muslo izquierdo. Lesión única, crónica.	Mastocitoma de alto grado
14	Boodhound	Macho	Piel a nivel del esternón. Lesión única, esférica, delimitada, de 3x3x3cm, días de curso, aspecto maligno.	Mastocitoma de alto grado
15	Bóxer	Hembra	Piel muslo derecho. Lesión no proliferativa, única, esférica, delimitada, de 3x3x2cm, agudo.	Mastocitoma de alto grado

*Tabla resumida obtenida de muestras de pacientes en estudio presente en el anexo.*

En primera instancia, los pacientes caninos con sospecha clínica de mastocitoma (MCC) fueron sometidos a un diagnóstico citológico mediante punción por aguja fina.

Aquellos pacientes positivos a la citología, fueron sometidos a evaluación clínica incluyendo examen físico, imageneológico y de laboratorio clínico donde se les extrajeron 2 ml de sangre periférica de vena radial.

Los pacientes que presentaron neoplasias en estadio I o II, fueron sometidos a procedimiento de biopsia incisional (2 muestras de 3mm de diámetro). Esta toma de muestra tuvo por objetivo la confirmación del diagnóstico y evaluación del estudio en tiempo 0. (Tabla N°7)

#### **4.4. Dosificación del Masitinib.**

Mediante previo consentimiento de sus dueños, los pacientes fueron expuestos a tratamiento con Masitinib (Masivet ®) con administración oral por un periodo de 7 días siguiendo las dosis recomendadas por EMEA (agencia europea de medicamentos) (EMEA, 2014), es decir, 12,5 mg/kg (con un intervalo posológico de 11-14 mg/kg) una vez al día. El

fármaco viene en dos presentaciones de 50mg o de 150 mg, por lo que se calcula el peso del paciente y de dosifica según estándares ya mencionados.

Durante este periodo los pacientes se mantuvieron hospitalizados recibiendo atención especializada con monitoreo continuo.

Los comprimidos se administraron enteros, sin partarlos, romperlos ni triturarlos.

#### **4.5. Seguimiento de los pacientes y Ética.**

Los pacientes se hospitalizaron en caniles individuales, temperatura controlada, supervisión de 24 horas al día y todo el equipamiento clínico que un paciente necesita al momento de ser hospitalizado.

Además los animales fueron supervisados por un especialista de bienestar animal para contrarrestar al máximo los efectos del estrés inducido por la separación de su entorno familiar.

Se utilizó feromona de apaciguamiento canina (DAP®) durante la hospitalización como enriquecimiento de tipo sensorial. Además se realizó enriquecimiento de tipo ocupacional-nutricional mediante juguete Kong, que disminuye la ansiedad en canes, en la cual se incorporó parte de la ración diaria del canino para estimular la conducta de forrajeo y juego. Así mismo, los pacientes recibieron enriquecimiento de tipo social y ocupacional a través de dos paseos individuales diarios de 20 minutos, que estuvieron a cargo del médico veterinario de turno.

Finalmente, a los pacientes caninos se les realizó un examen físico completo, imagenológico (por ultrasonido y Rx digital), de laboratorio clínico (hemograma, perfil completo, urianálisis, gases y electrolitos), para lo cual se les extrajeron 2ml de sangre periférica, de vena radial. En este punto se realizó también la toma de muestra de tejido post tratamiento.

## **4.6. Procesamiento de Muestras**

Las biopsias obtenidas fueron expuestas a procedimiento histológico mediante procesador de tejidos Leica TP1020 durante 12 horas.

Se obtuvieron muestras seriadas con micrótopo Leica RM2125 RTS de 4 $\mu$ m de espesor para poder llevar a cabo la tinción mediante técnica histológica de rutina (Hematoxilina Eosina) y técnica histoquímica (azul de Toluidina) para poder analizar la muestra tisular de la biopsia completa y posteriormente delimitar en los bloques de parafina la zona más representativa para la confección del Tissue Micro Array.

### **4.6.1. Construcción de Tissue MicroArray (TMA)**

El Tissue micro array o microarray tisular permite analizar centenares de muestras de tejido proporcionando la posibilidad de estudiar diversos marcadores de manera extensa en varios pacientes a la vez, obteniendo información sobre aspectos diagnósticos, pronósticos y terapéuticos. Se construye adquiriendo muestras cilíndricas de 3 mm de diámetro extraídas desde las zonas de interés a estudiar a partir de los bloques de parafina. Todos los cilindros así obtenidos se incorporan a un bloque de parafina receptor que contiene entre 18 y 24 muestras y que a su vez, es cortado en múltiples secciones, para así después llevar a cabo las distintas pruebas que se quieran ensayar. (Tinción de rutina, histoquímica e Inmunohistoquímica).

Para la construcción del TMA, se utilizó Quick-Ray Manual Tissue Microarrayer, que consta de 4 medidas de diámetro distinto (1, 2, 3, y 5 mm.). Para que la muestra obtenida de cada caso sea representativa y no pierda morfología, además de tener una buena celularidad, se trabajó con la medida de 3 mm correspondientes a pacientes previos y posteriores al tratamiento, incluyendo además un área control para las técnicas inmunohistoquímicas.

#### **4.6.2. Tinciones y técnicas aplicadas en el estudio.**

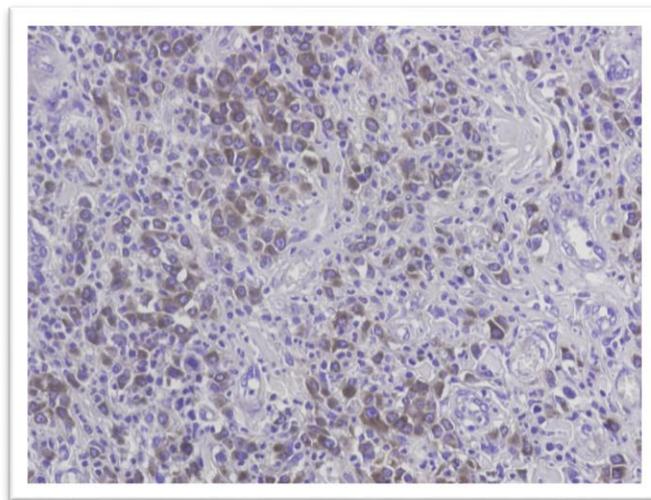
Las técnicas aplicadas en este estudio fueron la tinción de hematoxilina eosina como análisis de rutina para identificar el grado histológico de cada muestra de mastocitoma, además se realizó tinción histoquímica de azul de toluidina (Sigma-Aldrich) al 1% para evaluar y confirmar grado de malignidad de los mastocitomas y nivel de granulación. Además se realizaron inmunotinciones con anticuerpos CD117 para la expresión de receptores C-kit, CD31 para neovascularización, PCNA para proliferación celular y técnica de TUNEL para evaluar niveles de apoptosis. (Información de tinciones, técnicas y protocolos adjuntos en el anexo)

#### **4.6.3. Evaluación de las placas obtenidas**

El análisis cuantitativo de las muestras más representativas se estableció por el área positiva a la inmunotinción en  $\mu\text{m}^2$ , con el uso de un programa de análisis morfométrico computacional (Image Pro-Plus, Media Cybernetics, USA), calculándose un valor promedio en un campo previamente elegido, con aumento de 200X, determinados en un microscopio (LeicaDM1000 conectado a una cámara de video (Leica DFC290) y a un computador, como muestran las siguientes imágenes a continuación.

Figura 5: Ejemplificación de metodología Image Pro Plus ®

a)



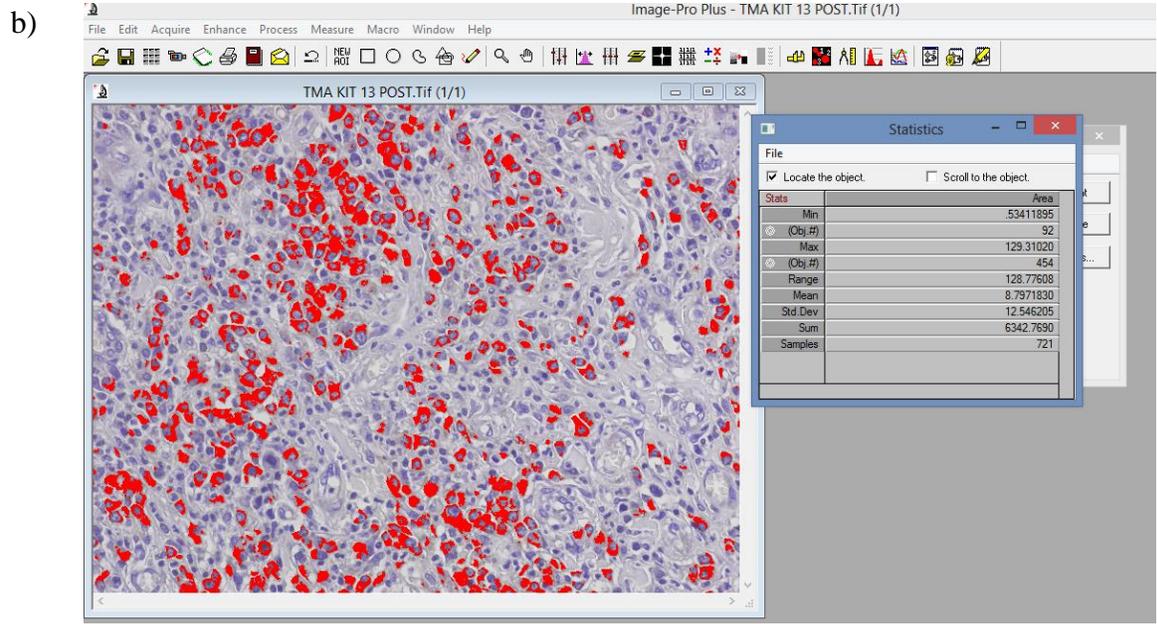
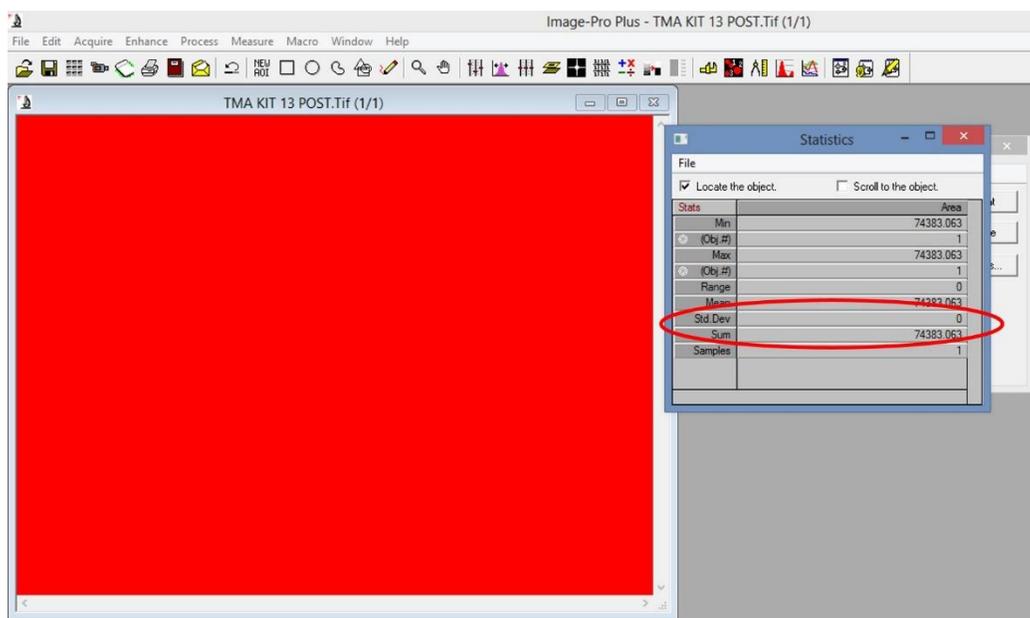


Figura N°5 a y b) ejemplificación de metodología utilizada mediante Image Pro Plus. a) representa microfotografía 200X sin tratamiento de Image Pro Plus. b) selección del área de inmunotinción positiva, con estadísticas de sumatoria y desviación estándar del área seleccionada.

El área total de análisis (100%) por campo de 200X fue de 74383.063  $\mu\text{m}^2$  (como muestra la figura 5) con desviación estándar 0.

Figura 6: Área total de análisis.



Aquellas muestras que presentaron background y que la señal no fue fidedigna para ser analizada computacionalmente mediante Image Pro-Plus fueron eliminadas del estudio.

## **CAPITULO 7. Resultados.**

Ninguna de las muestras del paciente N°8 fue factible de analizar por dificultades persistentes en el procesamiento de estas muestras, presentando desprendimiento de tejido en reiteradas ocasiones lo que llevó a la pérdida completa del tejido muestreado. Muestras de otros pacientes sufrieron problemas similares pero en forma puntual, por lo que se perdió información sólo para algunos marcadores. Así, cuando no fue posible leer las muestras por estos problemas técnicos se consignó como ND (*not done*).

### **Análisis morfométrico:**

Las inmuno marcaciones fueron leídas y analizadas, mediante el software *Image Pro Plus*, obteniendo áreas totales de marcación en  $\mu\text{m}^2$  y luego se calcularon los porcentajes correspondientes, respecto del total del área estudiada por campo de 200x, que para todos los casos de este estudio fue equivalente.

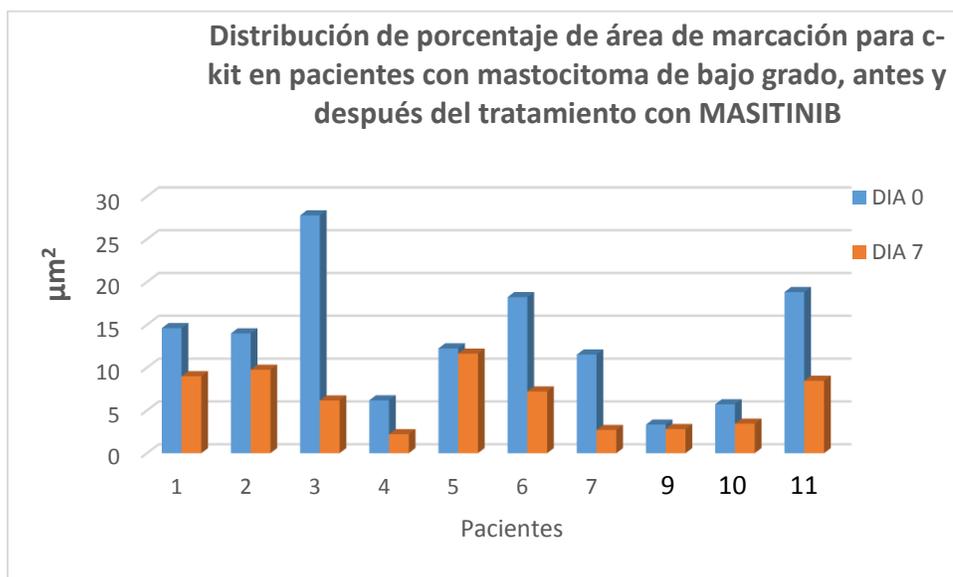
De esta manera, en la tabla 8 se presentan los resultados obtenidos para marcación de receptor KIT en pacientes con mastocitoma de bajo grado, Se consideran los resultados obtenidos al día 0, previo al tratamiento y los resultados observados después de 7 días de tratamiento. En la mayoría de los pacientes considerados (8 de 10) se observa una marcada disminución de la expresión del receptor KIT alcanzando reducciones de 30,41% a 77,87% del valor del área inmunomarcada antes del tratamiento. Sólo en dos pacientes, 5 y 9, el % de reducción fue menor alcanzando sólo 5,01% y 15,37%, respectivamente. Sin embargo, es necesario considerar que en todos los casos se observó menor expresión (ver Fig 7), alcanzando un % de reducción promedio de  $46,32 \pm 24,76$  (ver tabla 8).

Tabla 8: Distribución de área y porcentaje de marcación para c-kit en pacientes con mastocitoma de bajo grado, antes y después del tratamiento con MASITINIB.

C-KIT	PRE TRATAMIENTO		POST TRATAMIENTO		% Disminución área final
	Área		Área		
N° del paciente	$\mu\text{m}^2$	%	$\mu\text{m}^2$	%	
1	10865,36	14,61	6678,14	8,98	-38,54
2	10407,84	13,99	7243,13	9,74	-30,41
3	20661,48	27,78	4571,57	6,15	-77,87
4	4588,93	6,17	1643,91	2,21	-64,18
5	9102,93	12,24	8646,53	11,62	-5,01
6	13561,22	18,23	5361,7	7,21	-60,46
7	8565,50	11,52	2018,16	2,71	-76,44
8	ND*	ND	ND	ND	ND
9	2482,37	3,34	2100,95	2,82	-15,37
10	4249,02	5,71	2555,22	3,44	-39,86
11	13999,36	18,82	6288,82	8,45	-55,08
12	ND	ND	ND	ND	ND
X	9.848,40	13,24	4.710,81	6,33	-46,32
DS	6.226,13	8,37	2.920,25	3,93	24,76

\*ND: (not done) datos no obtenidos por daño de las muestras ocurrido durante procesamiento.

Figura 7



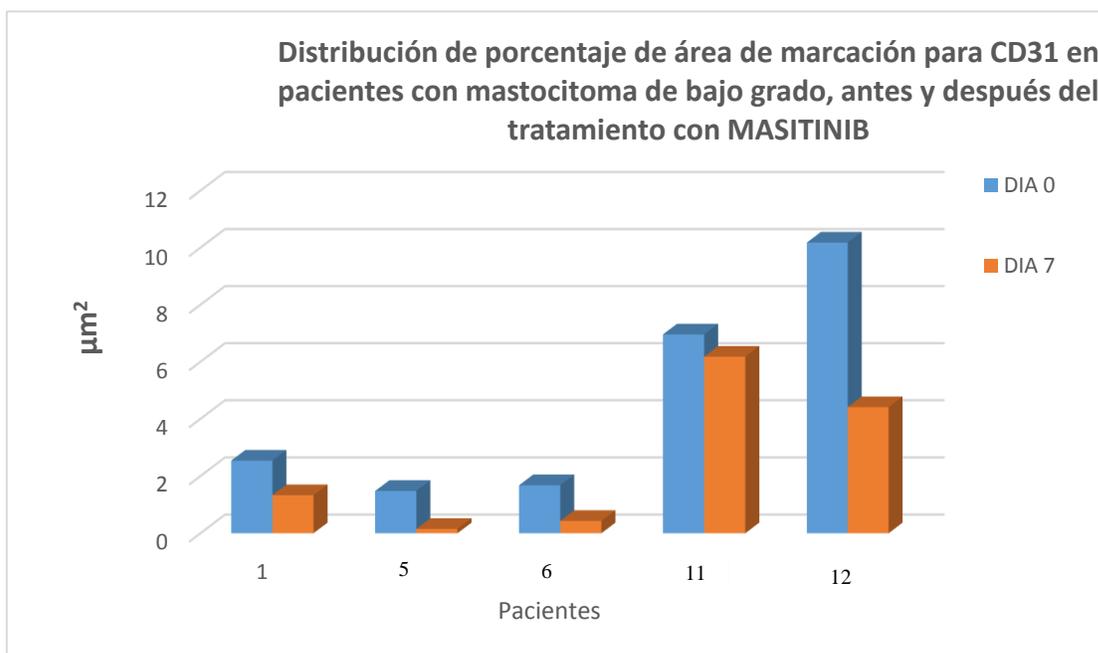
En la tabla 9 se presentan los resultados obtenidos para marcación de CD31, como indicador de angiogénesis, en pacientes con mastocitoma de bajo grado, Se consideran los resultados obtenidos al día 0, previo al tratamiento y los resultados observados después de 7 días de tratamiento. En casi todos los pacientes considerados (4 de 5) se observa una marcada disminución de la expresión de CD31 alcanzando reducciones de 47,56% a 90,18% del valor del área inmunomarcada antes del tratamiento. Sólo en el paciente 11 el % de reducción fue menor alcanzando sólo un 11,19%. Sin embargo, es necesario considerar que en todos los casos se observó menor expresión (ver Fig 8), alcanzando un % de reducción promedio de  $55,94 \pm 29,90$  (ver tabla 9).

Tabla 9: Distribución de área y porcentaje de marcación para CD31 en pacientes con mastocitoma de bajo grado.

CD 31	PRE TRATAMIENTO		POST TRATAMIENTO		% Disminución área final
	Área		Área		
	$\mu\text{m}^2$	%	$\mu\text{m}^2$	%	
1	1889,60	2,54	991,00	1,33	-47,56
2	ND*	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	ND	ND
5	1103,64	1,48	108,37	0,15	-90,18
6	1246,84	1,68	322,60	0,43	-74,13
7	ND	ND	ND	ND	ND
8	ND	ND	ND	ND	ND
9	ND	ND	ND	ND	ND
10	ND	ND	ND	ND	ND
11	5180,04	6,96	4600,36	6,18	-11,19
12	7568,94	10,18	3282,00	4,41	-56,64
X	3.397,81	4,57	1.860,87	2,50	-55,94
DS	2.534,28	3,52	1.586,27	2,21	29,90

\*ND: (not done) datos no obtenidos por daño de las muestras ocurrido durante procesamiento

Figura 8



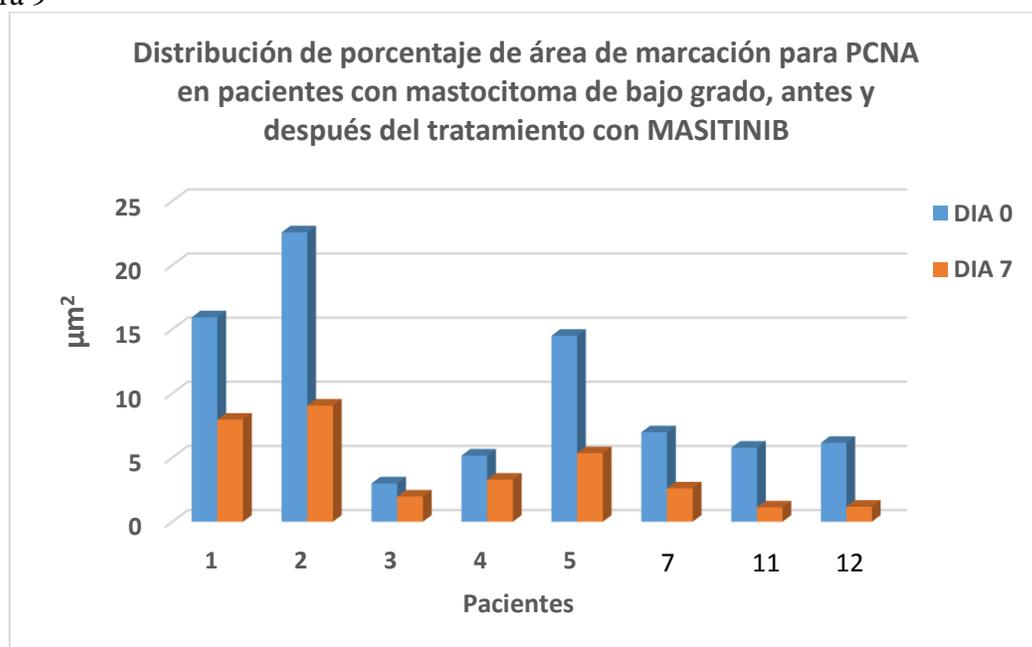
En la tabla 10 se presentan los resultados obtenidos para marcación de PCNA, como indicador de proliferación celular, en pacientes con mastocitoma de bajo grado, Se consideran los resultados obtenidos al día 0, previo al tratamiento y los resultados observados después de 7 días de tratamiento. En todos los pacientes considerados (8 de 8) se observa una marcada disminución de la expresión del antígeno de proliferación celular PCNA alcanzado reducciones de 81,08% a 34,12% del valor del área inmunomarcada antes del tratamiento. En este caso también se pudo observar que en todos los casos considerados había una menor expresión (ver Fig 9), alcanzando un % de reducción promedio de  $58,41 \pm 16,57$  (ver tabla 10).

Tabla 10: Distribución de área y porcentaje de marcación para PCNA en pacientes con mastocitoma de bajo grado.

PCNA	PRE TRATAMIENTO		POST TRATAMIENTO		% Disminución área final
	Área		Área		
	$\mu\text{m}^2$	%	$\mu\text{m}^2$	%	
1	11849,58	15,93	5907,24	7,94	-50,15
2	16776,94	22,55	6725,41	9,04	-59,91
3	2214,18	2,98	1458,67	1,96	-34,12
4	3831,34	5,15	2433,07	3,27	-36,50
5	10767,73	14,48	3967,59	5,33	-63,15
6	ND*	ND	ND	ND	ND
7	5174,38	6,96	1926,72	2,59	-62,76
8	ND	ND	ND	ND	ND
9	ND	ND	ND	ND	ND
10	ND	ND	ND	ND	ND
11	4284,75	5,76	825,05	1,11	-80,74
12	4567,62	6,14	864,15	1,16	-81,08
X	7.433,32	9,99	3.013,49	4,05	-58,41
DS	5.466,52	7,35	2.347,59	3,16	16,57

\*ND: (not done) datos no obtenidos por daño de las muestras ocurrido durante procesamiento

Figura 9



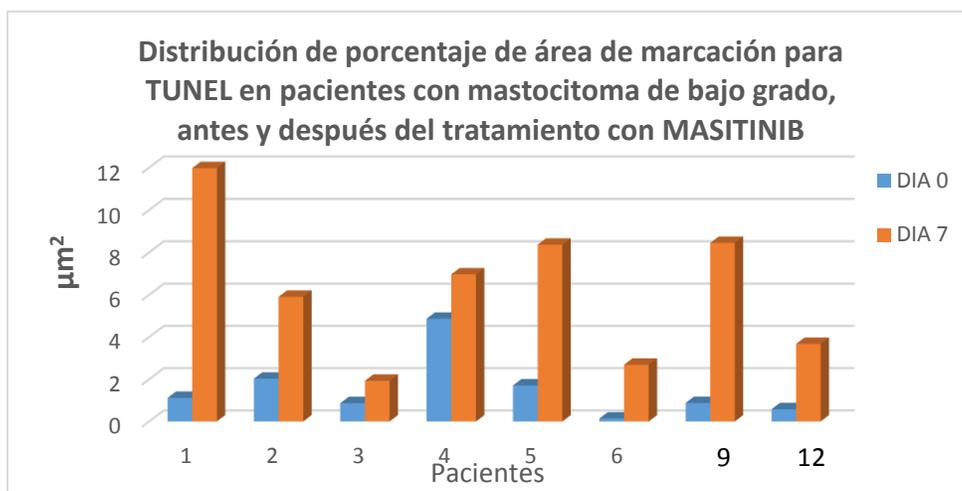
En la tabla 11 se presentan los resultados obtenidos para marcación de TUNEL, como indicador de apoptosis celular, en pacientes con mastocitoma de bajo grado, Se consideran los resultados obtenidos al día 0, previo al tratamiento y los resultados observados después de 7 días de tratamiento. En todos los pacientes considerados (8 de 8) se observa un marcado aumento de la fragmentación de ADN del tipo asociado a activación de caspasas, que es lo que permite evidenciar la inmuno marcación TUNEL. En este caso se alcanzaron aumentos de 43,12% a 1028,35% del valor del área inmunomarcada antes del tratamiento. En este caso se pudo observar que en todos los casos considerados había una mayor expresión (ver Fig 10), alcanzando un % de aumento promedio de  $616,60 \pm 594,13$  (ver tabla 11).

Tabla 11: Distribución de área y porcentaje de marcación TUNEL en pacientes con mastocitoma de bajo grado.

<b><u>TUNEL</u></b>	<b>PRE TRATAMIENTO</b>		<b>POST TRATAMIENTO</b>		<b>% Aumento área final</b>
	Área		Área		
	$\mu\text{m}^2$	%	$\mu\text{m}^2$	%	
1	835,73	1,12	8909,47	11,98	966,07
2	1511,71	2,03	4396,92	5,91	190,86
3	645,37	0,87	1438,75	1,93	122,93
4	3624,37	4,87	5187,09	6,97	43,12
5	1273,66	1,71	6229,00	8,37	389,06
6	103,51	0,14	2000,30	2,69	1028,35
7	ND*	ND	ND	ND	ND
8	ND	ND	ND	ND	ND
9	656,69	0,88	6282,04	8,45	856,62
10	ND	ND	ND	ND	ND
11	ND	ND	ND	ND	ND
12	433,11	0,58	2735,70	3,68	531,64
X	1.135,52	1,53	4.647,41	6,25	616,60
DS	1.040,59	1,40	3.048,78	4,10	594,13

\*ND: (not done) datos no obtenidos por daño de las muestras ocurrido durante procesamiento

Figura 10



En la tabla 12 se presenta un resumen de la distribución de porcentajes de variación para cKIT, CD31, PCNA y TUNEL en pacientes con mastocitoma de bajo grado, después del tratamiento con MASITINIB por 7 días. En la figura 11 se presentan los resultados de acuerdo a cada paciente y en la figura 12 los resultados se presentan de acuerdo a cada marcador.

Tabla 12: Distribución de porcentajes de variación para cKIT, CD31, PCNA y TUNEL en pacientes con mastocitoma de bajo grado, después del tratamiento con MASITINIB por 7 días.

N° de Paciente	c KIT	CD31	PCNA	TUNEL
1	-38,54	-47,56	-50,15	966,07
2	-30,41	ND*	-59,91	190,86
3	-77,87	ND	-34,12	122,93
4	-64,18	ND	-36,50	43,12
5	-5,01	-90,18	-63,15	389,06
6	-60,46	-74,13	ND	1832,47
7	-76,44	ND	-62,76	ND
8	ND	ND	ND	ND
9	-15,37	ND	ND	856,62
10	-39,86	ND	-57,29	ND
11	-55,08	-11,19	-80,74	ND
12	ND	-56,64	-81,08	531,64
PROMEDIO	-46,32	-55,94	-58,41	616,60
DESIVESTA	24,76	29,90	16,57	594,13

\*ND: (not done) datos no obtenidos por daño de las muestras ocurrido durante procesamiento

Figura 11

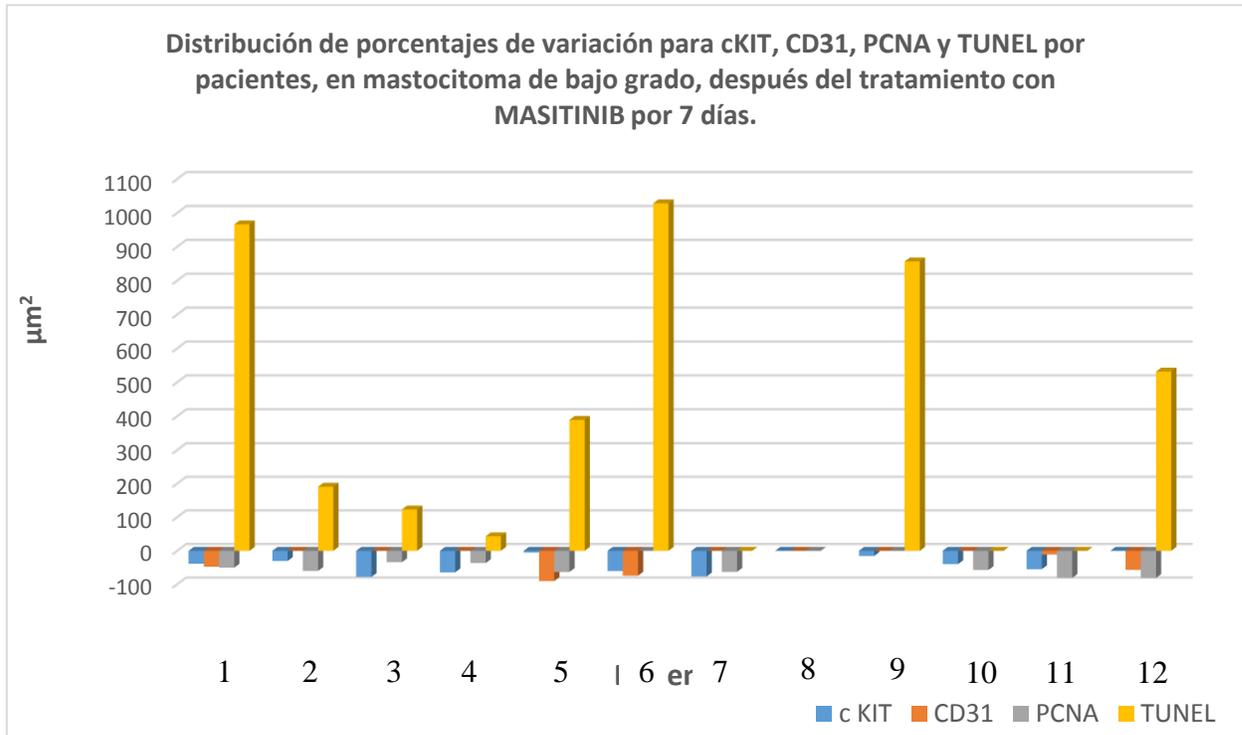
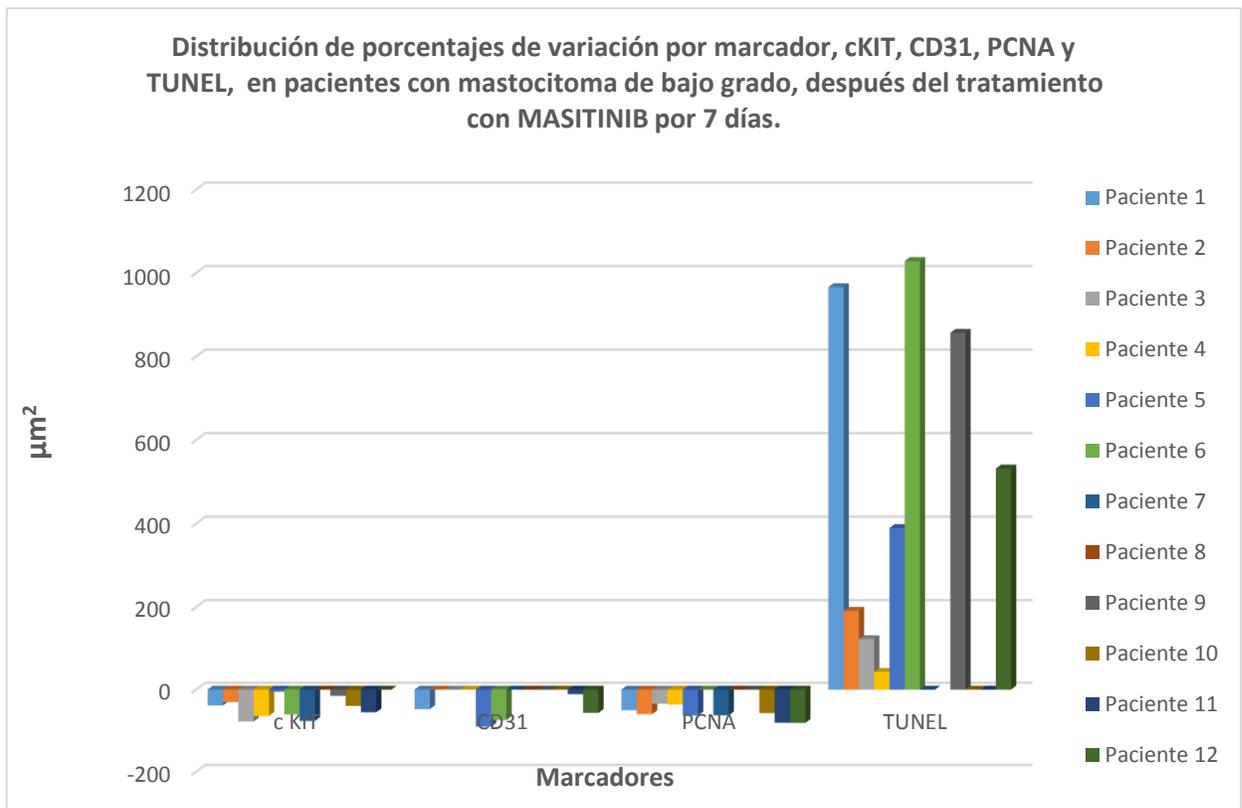


Figura 12

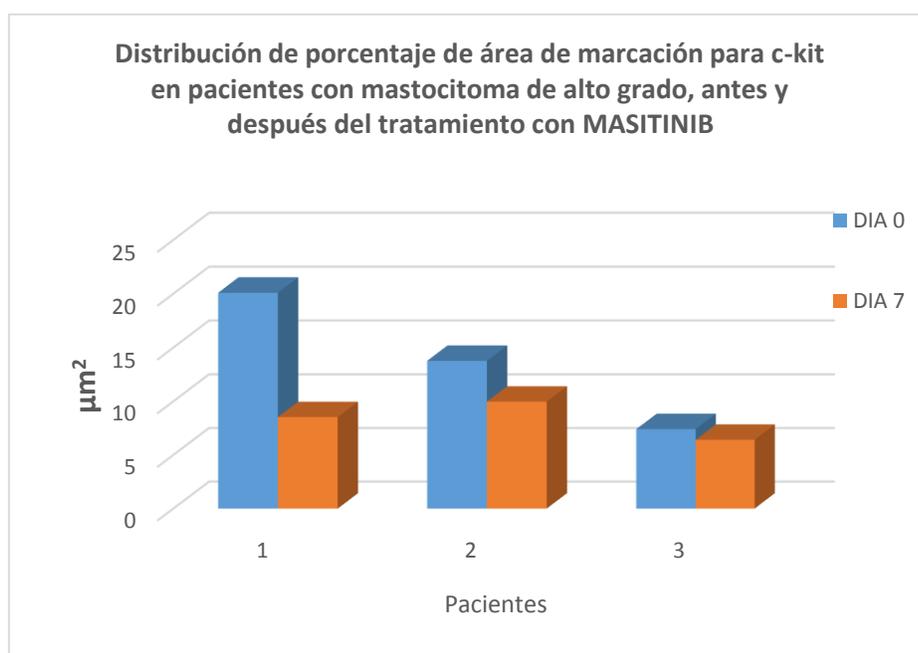


Para los pacientes con mastocitoma de alto grado se observaron los siguientes resultados: En la tabla 13 se presentan los resultados obtenidos para marcación de receptor KIT. Se consideran los resultados obtenidos al día 0, previo al tratamiento y los resultados observados después de 7 días de tratamiento. En los 3 pacientes considerados se observa una disminución leve a moderada de la expresión de receptor KIT alcanzando reducciones de 13,52% a 57,56% del valor del área inmunomarcada antes del tratamiento (ver figura 13). Sin embargo, se observó menor reducción de expresión que en pacientes con mastocitoma de bajo grado, alcanzando un % de reducción promedio de  $32,90 \pm 22,49$  (ver tabla 13).

Tabla 13: Distribución de área y porcentaje de marcación para c-kit en pacientes con mastocitoma de alto grado.

C-KIT	PRE TRATAMIENTO		POST TRATAMIENTO		% Disminución área final
	Área		Área		
N° de paciente	$\mu\text{m}^2$	%	$\mu\text{m}^2$	%	
1	14944,48	20,09	6342,76	8,53	-57,56
2	10244,88	13,77	7415,11	9,97	-27,62
3	5513,97	7,41	4768,72	6,41	-13,52
X	10.234,44	13,76	6.175,53	8,30	-32,90
DS	4.715,26	6,34	1.331,10	1,79	22,49

Figura 13

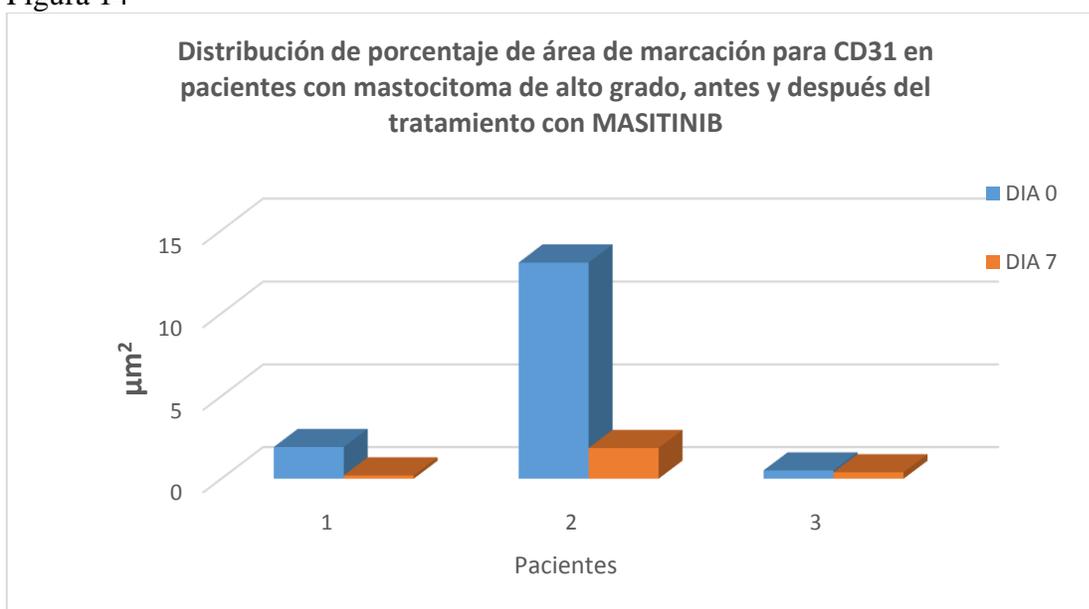


En la tabla 14 se presentan los resultados obtenidos para marcación CD31, como indicador de angiogénesis. Se consideran los resultados obtenidos al día 0, previo al tratamiento y los resultados observados después de 7 días de tratamiento. En los 3 pacientes considerados se observa una disminución moderada a intensa de la expresión de CD31 alcanzando reducciones de 21,73% a 89,59% del valor del área inmunomarcada antes del tratamiento (ver figura 14). En este caso se observó una mayor reducción de expresión de CD31 que en pacientes con mastocitoma de bajo grado, alcanzando un % de reducción promedio de  $65,59 \pm 38,12$  (ver tabla 14).

Tabla 14: Distribución de área y porcentaje de marcación para CD31 en pacientes con mastocitoma de alto grado.

CD31	PRE TRATAMIENTO		POST TRATAMIENTO		% Disminución área final
	Área		Área		
N° de paciente	$\mu\text{m}^2$	%	$\mu\text{m}^2$	%	
1	1431,27	1,92	149,01	0,20	-89,59
2	9718,18	13,06	1384,64	1,86	-85,75
3	369,24	0,50	289,01	0,39	-21,73
X	3.839,5	5,16	607,55	0,82	-65,69
DS	5.118,6	6,88	676,61	0,91	38,12

Figura 14

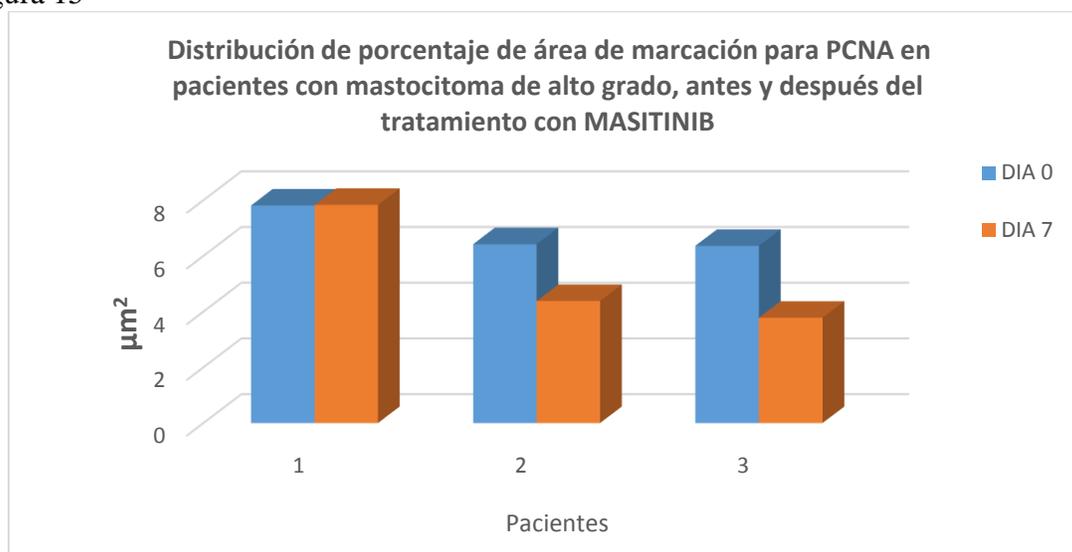


En la tabla 15 se presentan los resultados obtenidos para marcación PCNA, como indicador de proliferación celular. Se consideran los resultados obtenidos al día 0, previo al tratamiento y los resultados observados después de 7 días de tratamiento. En 2 pacientes considerados, 2 y 3, se observa una disminución moderada de la expresión de PCNA alcanzando reducciones de 31,73% y 40,64% del valor del área inmunomarcada antes del tratamiento, respectivamente (ver figura 15). En este caso se observó que el paciente número 1 no presentó efecto sobre la expresión de PCNA, manteniendo su nivel de expresión, con una disminución cercana a 0% (ver figura 15). El grupo alcanzó aproximadamente sólo el 50% de reducción de expresión de PCNA que en pacientes con mastocitoma de bajo grado, con un % de reducción promedio de  $24,05 \pm 21,49$  (ver tabla 15).

Tabla 15: Distribución de área y porcentaje de marcación para PCNA en pacientes con mastocitoma de alto grado.

PCNA	PRE TRATAMIENTO		POST TRATAMIENTO		% Disminución área final
	Área		Área		
N° de paciente	$\mu\text{m}^2$	%	$\mu\text{m}^2$	%	
1	5812,33	7,81	5825,74	7,83	0,23
2	4775,98	6,42	3260,79	4,38	-31,73
3	4733,41	6,36	2809,62	3,78	-40,64
X	5.107,2	6,86	3.965,38	5,33	-24,05
DS	611,00	0,82	1.626,83	2,19	21,49

Figura 15

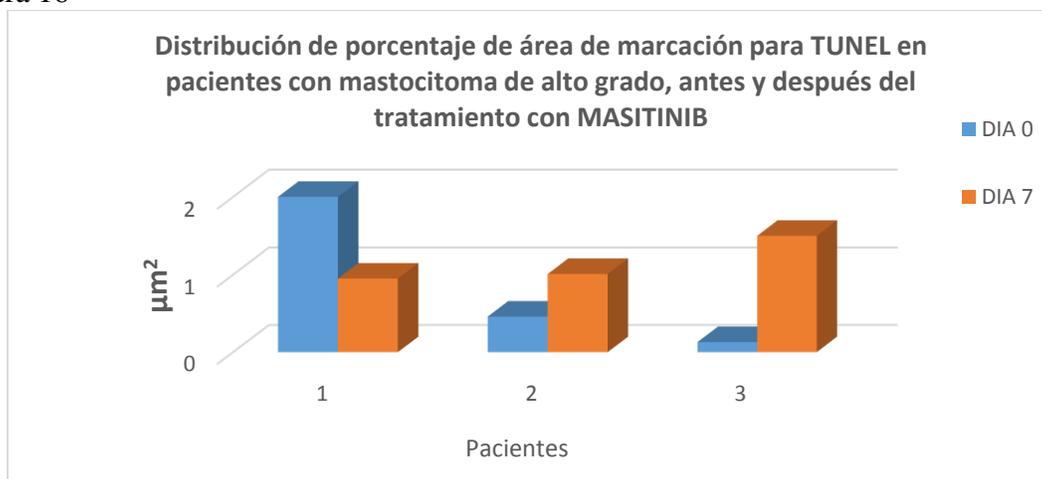


En la tabla 16 se presentan los resultados obtenidos para marcación TUNEL, como indicador de apoptosis celular. Se consideran los resultados obtenidos al día 0, previo al tratamiento y los resultados observados después de 7 días de tratamiento. En 2 pacientes considerados, 2 y 3, se observa un aumento marcado de la expresión de apoptósisis alcanzado aumentos de 121,22% y 1061,95% del valor del área inmunomarcada antes del tratamiento, respectivamente (ver figura 16). En este caso se observó que el paciente número 1 mostró una disminución de la apoptósisis con una disminución cercana a 50% (52,46%) (ver figura16). El grupo alcanzó aproximadamente sólo el 50% de reducción de apoptosis que en pacientes con mastocitoma de bajo grado, con un % de reducción promedio de  $376,90 \pm 599,59$  (ver tabla 16).

Tabla 16: Distribución de área y porcentaje de marcación TUNEL en pacientes con mastocitoma de alto grado.

TUNEL	PRE TRATAMIENTO		POST TRATAMIENTO		% Disminución área final*
	Área		Área		
N° de paciente	$\mu\text{m}^2$	%	$\mu\text{m}^2$	%	
1	1485,3	8	706,21	0,95	-52,46
2	340,92	0,46	754,17	1,01	121,22
3	95,87	0,13	1113,96	1,50	1061,95
X	640,72	0,86	858,11	1,15	376,90
DS	741,68	1,00	222,86	0,30	599,59

Figura 16



En la tabla 17 se presenta un resumen de la distribución de porcentajes de variación para cKIT, CD31, PCNA y TUNEL en pacientes con mastocitoma de alto grado, después del tratamiento con MASITINIB por 7 días. En la figura 17 se presentan los resultados de acuerdo a cada paciente y en la figura 18 los resultados se presentan de acuerdo a cada marcador.

Tabla 17: Resumen de distribución de porcentajes de variación de los diferentes marcadores en pacientes con mastocitoma de alto grado, después del tratamiento con MASITINIB por 7 días.

N° de paciente	CD31	KIT	PCNA	TUNEL
1	-89,59	-57,56	-0,23	-52,46
2	-85,75	-27,62	-31,73	121,22
3	-21,73	-13,52	-40,64	1061,95
PROMEDIO	-65,69	-32,9	-24,04	376,9
DESIVESTA	-38,12	-22,49	-21,49	599,59

Figura 17

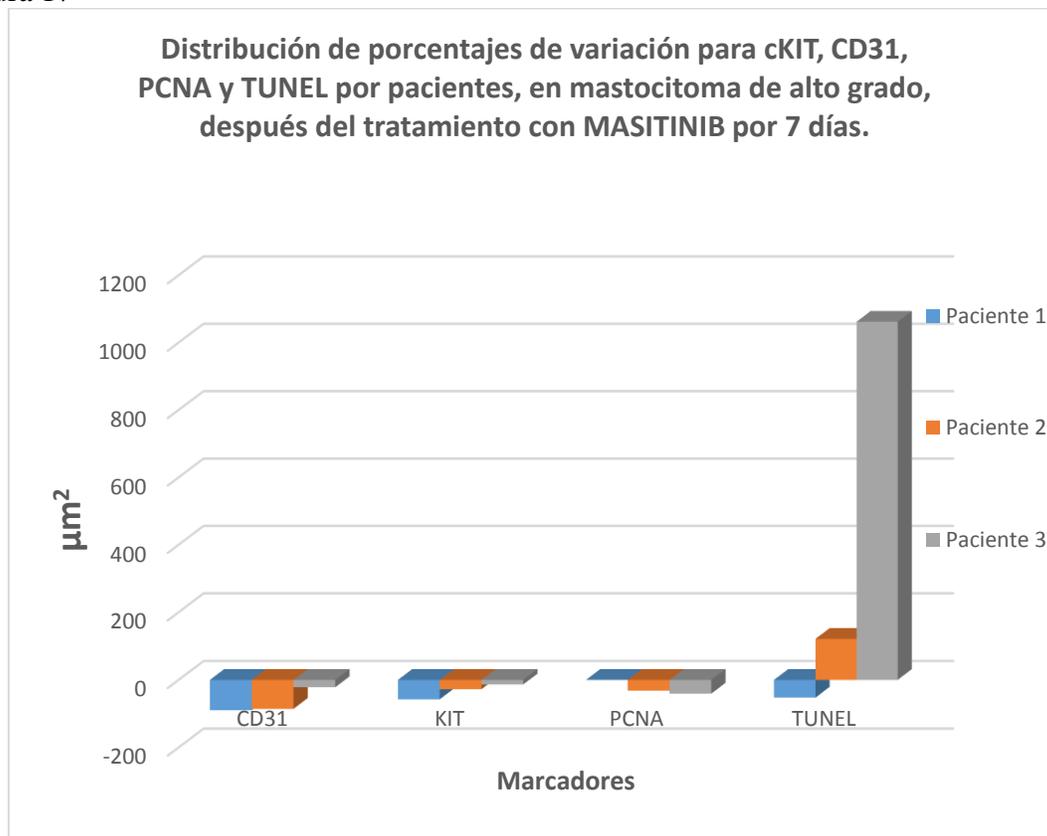
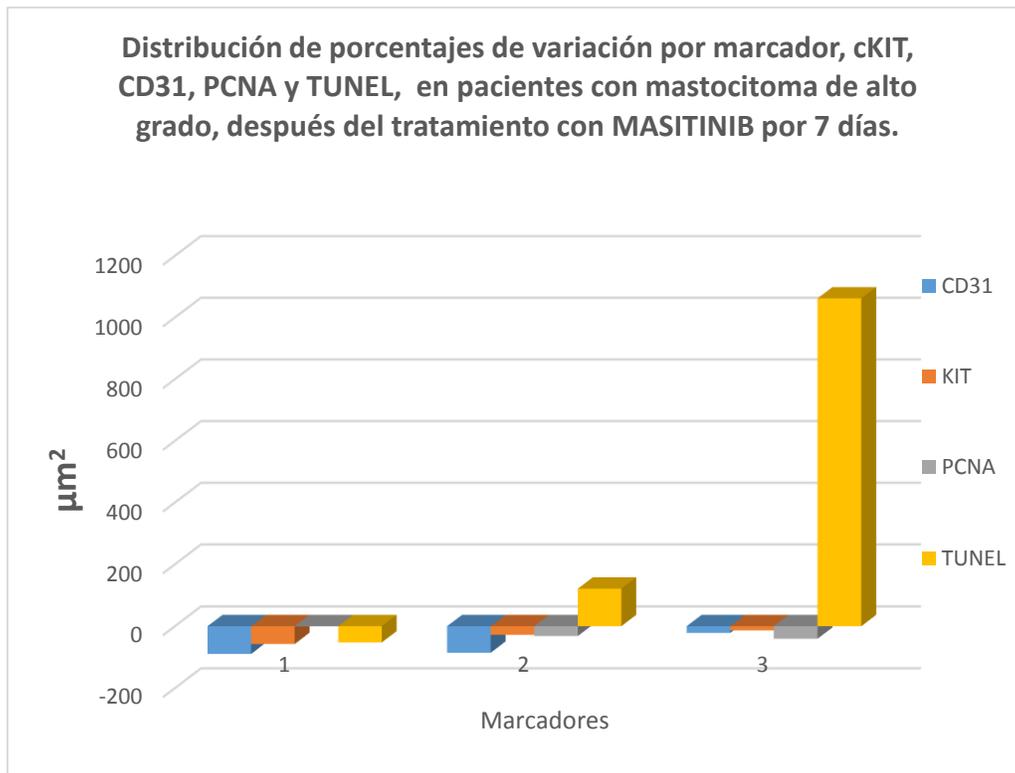


Figura 18



## **CAPITULO 8: Discusión.**

Este estudio demostró que Masitinib puede ser eficaz como terapia dirigida contra mastocitoma. Así, posterior al tratamiento de 7 días, todos los casos presentaron una disminución en la población celular total asociado a una disminución considerable de la proliferación junto a un aumento significativo en apoptosis celular. Se sabe que cuando se bloquea un receptor, se puede inhibir su función, en el caso de esta droga en particular, parece inhibir la expresión del receptor Kit, ya que se observó una disminución de la inmuno marcación para este receptor en todos los casos estudiados, independientemente del nivel de expresión observado en el tiempo 0, antes del tratamiento. Así, en promedio se obtuvo disminución en un 42.11% en la expresión de C-kit en pacientes con mastocitoma de bajo grado y un 32.9% en los pacientes de alto grado.

El anticuerpo escogido para analizar la proliferación celular en este estudio fue el PCNA, anticuerpo monoclonal que reconoce una proteína nuclear de 36 Kd que está asociada con una DNA-polimerasa delta que es la responsable de inicial la duplicación del DNA. (Luque, Muñoz, Romero, Langhi, & Romero, 1993)

El PCNA está presente en las células normales en proliferación y en zonas normales adyacentes a ciertos tumores se ha observado una sobreexpresión de esta proteína posiblemente debido a la degranulación del gen PCNA y a estímulos paracrinos o autocrinos (Hall, Levinson, & Woods, 1990). Sin embargo en los mastocitomas existe una señal exacerbada en los receptores de crecimiento, como los anteriormente descritos y el receptor de transformación  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) estimulando de esta manera la proliferación celular.

Para la visualización de apoptosis se utilizó la técnica de TUNEL que consiste en la observación de los fragmentos de DNA marcados mediante la incorporación catalítica de 16dUTP marcado en los extremos libres por medio de la enzima transferasa deoxinucleotidil terminal (TdT). De esta manera se pueden visualizar aquellas células que presentan roturas de DNA características de la apoptosis.

La disminución de la población celular de mastocitos no sólo estaba asociada a una disminución en proliferación celular, sino además se observó un aumento en la muerte celular

de células neoplásicas. Lo observado frente al ensayo fue una respuesta sorprendente puesto que el aumento de apoptosis post tratamiento en la mayoría de los casos supera el 100% llegando en un solo caso incluso hasta 1800% con respecto a lo observado antes del tratamiento. Los valores obtenidos de forma general en mastocitomas de bajo grado es un aumento en la apoptosis en un 616,6% respecto al pre tratamiento y de un 376,9% en los pacientes de alto grado.

Sin embargo el paciente 13 de alto grado que presentaba una leve disminución de proliferación celular, presentó una disminución significativa en la respuesta apoptótica de un 52.46%. Infiriendo de esta manera que ambos procesos van directamente relacionados, según también como lo indican estudios de la respuesta del Masitinib en sarcomas felinos con tumor primario y metastásicos (Lawrence, y otros, 2012)

En definitiva, todos los casos mostraron tener variación respecto a su primera situación previa al tratamiento. Además se observó que variaron de forma similar, respecto a su variación de c-kit inicialmente con resultados muy concordantes entre sí.

Los resultados obtenidos mediante técnica de TUNEL son los únicos que variaron de forma independiente, pero es un resultado esperable puesto a que el efecto de esta droga va relacionada a la inducción de apoptosis.

Finalmente los pacientes de alto grado parecen disminuir la proliferación celular con mayor dificultad (24.04%) que los pacientes que presentan bajo grado (58.41%) y a su vez una mayor dificultad para producir apoptosis (376.9%) en comparación a los de bajo grado (616.6%).

Por otro lado, en este estudio se observó una disminución importante en angiogénesis. Es necesario considerar que Masitinib fue diseñado específicamente para optimizar su potencialidad frente a RTKs, dentro de los cuales se encuentran PDGF-R (receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas), VEGF-R (receptor de crecimiento del endotelio vascular) y FGF-R (receptor de factor de crecimiento fibroblástico).

El complejo receptor ligando VEGF constituye una de las vías de la angiogénesis mejor estudiadas en el cáncer. El VEGF se une a su receptor correspondiente en las células endoteliales, estimulando su crecimiento, proliferación y migración celular, lo que conlleva a la neoformación de vasos sanguíneos. Por otra parte, los PDGF-R se expresan en los pericitos y las células musculares lisas que contribuyen a estabilizar las paredes de los vasos sanguíneos, por lo que la transducción de señales que es inducida por el PDGF a través de la tirosin quinasa de su receptor, es importante para la supervivencia de los pericitos y las células endoteliales, por lo que la inhibición de estos factores afecta directamente la angiogénesis.

Basado en esto, muchos estudios recientes han demostrado que este fármaco presenta una actividad biológica hasta en un 60% de los casos de mastocitomas de grado histológico 2 y 3 (Berger, 2011) (Lavalle, Bertagnolli, Tavares, Ferreira, & Cassal, Mast cells and angiogenesis in canine mammary tumor, 2010) Estos datos son consistentes a los resultados obtenidos en este estudio, puesto que a pesar de la variación de datos entre los pacientes, el porcentaje total de disminución de angiogénesis frente al tratamiento disminuyó en un 55.95% en mastocitomas de bajo grado y un 65.69% en los pacientes de alto grado. Además se observó que mejora la supervivencia en la mayoría de los casos estudiados, previniendo metástasis por disminución de angiogénesis en mastocitomas de bajo grado y estadios iniciales principalmente. Estas observaciones son consistentes con otros estudios complementarios donde sugieren que la incidencia de metástasis visceral y nodular fue menor en los perros tratados con Masitinib (Uranovet, 2013). (Ribatti & Crivellato, 2012)

Estudios de pacientes que han sido tratados con inhibidores de la tirosin quinasa, han demostrado reducir o enlentecer la proliferación de células en los tumores, manteniendo por largos periodos de tiempo el tamaño del tumor y en algunos casos se ha visto disminuido. Esto puede deberse a que en estos estudios la inhibición de los VEGF-R y PDGF-R disminuyen la presión del líquido intersticial en el tumor, mejorando la captación de los antineoplásicos por las células tumorales. (Dubreuil, Letard, Ciufolini, Gros, & Humbert, 2009), (Webster, Yuzbasiyan-Gurkan, Miller, Kaneene, & Kiupel, 2007) Según estos estudios, los resultados en este trabajo son concordantes, pues si bien en los mastocitomas de

bajo grado se logró observar una disminución de un 58.41%, en los mastocitomas de alto grado se logró una disminución total del 24.04%. Sin embargo en el caso del paciente 13, según nuestros datos mostró un leve aumento del 0.24%, lo cual se pudo inferir que la proliferación se mantuvo constante sin mostrar un aumento significativo, mientras que todos los otros pacientes analizados mostraron una disminución por sobre el 30% en respuesta al tratamiento.

En cuanto a aspectos morfológicos, en este trabajo se observaron dos patrones de tinción en la inmunomarcación para receptor Kit, uno a nivel de la membrana citoplasmática y otro patrón citoplasmático que variaba de difuso a focal. Eso más bien podría reflejar cambios celulares y posiblemente una acumulación progresiva de CD117 en el citoplasma. Estos resultados también fueron observados en un estudio previo, donde al comparar estos patrones de tinción, no se encontró relación con grado histopatológico del mastocitoma. (Costa, Matos, Rema, & Lopes, 2007). Sin embargo se necesitan estudios adicionales para dilucidar la relevancia de estos patrones de expresión.

## CAPITULO 9: Conclusiones

Mediante este trabajo experimental se pudo demostrar que:

- La población celular de mastocitos neoplásicos se ve disminuida notoriamente tras el tratamiento de Masitinib durante 7 días.
- El tratamiento con Masitinib se asocia con efectos antiproliferativos sobre neoplasias de mastocitoma canino, según los cambios observados en expresión de PCNA.
- La terapia con Masitinib muestra efectos antiangiogénicos sobre los mastocitomas caninos según resultados de inmuno marcación para CD31.
- La viabilidad de células neoplásicas se ve disminuida en presencia del tratamiento de Masitinib, por inducción apoptótica, según los resultados obtenidos mediante técnica de TUNEL
- Masitinib podría ser considerada como un buen agente para la terapia dirigida de mastocitomas caninos, gracias a sus efectos .antiproliferativos pro apoptóticos y antiangiogénicos , asociados a que inhibe de forma potencial y selectiva al receptor c-kit de forma normal o mutado y que paralelamente inhibe el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), proteína Lyn y FAK.

## REFERENCIAS

- Universitat de les Illes Balears. (2013). *Grupo de Investigacion Metabolismo Energetico* .  
Obtenido de  
<http://gmein.uib.es/registro/informacion/investigadores/informacion391.htm>
- Aoki, M., Pawankar, R., Niimi, Y., & Kawana, S. (2003). Mast cells in basal cell carcinoma express VEGF, IL-8 and RANTES. *130*(3), 216.
- Berger, F. A. (2011). Mastocitoma en Perros. *Oncologiavet*.
- Bischoff, S. (2003). what is the physiological function of mast cells? Viewpoint 4. *Experimental dermatology* .
- Boyce, J. (2004). The biology of the mast cell. *Allergy Asthma Proc.* , 27-30.
- Catalino, D., & Ustáriz-García. (18 de marzo de 2011). *Mastocytosis*. Obtenido de Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.: <http://www.sld.cu/sitios/ihi>
- Costa, R. M., Matos, E., Rema, A., & Lopes, C. (2007). CD117 immunoexpression in canine mast cell tumours:. *BMC Veterinary Research*, 19.
- Dubreuil, P., Letard, S., Ciufolini, M., Gros, L., & Humbert, M. (2009). Masitinib (AB1010), a Potent and Selective Tyrosine. *Plos One*, 4(9).
- Ehrlich, P. (1878). *Beiträge zur Theorie und PRaxis der Histologischen Färbung*. Leipzig.
- Ehrlich, P. (1879). *Anat Physiol*.
- EMA. (10 de 06 de 2014). *European Medicines Agency* . Obtenido de European Medicines Agency : <http://www.ema.europa.eu/ema/>
- Enerbäck, L. (1997). The differentiation and maturation of inflammatory cells involved in the allergic response: mast cells and basophils\*. *Allergy*, 4-10.
- García, E. M. (2013). *Mapfre*. Obtenido de  
<http://www.mapfre.com/salud/es/cinformativo/mastocitosis.shtml>
- Gene Database. (07 de Noviembre de 2013). *The GeneCards Human*. Obtenido de  
<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=KIT>
- Geneser, F. (2003). *Histologia*. Copenhagen: Panamericana.
- Gurish, M., & Castells, M. (1996). Mast cells: Development, identification and physiologic roles. *Nature*.
- Gurish, M., Castells, M., & col. (2013). Mast cells: Surface receptors and signal transduction. *uptodate*.
- Hall, P. A., Levinson, D., & Woods, A. (1990). proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol*, 162.
- Heras, D. M., & Aceña, M. C. (2012). Tumores de mama en perras como modelo de cáncer.
- Huang, E., Nocka, K., & DR, B. (1990). the hematopoietic growth factor KL is encoded by the SI locus and is the ligand of the c-kit recetor, the gene product of the W locus. *Cell*.
- Im, K., & al., e. (2011). Tryptase-positive mast cells correlate with angiogenesis in canine mammary carcinoma. *J Comp Pathol*, 157-63.
- Jaén, P., & Gilabert, Y. (2014). TERAPIA FOTODINÁMICA PARA PRE-CÁNCER Y LESIONES SUPERFICIALES DE CÁNCER DE PIEL. *Efesalud*.

- Jiménez, R., Duarte, C., Bittar, M., & Quintero, A.-R. (2002). Braquiterapia intersticial de próstata / Interstitial brachytherapy of prostate. *Salus militiae*.
- Kalra, M., Rao, N., Nanda, K., & Rehman, F. (2013). The role of mast cells on angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 76-82.
- Kitamura, Y. (2003). What is the physiological function os mast cells? *Experimental Dermatology*, 886 - 910.
- Kiupel, M., Webster, J., Bailey, L., Best, S., DeLay, J., Destrisac, c., . . . Goldschmidt, M. (2011). proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mas cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Veterinary Pathology*, 147 - 155.
- Lara, A. (2013). USO DE LOS INHIBIDORES DE LA TIROSIN KINASA EN ONCOLOGIA VETERINARIA. *Oncology*.
- Lavalle, G., Bertagnolli, A., Tavares, W., Ferreira, M., & Cassal, G. (2010). Mast cells and angiogenesis in canine mammary tumor. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, 1348-1351.
- Lavalle, G., Bertagnolli, A., Tavares, W., Ferreira, M., & Cassali, G. (2010). Mast cells and angiogenesis in canine mammary tumor. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*.
- Lawrence, J., Saba, C., Jr, R. G., Lamberth, O., Vandenplas, M. L., Hurley, D. J., . . . Turek, M. (2012). Masitinib demonstrates anti-proliferative and pro-apoptotic activity in primary and metastatic feline injection-site sarcoma cells. *Veterinary and Comparative Oncology*, 143-145.
- Luque, E., Muñoz, M., Romero, L., Langhi, M., & Romero, J. (1993). marcadores moleculares para predecir el pronostico del cáncer de mama . *Revista Medicina*, 151.
- Maurer, M., & Metz, M. (2003). what is the physiological function of mast cells? *experimental Dermatology*, 886.
- Morris, J., & Dobson, J. (2002). Oncología en pequeños animales. En J. D. Joanna Morris, *Oncología en pequeños animales* (págs. 51-54). Intermedica.
- Natalia, P., Fogel, F., & Vulcano, L. (01 de 03 de 2005). *Mastocitoma cutáneo: Dos casos en una familia de perros Boxer*. Obtenido de UNIVERSIDAD DEL CENTRO PROV. BUENOS AIRES (TANDIL) - ARGENTINA: <http://veterinariosenweb.com/revista>
- National cancer institute. (12 de Enero de 2010). *Center for cancer research* . Obtenido de <https://ccrod.cancer.gov/confluence/display/CCRCOPWeb/Comparative+Oncology+Background>
- Navia, C., & Vásquez-López, J. (2011). El mastocito: una célula funcional. . *Revista facultad de ciencias de la salud - Universidad de Cauca*.
- Ordoqui, D. E. (2002). Estudio de la utilidad diagnóstica de la determinación de niveles séricos de triptasa en las reacciones adversas a medicamentos. *Universidad Complutense de Madrid*, 10.
- Ramos, L., Vicario, M., & Santos., J. (2007). Eje estrés-mastocito y regulación de la inflamación en la mucosa intestinal: desde la salud intestinal hasta el intestino irritable. *Medicina Clinica en Breve - Elsevier* .
- Ribatti, D., & Crivellato, E. (2012). Mast cells, angiogenesis, and tumour growth. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1822(1), 2-8.
- Rios, A. (2008). Mastocitoma canino y felino. *Clin. Vet. Peq. Anim.* , 135-142.

- Rodríguez, E. (2007). ETHICS OF RESEARCH WITH ANIMAL MODELS FOR HUMAN DISEASES. *Acta Bioethica*.
- Rodriguez-Tafur, J. (2006). *Degranulacion mastocitaria no mediada por IgE*. Peru.
- Schwartz, L., Irani, A., & cols., K. R. (1987). Quantitation of histamine, tryptase and chimase. *J Immunol*, 2611-2615.
- Schwartz, L., Lewis, R., & Seldin, D. (1981). Acid hydrolases and tryptase from secretory. *J Immunol*, 1290-1294.
- Simón, C. A. (2009). Mastocitoma Canino . *Argos* , 40-43.
- Takeuchi, Y., Fujino, Y., Watanabe, M., Takahashi, M., Nakagawa, T., & Takeuchi, A. (2013). validation of the prognostic value of histopathological grading or c-kit mutation in canine cutaneous mast cell tumors: A retrospective cohort study. *The veterinary Journal*, 492-498.
- Theoharides, C., & Conti, P. (2004). Mast cells: The JEKYLL and HYDE of tumor growth. *Trends in immunology*.
- Trifa, A., PATiu, M., Cucuianu, A., Dima, D., Militaru, M., Pop, I., & Popp, R. (2010). Systemic Mastocytosis Associated with the C-Kit D816v Mutation – Importance of Molecular Diagnosis and Therapeutic Implications. Case Report. *Timisoara Medical*.
- Uranovet. (11 de 10 de 2013). *Urano vet*. Obtenido de <http://www.uranovet.com/#/home>
- Vail, D. M. (2003). Manual of small animal dermatology. En D. M. Vail, *Manual of small animal dermatology* (págs. 220-229). BSAVA.
- Webster, J. D., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Miller, R., Kaneene, j. B., & Kiupel, M. (2007). Cellular Proliferation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Vet Pathol*, 44: 298.
- Webster, J., Kiupel, M., & Yuzbasiyan-Gurkan, V. (2006). Evaluation of the kinase domain of c-KIT in canine cutaneous mast. *BMC cancer*, 85.
- Weidner, N., & Austen, K. (1990). Evidence for morphologic diversity of human mast cells. *Lab Invest*, 63.
- Welle, M., Bley, C. R., Howard, J., & Rüfenacht, S. (2008). canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis clinical features, pathology and treatment. *Vet Dermatol*, 321-329.
- Zemke, D., Yamini, B., & Yuzbasiyan-Gurkan, V. (2002). Mutations in the juxtamembrane domain of c-KIT are associated with higher grade mast cells tumors in dogs. *Vet Pathol*.

**ANEXO I**  
**PROCOLOS**

### **Protocolo de Tinción Hematoxilina Eosina.**

La tinción de Hematoxilina y Eosina no es un método específico para detectar mastocitos en secciones de tejido, en parte debido a que tanto la morfología como la detección de granulaciones son variables e inespecíficas.

#### Soluciones

Hematoxilina de Harris (CI 75290)

Eosina Alcohólica (0.5%)

##### Solución Stock Eosina Y

Eosina Y (CI)	5gr
Agua destilada	200ml
Etanol 95°	800ml

Mezclar para disolver y guardar a temperatura ambiente

##### Solución de Trabajo

Solución stock Eosina Y	250ml
Etanol 80°	750ml
Ácido acético Glacial	5ml

Mezclar bien y guardar a temperatura ambiente

Alcohol acido

HCl	0.5ml
Agua destilada	aforar a 100ml

### **Protocolo**

1. Muestras en Neo-Clear® en 2 baños por 3 minutos
2. 2 baños en Alcohol de 100° por 3 minutos
3. 2 baños en Alcohol de 95° por 3 minutos
4. 1 baño en Alcohol de 80° por 3 minutos
5. 1 baño en Alcohol de 70° por 3 minutos
6. Lavado en agua destilada
7. Coloración nuclear con Hematoxilina de Harris por 4 min
8. Lavar en Agua corriente

9. Control al microscopio de Luz
10. Diferenciación en Alcohol/Ácido al 0.5% por unos segundos
11. Lavar en Agua corriente
12. Azular con Bórax en solución saturada por unos segundos
13. Lavar en Agua corriente
14. Coloración Citoplasmática en Eosina Alcohólica 0.5% por 10 segundos
15. Lavar en Agua corriente
16. Control al microscopio de Luz
17. 2 baños en Alcohol de 95° por 3 minutos
18. 2 baños en Alcohol de 100° por 3 minutos
19. Muestras en Neo-Clear® en 2 baños por 3 minutos
20. Montaje en Neo-Mount®

## **TINCIÓN METACROMÁTICA**

### **Protocolo Azul Toluidina**

Solución Stock Azul de Toluidina

Azul de Toluidina (CI 52040)	0.5%
Alcohol 70°	100ml

Cloruro de Sodio 1%

Cloruro de Sodio	0.5gr
Agua destilada	50ml

Mezclar hasta disolver. Ajustar pH a 2.0-2.5 usando ácido acético glacial o HCl

Solución de Trabajo pH a 2.0-2.5

Solución Stock Azul de Toluidina	5ml
Cloruro Sodio 1%pH 2.3	45ml

Hacer solución fresca y descartar después del uso

### **Protocolo**

1. Muestras en Neo-Clear® en 2 baños por 3 minutos
2. 2 baños en Alcohol de 100° por 3 minutos
3. 2 baños en Alcohol de 95° por 3 minutos

4. 1 baño en Alcohol de 80° por 3 minutos
5. 1 baño en Alcohol de 70° por 3 minutos
6. Lavado en agua destilada
7. Teñir en solución de Trabajo por 8-10 minutos
8. Lavado en agua corriente 3 cambios
9. 2 baños de alcohol 95° 3 minutos
10. 2 baños de alcohol 100° 3 minutos
11. 2 baños en Neo-Clear® por 3 minutos
12. Montaje en Neo-Mount®

### **TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA (CD117, CD31, PCNA)**

Diluciones Anticuerpos

CD117	1:200
CD31	1:100
PCNA	1:100

### **Protocolo IHQ**

1. Desparafinar y recuperación antigénica en PTLinkdako por 20 min a 96°C en buffer citrato pH 6.0
2. Lavado PBS
3. Bloqueo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% 10min
4. Lavado PBS
5. Bloqueo proteína (Ultra V Block) 10min
6. Incubación Ac Primario 20min
7. Lavado PBS
8. Large Volume HRP Polymer 15 min
9. Lavado PBS
10. Revelado
11. Contraste y montaje

Soluciones

- PBS 10X (0.1M PBS, pH 7.4):

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (anhydrous) ----- 11.5 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>----- 2 g  
NaCl ----- 80 g  
KCl ----- 2 g  
Agua destilada -----1000 ml  
Mezclar y almacenar a temperatura ambiente

### **TÉCNICA TUNEL**

La técnica TUNEL permite la determinación de muerte celular apoptótica a través de la detección de fragmentación de ADN presente en este proceso. Para la realización de esta técnica, se utilizó el kit de peroxidasa ApopTag® siguiendo las indicaciones dadas por el fabricante.

#### **Protocolo:**

1. Muestras en Neo-Clear® en 2 baños por 3 minutos
2. 2 baños en Alcohol de 100° por 3 minutos
3. 2 baños en Alcohol de 95° por 3 minutos
4. 1 baño en Alcohol de 80° por 3 minutos
5. 1 baño en Alcohol de 70° por 3 minutos
6. Lavado en agua destilada
7. Proteinasa K por 15 minutos a temperatura ambiente
8. 2 lavados en agua destilada por 2 minutos
9. Bloqueo peroxidasa endógena al 3% en PBS por 5 min
10. 2 lavados de PBS por 5 minutos
11. Buffer de equilibrio por 15 minutos a temperatura ambiente
12. Buffer de reacción (Digoxigenina-dNTP + enzima TdT) en cámara húmeda a 37°C por 1 hora
13. Buffer de lavado por 15 segundos en agitación
14. Buffer de lavado por 10 minutos
15. 3 lavados de PBS por 1 minuto
16. Aplicación de conjugado Anti-Digoxigenina en cámara húmeda por 30 minutos en temperatura ambiente
17. 4 lavados en PBS por 2 minutos

18. Revelado con diaminobencidina (DAB)
19. Agua destilada
20. Contraste
21. 2 baños de alcohol 95° 3 minutos
22. 2 baños de alcohol 100° 3 minutos
23. 2 baños en Neo-Clear® por 3 minutos
24. Montaje en Neo-Mount®

**ANEXO II**  
**DATOS DE LOS PACIENTES**

PACIENTE	ESPECIE/SEXO	EDAD	MUESTRA	ANTECEDENTES CLINICOS	CONCLUSIONES	OBSERVACIONES
1	CAN/MESTIZO /HEMBRA	10 AÑOS	Se recepciona muestra de tejido para biopsia de 4,8x4,8x5,1cm, enviado en formalina.	Masa en codo. Citología anterior (52222) con Dx "Células de mastocitoma. Requiere biopsia para confirmación histopatológica, estimación de grado de malignidad, estudio de invasividad y de bordes."	Mastocitoma de bajo grado (mastocitoma bien diferenciado grado I a II, según clasificación de Kupel et al, 2010).	Se estudia muestra de tejido cutáneo, con foco neoplásico en dermis profunda, caracterizado por: TIPO CELULAR PREDOMINANTE: Mastocitos con atipia celular leve; DISPOSICION HISTOLOGICA: Células de disposición aislada, distribuidas en forma difusa en dermis con abundantes fibras colágenas. Las células neoplásicas presentan moderada a abundante presencia de gránulos citoplasmáticos. DIFERENCIACION: Alta. INDICE MITOTICO: No se aprecian figuras mitóticas. VASCULARIZACION: Abundante, con intensa hiperemia. NECROSIS: No. INFILTRACION LEUCOCITARIA: Eosinofilia difusa, entre células neoplásicas; INVASION Y BORDES: Neoprecimiento no encapsulado, mal definido, con bordes estrechos pero libres.
2	CAN/BOXER /MACHO		Se recepciona una muestra de tejido para biopsia de 9,8x3,8x3 cm, enviado en formalina.	Piel zona femoral. Lesión única, bordes delimitados, curso crónico.	Mastocitoma de bajo grado (mastocitoma bien diferenciado grado I a II, según clasificación de Kupel et al, 2010).	Se estudia fragmento de tejido cutáneo que presenta proceso neoplásico, en dermis profunda, caracterizado por: TIPO CELULAR PREDOMINANTE: Mastocitos con atipia celular leve; DISPOSICION HISTOLOGICA: Células sin uniones, que infiltran en forma difusa, a dermis desplazando fibras colágenas. Las células neoplásicas presentan gran cantidad de gránulos citoplasmáticos, que cubren núcleos. DIFERENCIACION: moderada. INDICE MITOTICO: No se aprecian figuras mitóticas. VASCULARIZACION: Abundante, con intensa hiperemia; NECROSIS: Ausente; INFILTRACION LEUCOCITARIA: Eosinofilia difusa, entre células neoplásicas y perivasculares; INVASION Y BORDES: Invasión a tejido conectivo en profundidad, con bordes internos estrechos, pero aparentemente libres.
3	CANINO/HEMBRA	10 AÑOS	Se recepcionan dos muestras de tejido de 3x0x3 y 3x1,5x0,5cm, enviados en formalina.	Belfo superior izquierdo. Lesión proliferativa, única, esférica, delimitada, de 3x3x3cm, crónica, posiblemente traumática, aspecto maligno.	Mastocitoma de bajo grado (mastocitoma bien diferenciado grado I a II, según clasificación de Kupel et al, 2010).	Se estudia muestra de tejido cutáneo ulcerado, con foco neoplásico en dermis profunda, caracterizado por: TIPO CELULAR PREDOMINANTE: Mastocitos con atipia celular leve; DISPOSICION HISTOLOGICA: Células de disposición aislada, distribuidas en forma difusa en dermis con abundantes fibras colágenas. Las células neoplásicas presentan moderada a abundante presencia de gránulos citoplasmáticos. DIFERENCIACION: Alta. INDICE MITOTICO: No se aprecian figuras mitóticas. VASCULARIZACION: Abundante, con intensa hiperemia; NECROSIS: Asociada a ulceración; INFLAMACION LEUCOCITARIA: Neutrofilia asociada a necrosis. Eosinofilia difusa, entre células neoplásicas; INVASION: Neoprecimiento no encapsulado, mal definido, pero con bordes libres.
4	CAN/MESTIZO /MACHO	6 AÑOS	Se recepciona muestra de tejido para biopsia de 4,7x2,8x2cm, enviada en formalina. Macroscopicamente se observa úlcera.	Neoplasia cutánea en región pre escapular izquierda, curso aprox 6 meses, sangrante, ulcerada, sin tratamiento, extracción completa.	Mastocitoma de bajo grado (mastocitoma bien diferenciado grado I a II, según clasificación de Kupel et al, 2010).	Se estudia muestra de tejido cutáneo ulcerado, con foco neoplásico en dermis profunda, caracterizado por: TIPO CELULAR PREDOMINANTE: Mastocitos con atipia celular leve; DISPOSICION HISTOLOGICA: Células de disposición aislada, distribuidas en forma difusa en dermis con abundantes fibras colágenas. Las células neoplásicas presentan moderada a abundante presencia de gránulos citoplasmáticos. DIFERENCIACION: Alta. INDICE MITOTICO: No se aprecian figuras mitóticas. VASCULARIZACION: Abundante, con intensa hiperemia; NECROSIS: Asociada a ulceración; INFLAMACION LEUCOCITARIA: Neutrofilia asociada a necrosis y alrededor de folículos pilosos. Eosinofilia difusa, entre células neoplásicas; INVASION: Neoprecimiento no encapsulado, mal definido, con bordes estrechos pero aparentemente libres.

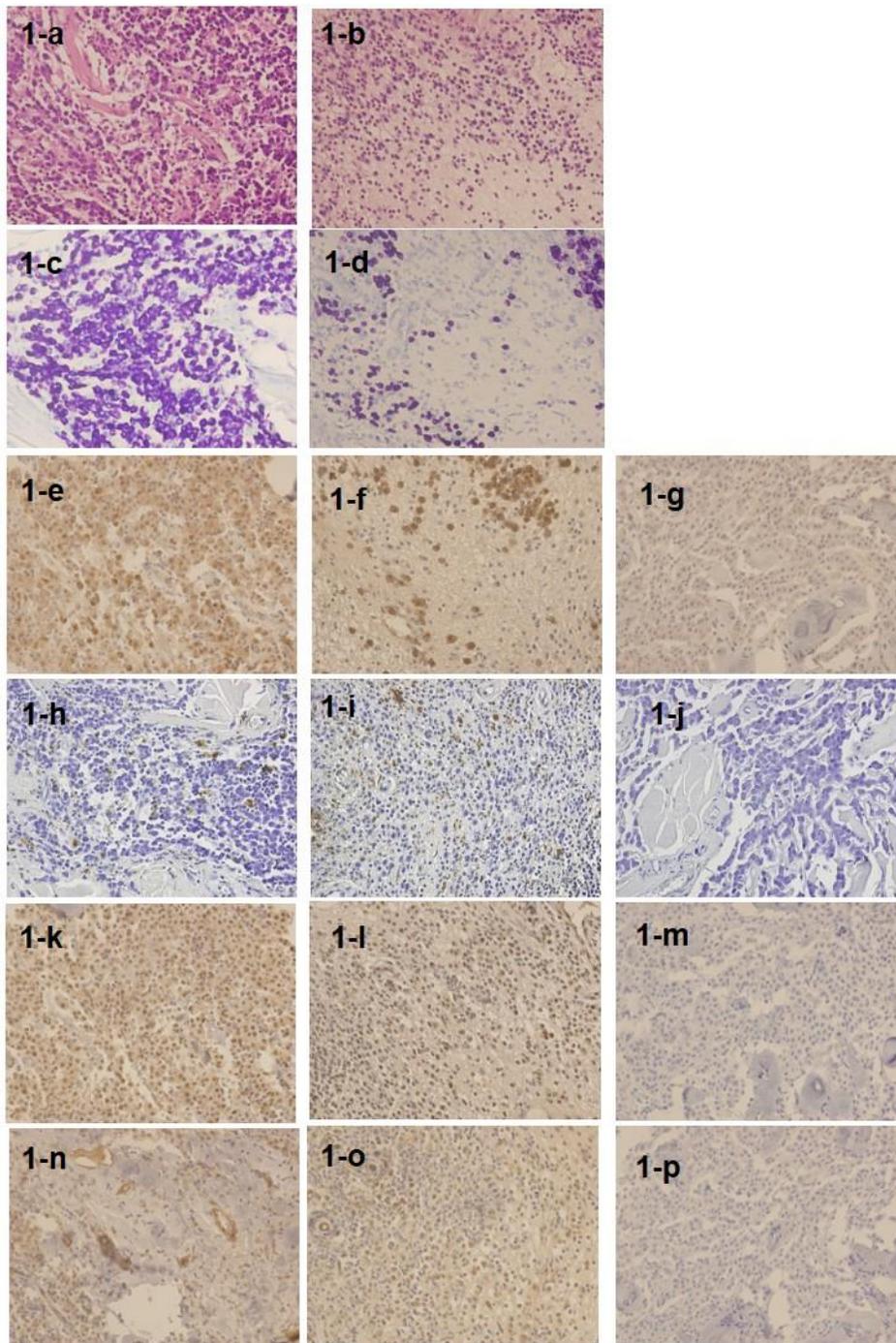
5	CAN/BORDER /HEMBRA	6 AÑOS	Se recepciona muestra de tejido para biopsia de linfocitos de 3x2,8x2cm, enviados en empaques en formalina.	Biopsias de piel de dorso lumbar zona carpel MAD, aspecto benigno.	Mastocitoma de bajo grado (mastocitoma bien diferenciado grado I a II, según clasificación de Kiupel et al., 2000).	Se estudia muestra de tejido cutáneo con foco neoplásico en dermis profunda, caracterizado por: TIPO CELULAR PREDOMINANTE: Mastocitos con atipia celular leve; DISPOSICION HISTOLOGICA: Células de disposición aislada, distribuidas en forma difusa en dermis con abundantes fibras colágenas. Las células neoplásicas presentan moderada a abundante presencia de gránulos citoplasmáticos; DIFERENCIACION: Alta; INDICE MITOTICO: No se aprecian figuras mitóticas; VASCULARIZACION: Abundante, con intensa hiperemia; NECROSIS: No; INFLAMACION LEUCOCITARIA: Eosinofilia difusa, entre células neoplásicas; INVASION: Neocrecimiento no encapsulado, mal definido, con bordes internos estrechos pero libres.
6	CANINO/HEMBRA A	4 AÑOS	Se recepciona muestra de tejido de 7x5,6cm, enviada en formalina.	Blándula mamaria torácica. Lesión proliferativa, única, esférica, delimitada, de 4x4,2cm, agudo, estudio de bordes.	Mastocitoma de bajo grado (mastocitoma bien diferenciado grado I a II, según clasificación de Kiupel et al., 2000).	Se estudia muestra de tejido cutáneo ulcerado, que presenta amplio proceso neoplásico, en dermis superficial y profunda, caracterizado por: TIPO CELULAR PREDOMINANTE: Mastocitos con atipia celular leve a moderada; DISPOSICION HISTOLOGICA: células infiltran en forma difusa a dermis superficial y profunda, entre fibras colágenas. Las células neoplásicas, que presentan moderada a abundante cantidad de gránulos citoplasmáticos; DIFERENCIACION: Moderada; INDICE MITOTICO: Promedio de una figura mitótica cada 3 campos de 400x; NECROSIS: Superficial, asociada a ulceración; INFILTRACION LEUCOCITARIA: Neutrofílica, asociada a ulceración e infiltración eosinofílica focal diseminada intratumoral; INVASION: Neocrecimiento no encapsulado, mal definido, con invasión hacia dermis profunda con bordes internos de la muestra parcialmente comprometidos. No se aprecia tejido mamario asociado.
7	CANINO/MALCHO	9 AÑOS	Se recepciona biopsia, correspondiente a una muestra de tejido de 6x4,4cm, enviada en formalina. Se archiva en alcohol.	Neoplasia subcutánea a nivel inguinal. Lesión múltiple (7), ovoide, no definido, crónico de 5cm. Rápido crecimiento.	Mastocitoma de alto grado (mastocitoma poco diferenciado grado II a III, según clasificación de Kiupel et al., 2000).	Se estudia muestra correspondiente a fragmento de tejido neoplásico, caracterizado por: TIPO CELULAR PREDOMINANTE: Mastocitos con atipia celular moderada a intensa; DISPOSICION HISTOLOGICA: Sabanas o masas de células neoplásicas redondas, que presentan escasa y ocasional presencia de gránulos citoplasmáticos; DIFERENCIACION: Baja; INDICE MITOTICO: Se aprecia promedio de 12 figuras mitóticas en 10 campos de 400x; VASCULARIZACION: Abundante, con focos de intromemorragia; NECROSIS: Focal aislada, asociada a intromemorragia; INFILTRACION LEUCOCITARIA: Infiltración eosinofílica y linfocitaria focal diseminada; INVASION Y BORDES: No apreciables, toda la muestra corresponde a tejido neoplásico, no se aprecia relación con tejido periférico normal.
8	CAN/BORDER /HEMBRA	8 AÑOS	Se recepcionan cuatro muestras de tejido para biopsia de 3x2x2 enviados en formalina.	Piel zona craneal y oreja comprometiendo pabellón auricular izquierdo. Proliferativa, múltiple y bordes no definidos.	Mastocitoma de bajo grado (mastocitoma bien diferenciado grado I a II, según clasificación de Kiupel et al., 2000).	Se estudia fragmento de tejido cutáneo, que presenta proceso neoplásico, en dermis superficial y profunda, caracterizado por: TIPO CELULAR PREDOMINANTE: Mastocitos con atipia celular leve; DISPOSICION HISTOLOGICA: Células sin uniones, que infiltran en forma difusa, a dermis desplazando fibras colágenas. Las células neoplásicas presentan gran cantidad de gránulos citoplasmáticos, que cubren núcleos; DIFERENCIACION: alta; INDICE MITOTICO: Promedio de 1 mitosis por 5 campos de 400x; VASCULARIZACION: Abundante, con intensa hiperemia; NECROSIS: Amplia; INFILTRACION LEUCOCITARIA: Eosinofílica difusa, entre células neoplásicas y perivasculares; INVASION Y BORDES: Invasión a tejido conectivo en profundidad, con bordes internos parcialmente comprometidos.

9	CAN/PITBULL /MACHO	6 AÑOS	Se recepciona una muestra de tejido para biopsia de 4x3x2cm, enviada en formalina.	Presenta lesión neoplásica en mazo izquierdo, proliferativa, múltiple, bordes no definidos de curso crónico.	Mastocitoma de alto grado (mastocitoma poco diferenciado grado II a III, según clasificación de Kluwe et al, 2000).	Se estudia muestra de tejido cutáneo ulcerado, con proceso neoplásico en dermis profunda y subcutáneo, caracterizado por: TIPO CELULAR PREDOMINANTE: Mastocitos con atipia celular moderada a intensa; DISPOSICION HISTOLOGICA: Focos aislados en dermis superficial con abundantes fibras colágenas, delimitado pequeñas masas de células neoplásicas, que presentan escasa y ocasional presencia de gránulos citoplasmáticos. DIFERENCIACION: Baja. INDICE MITOTICO: Se aprecia promedio de 1 figuras mitóticas por 3 campos de 400x; VASCULARIZACION: Abundante, con focos de microhemorragia; NECROSIS: focal diseminada intensa asociada a zonas de hemorragia y superficial asociada a ulceración. INFILTRACION LEUCOCITARIA: Acumulación de PMN neutrófilos en zonas necróticas. Infiltración eosinofílica difusa. Infiltración linfocitaria focal diseminada; INVASION: Neocrecimiento, mal definido, con bordes de la muestra comprometidos en profundidad.
10	CAN/BULLDOG /MACHO	6 AÑOS	Se recepciona muestra de tejido para biopsia de 6x4x6,6cm enviada en formalina.	Neoplasia escrotal. Lesión no proliferativa, única, bordes delimitados, curso crónico.	Mastocitoma de bajo grado (mastocitoma bien diferenciado grado I a II, según clasificación de Kluwe et al, 2000).	Se estudia fragmento de tejido cutáneo que presenta proceso neoplásico, en dermis profunda, caracterizado por: TIPO CELULAR PREDOMINANTE: Mastocitos con atipia celular leve; DISPOSICION HISTOLOGICA: Células sin uniones, que infiltran en forma difusa, a dermis desplazando fibras colágenas. Las células neoplásicas presentan gran cantidad de gránulos citoplasmáticos, que cubren núcleos. DIFERENCIACION: moderada. INDICE MITOTICO: No se aprecian figuras mitóticas. VASCULARIZACION: Abundante, con intensa hiperemia; NECROSIS:Amplia; INFILTRACION LEUCOCITARIA: Eosinofílica difusa, entre células neoplásicas y perivasculares; INVASION y BORDES: Invasión a tejido conectivo en profundidad, con bordes comprometidos.
11	CAN/CHIHUAHU A/MACHO	7 AÑOS	Se recepcionan dos muestras para biopsia de 2,2x2 y 3,2x2 cm, enviadas en formalina.	Neoplasia a nivel cutáneo, ulcerada, móvil, de curso crónico. Extráda de subcutáneo, posible linfomado de zona anilar.	Mastocitoma de bajo grado (mastocitoma bien diferenciado grado I a II, según clasificación de Kluwe et al, 2000).	Se estudia fragmento de tejido cutáneo que presenta proceso neoplásico, en dermis profunda, caracterizado por: TIPO CELULAR PREDOMINANTE: Mastocitos con atipia celular leve; DISPOSICION HISTOLOGICA: Células sin uniones, que infiltran en forma difusa, a dermis desplazando fibras colágenas. Las células neoplásicas presentan gran cantidad de gránulos citoplasmáticos, que cubren núcleos. DIFERENCIACION: moderada. INDICE MITOTICO: Promedio de una figura mitótica por 10 campos de 400x; VASCULARIZACION: Abundante, con intensa hiperemia; NECROSIS:Amplia; INFILTRACION LEUCOCITARIA: Eosinofílica difusa, entre células neoplásicas y perivasculares; INVASION y BORDES: Invasión a tejido conectivo en profundidad, con bordes comprometidos.
12	CAN/LABRADOR /MACHO	8 AÑOS	Se recepcionan dos muestras de tejido para biopsia de 5,5x5,5,3cm apro, enviadas en suero. Se retarda su procesamiento para una mejor fijación.	Lesión en piel a nivel de tetilla, ulcerada, secreción purulenta, mal olor. Proliferativa, irregular y bordes delimitados.	Mastocitoma de alto grado (mastocitoma poco diferenciado grado II a III, según clasificación de Kluwe et al, 2000).	Se estudia muestra de tejido cutáneo ulcerado, con proceso neoplásico, en dermis profunda, caracterizado por: TIPO CELULAR PREDOMINANTE: Mastocitos con atipia celular moderada a intensa; DISPOSICION HISTOLOGICA: Focos aislados en dermis superficial con abundantes fibras colágenas, delimitado pequeñas masas de células neoplásicas, que presentan escasa y ocasional presencia de gránulos citoplasmáticos. DIFERENCIACION: Baja. INDICE MITOTICO: Se aprecia promedio de 3 figuras mitóticas por campo de 400x; VASCULARIZACION: Abundante, con focos de microhemorragia; NECROSIS: Asociada a ulceración y zonas de hemorragia. INFILTRACION LEUCOCITARIA: Acumulación de PMN neutrófilos sobre zona ulcerada. Eosinofílica difusa. Intensa infiltración linfocitaria, con formación de estructuras o acúmulos nodulares; INVASION: Neocrecimiento no encapsulado, mal definido, con bordes internos comprometidos

13	CAN/BODIER /MACHO	7 AÑOS	Se resecó para muestra de tejido para biopsia de 4x2,2 cm, enviado en formalina.	Piel y subcutáneo cara caudal muslo izquierdo. Lesión única, crónica.	Mastocitoma de alto grado (mastocitoma poco diferenciado grado II a III, según clasificación de Kuipel et al. 2000).	Se estudia muestra de tejido cutáneo ulcerado, con proceso neoplásico, en dermis profunda, caracterizado por: TIPO CELULAR PREDOMINANTE: Mastocitos con atipia celular moderada a intensa; DISPOSICION HISTOLOGICA: Focos aislados en dermis superficial con abundantes fibras colágenas, delimitando pequeñas masas de células neoplásicas, que presentan escasa y ocasional presencia de gránulos citoplasmáticos. DIFERENCIACION: Baja. INDECE MITOTICO: Se aprecia promedio de 5 figuras mitóticas por campo de 400x; VASCULARIZACION: Abundante, con focos de microhemorragia; NECROSIS: Focal disminuida intensa asociada a ulceración y zonas de hemorragia. INFILTRACION LEUCODITARIA: Acumulación de PMN-neutrófilos sobre zona ulcerada. Eosinofilia: Intensa infiltración linfocitaria, con formación de estructuras o acúmulos nodulares; INVASION: Neocrecimiento, mal definido, con bordes de la muestra comprometidos.
14	CAN/ BODDHOIND /MACHO	2 AÑOS	Masa ulcerada de 5x3,5x2,5 ulcerada de 2,5x2,5cm, tejido enviado presente piel normal rodeando a úlcera.	Piel a nivel del esternon. Lesión única, esférica, delimitada, de 3,0x3,0cm, días de curso, aspecto maligno.	Mastocitoma de alto grado (mastocitoma poco diferenciado grado II a III, según clasificación de Kuipel et al. 2000).	Se estudia muestra de tejido cutáneo con epidermis ulcerada, que presenta proceso neoplásico en dermis profunda, caracterizado por: TIPO CELULAR PREDOMINANTE: Mastocitos con atipia celular moderada a intensa; DISPOSICION HISTOLOGICA: Focos aislados en dermis superficial con abundantes fibras colágenas, delimitando pequeñas masas de células neoplásicas, que presentan escasa cantidad de gránulos citoplasmáticos. DIFERENCIACION: Baja. INDECE MITOTICO: Se aprecia promedio de 1 figura mitótica por cada 2 campos de 400x; VASCULARIZACION: Abundante, con intensa hiperemia y amplias zonas de hemorragia; NECROSIS: Focal disminuida; INFLAMACION LEUCODITARIA: Eosinofilia y linfocitaria difusa; INVASION: Neocrecimiento no encapsulado, mal definido, con bordes quirúrgicos internos estrechos pero aparentemente libres.
15	CAN/BODIER /HEMBRA	5 AÑOS	Se resecó para muestra de tejido para biopsia de 4x2,5x2,8cm, enviado en formalina.	Piel muslo derecho. Lesión no proliferativa, única, esférica, delimitada, de 3,0x2cm, agudo.	Mastocitoma de alto grado (mastocitoma poco diferenciado grado II a III, según clasificación de Kuipel et al. 2000).	Se estudia muestra de tejido cutáneo ulcerado, que presenta proceso neoplásico en dermis profunda, caracterizado por: TIPO CELULAR PREDOMINANTE: Mastocitos con atipia celular moderada a intensa; DISPOSICION HISTOLOGICA: Focos aislados en dermis superficial con abundantes fibras colágenas, delimitando pequeñas masas de células neoplásicas, que presentan escasa y ocasional presencia de gránulos citoplasmáticos. DIFERENCIACION: Baja. INDECE MITOTICO: Se aprecia promedio de 3 figuras mitóticas por campo de 400x; VASCULARIZACION: Abundante, con intensa hiperemia y amplias zonas de hemorragia; NECROSIS: Focal disminuida; INFLAMACION LEUCODITARIA: Eosinofilia y linfocitaria difusa; INVASION: Neocrecimiento no encapsulado, mal definido, con invasión a dermis profunda, pero con bordes internos libres.

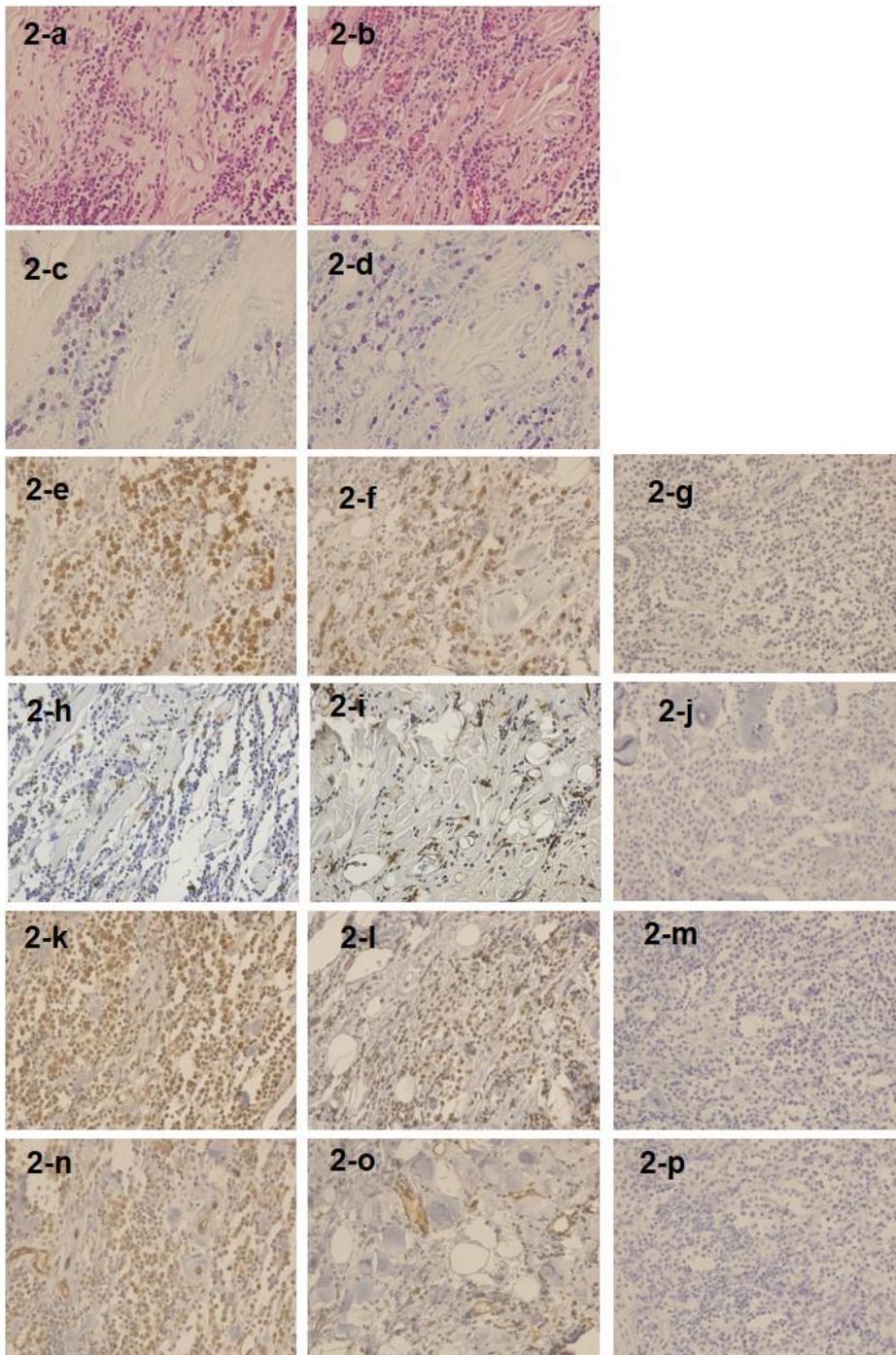
**ANEXO III**  
**RESULTADOS DE MICROFOTOGRAFIAS**

**PACIENTE 1.**



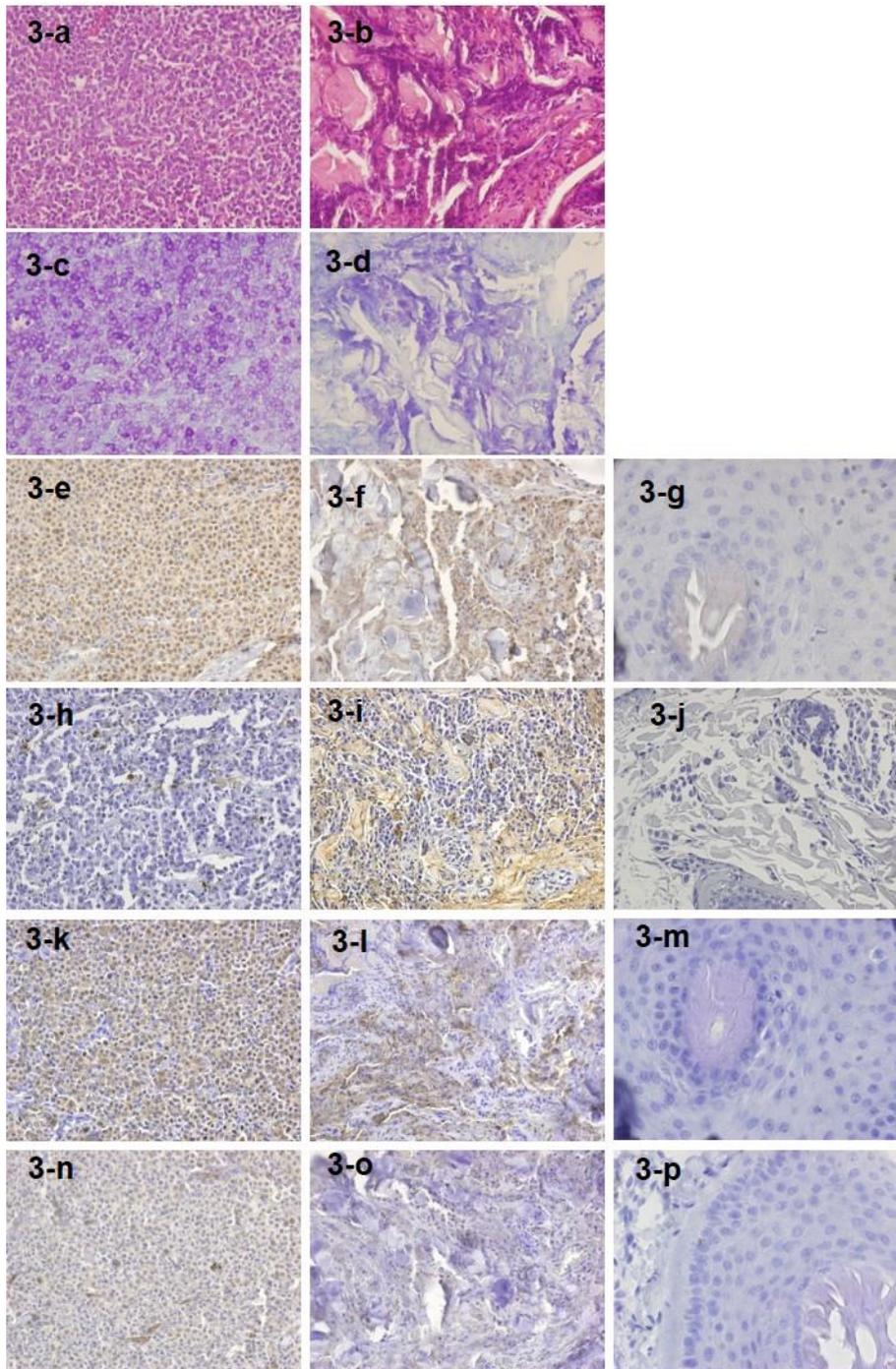
*Microfotografías obtenidas por TMA, 200X, Numero indica paciente 1. a, c, e, h, k, n: Muestras de Pre tratamiento. b, d, f, i, l, o: Muestras de Post tratamiento. g,j,m,p: Controles negativos de inmunotinciones. A y b: Técnica de hematoxilina eosina. c y d: Azul de Toluidina. e- g: CD117, h- j: TUNEL, k- m: PCNA, n-p: CD31.*

**PACIENTE 2:**



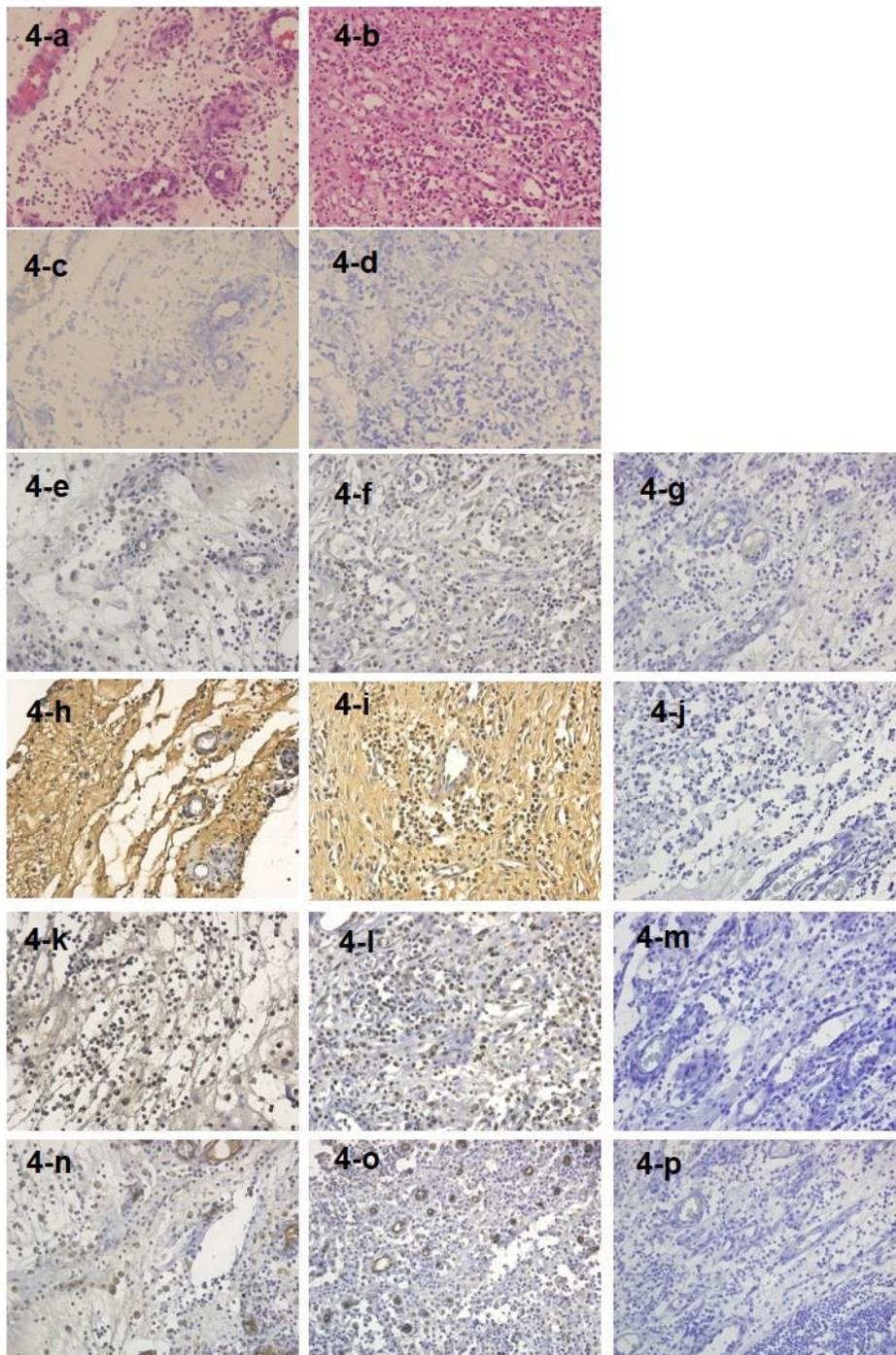
*Microfotografías obtenidas por TMA, 200X, Numero indica paciente 2. a, c, e, h, k, n: Muestras de Pre tratamiento. b, d, f, i, l, o: Muestras de Post tratamiento. g,j,m,p: Controles negativos de inmunotinciones. A y b: Técnica de hematoxilina eosina. c y d: Azul de Toluidina. e- g: CD117, h- j: TUNEL, k- m: PCNA, n-p: CD31.*

**PACIENTE 3:**



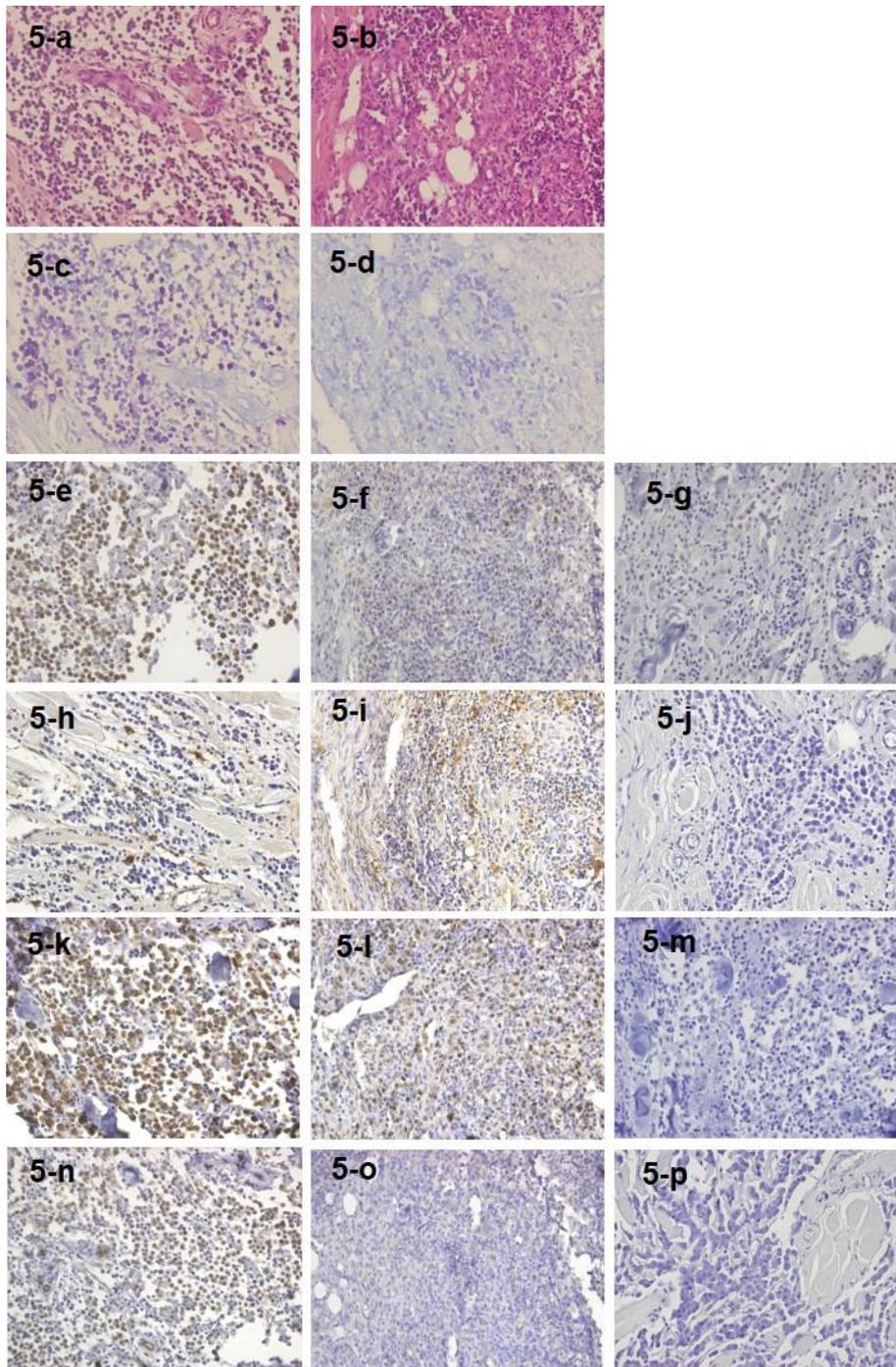
*Microfotografías obtenidas por TMA, 200X, Numero indica paciente 3. a, c, e, h, k, n: Muestras de Pre tratamiento. b, d, f, i, l, o: Muestras de Post tratamiento. g,j,m,p: Controles negativos de inmunotinciones. A y b: Técnica de hematoxilina eosina. c y d: Azul de Toluidina. e- g: CD117, h- j: TUNEL, k- m: PCNA, n-p: CD31.*

**PACIENTE 4:**



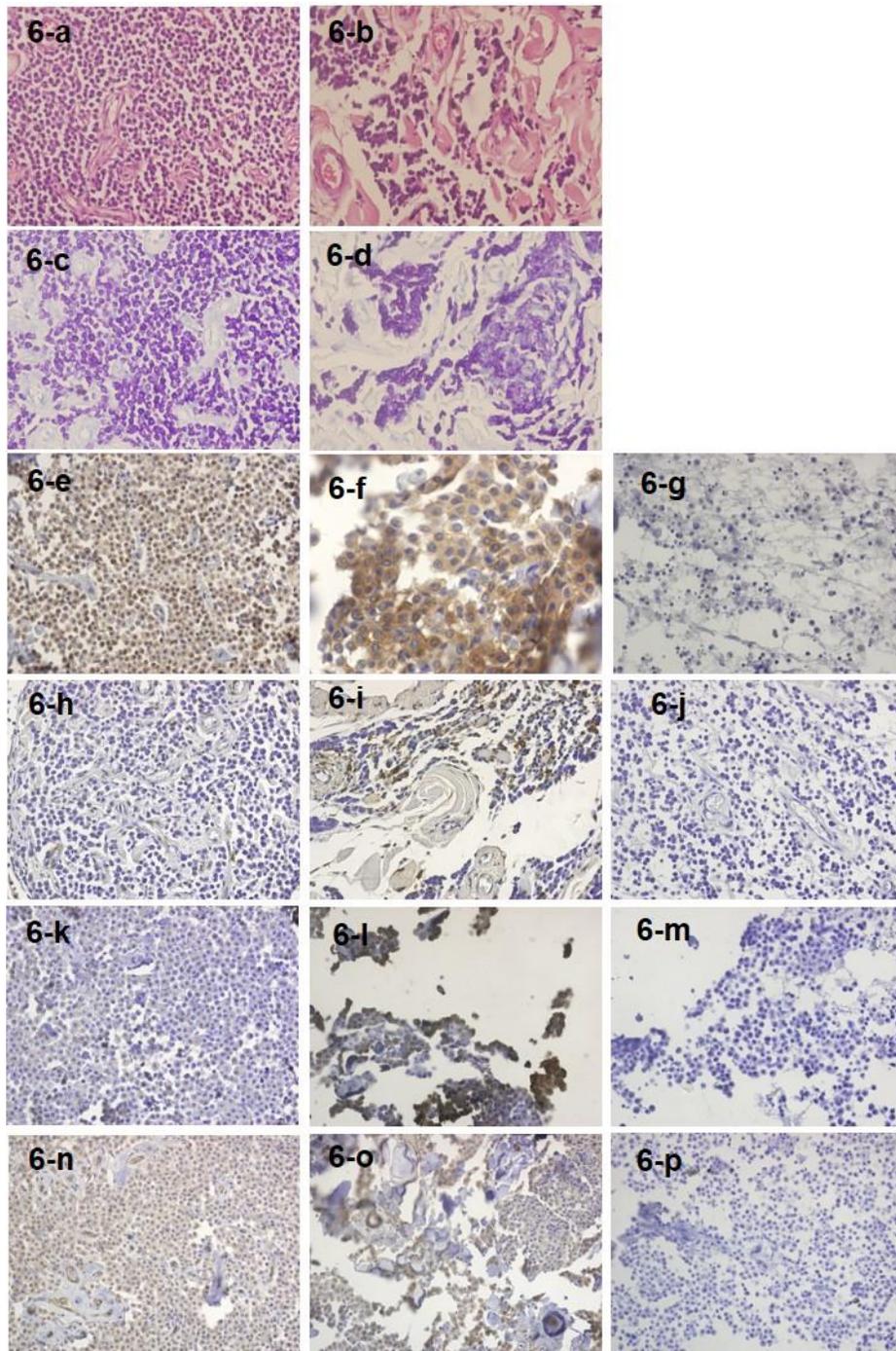
*Microfotografías obtenidas por TMA, 200X, Numero indica paciente 4. a, c, e, h, k, n: Muestras de Pre tratamiento. b, d, f, i, l, o: Muestras de Post tratamiento. g,j,m,p: Controles negativos de inmunotinciones. A y b: Técnica de hematoxilina eosina. c y d: Azul de Toluidina. e- g: CD117, h- j: TUNEL, k- m: PCNA, n-p: CD31.*

**PACIENTE 5:**



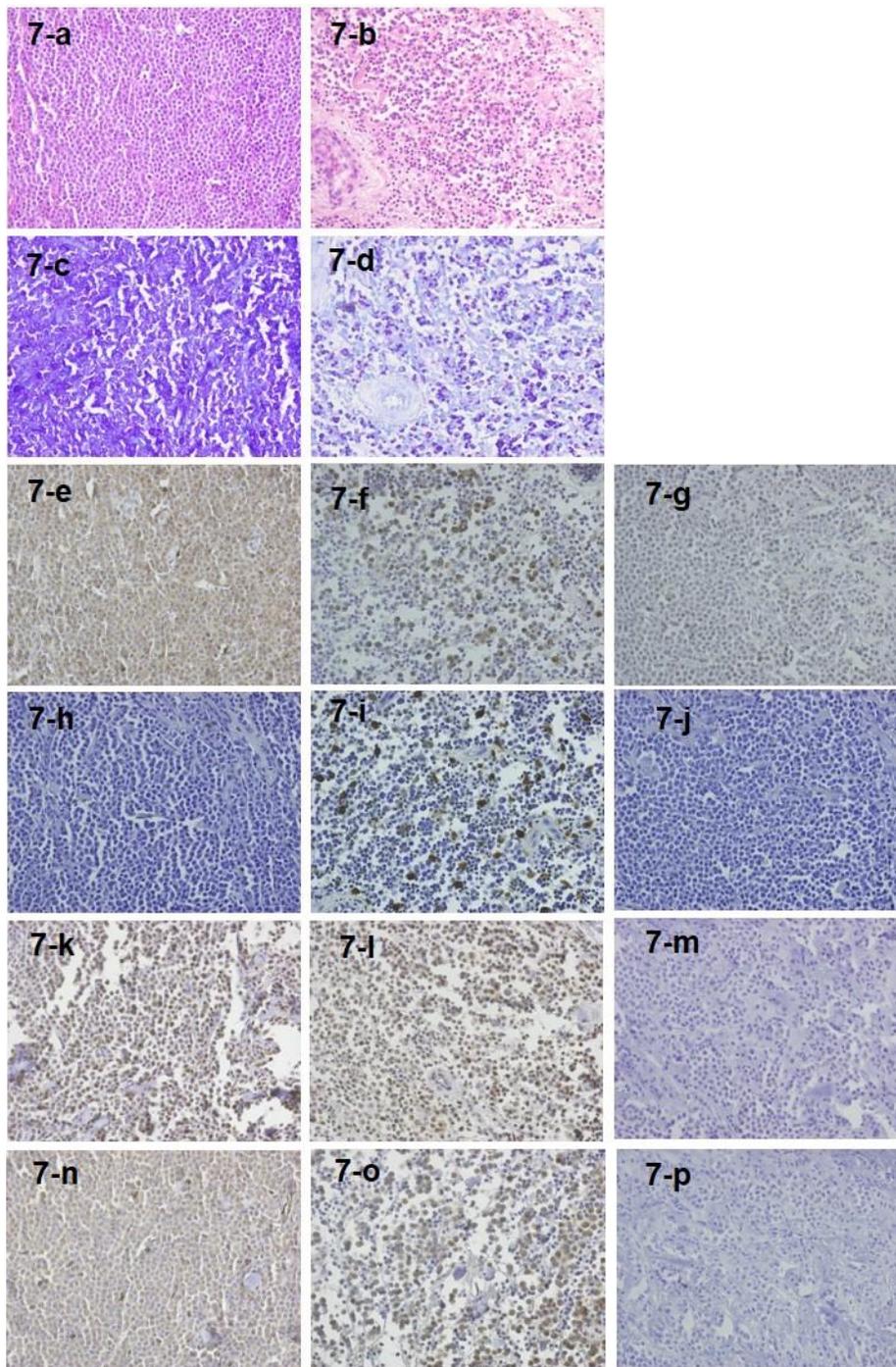
*Microfotografías obtenidas por TMA, 200X, Numero indica paciente 5. a, c, e, h, k, n: Muestras de Pre tratamiento. b, d, f, i, l, o: Muestras de Post tratamiento. g,j,m,p: Controles negativos de inmunotinciones. A y b: Técnica de hematoxilina eosina. c y d: Azul de Toluidina. e- g: CD117, h- j: TUNEL, k- m: PCNA, n-p: CD31.*

**PACIENTE 6:**



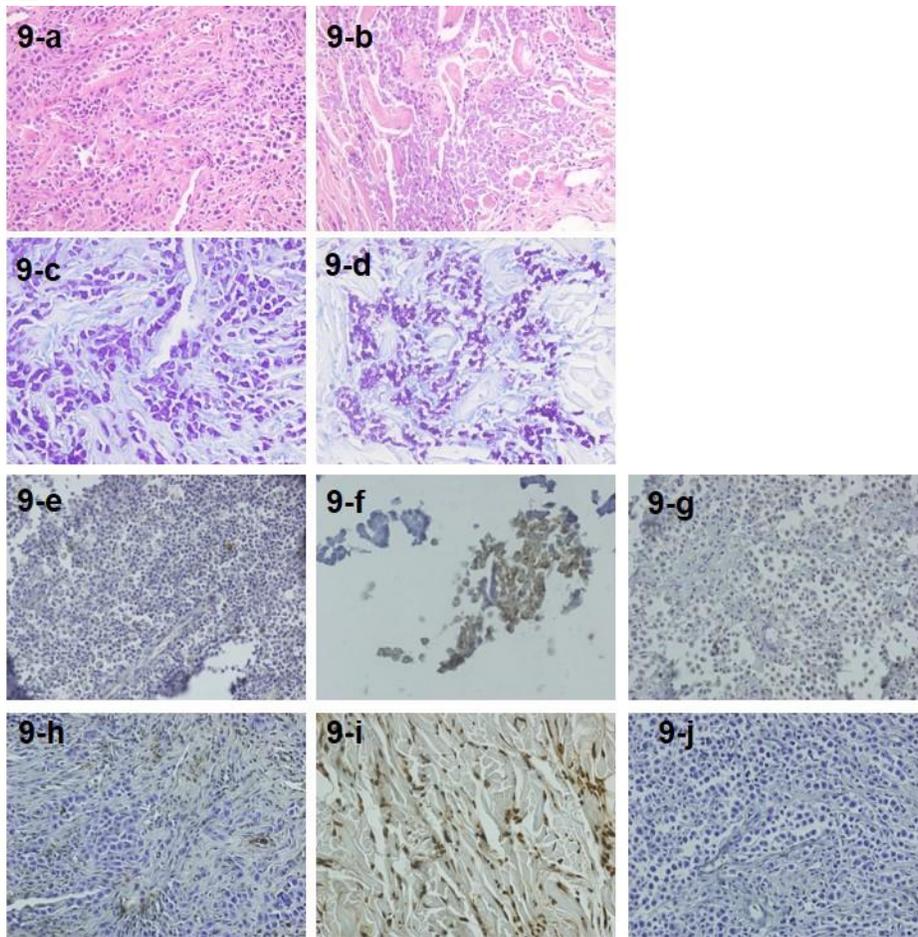
*Microfotografías obtenidas por TMA, 200X, Numero indica paciente 6. a, c, e, h, k, n: Muestras de Pre tratamiento. b, d, f, i, l, o: Muestras de Post tratamiento. g,j,m,p: Controles negativos de inmunotinciones. A y b: Técnica de hematoxilina eosina. c y d: Azul de Toluidina. e- g: CD117, h- j: TUNEL, k- m: PCNA, n-p: CD31.*

**PACIENTE 7:**



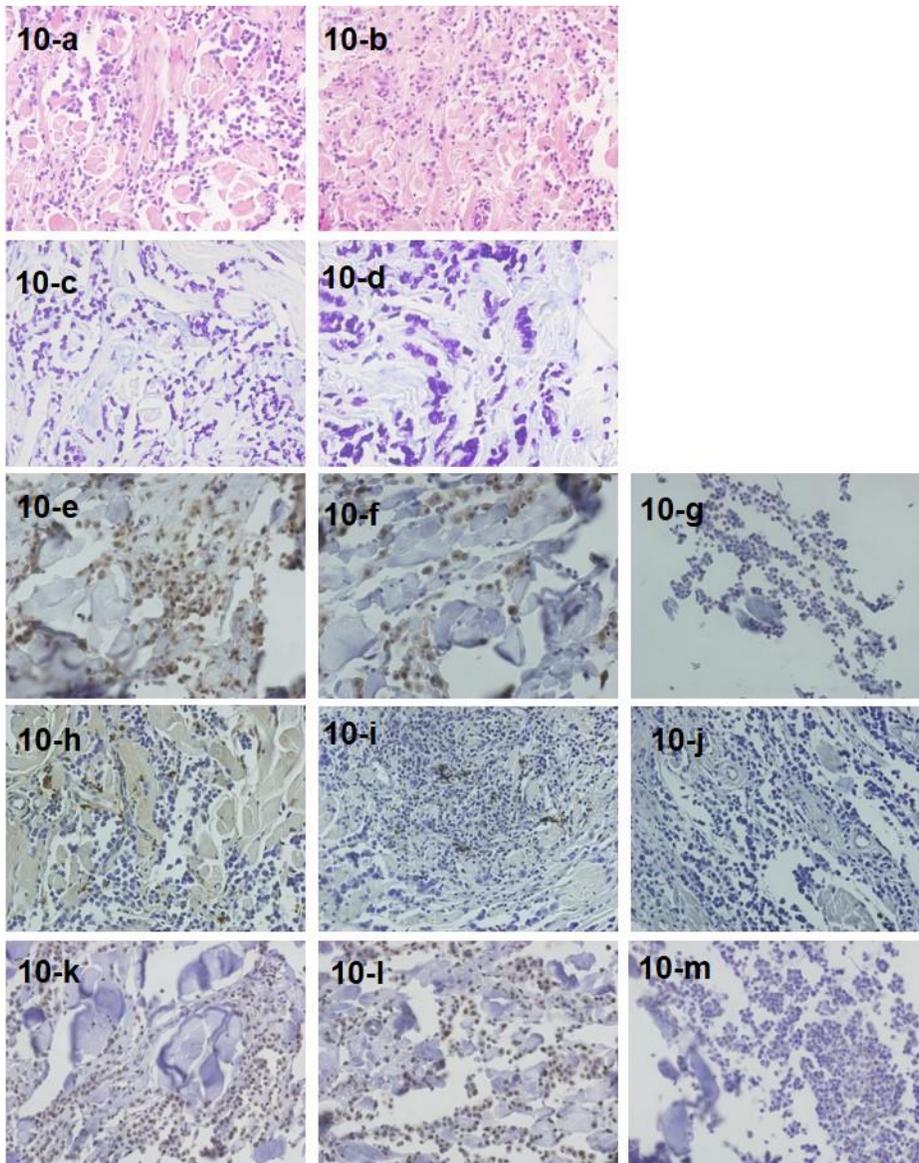
*Microfotografías obtenidas por TMA, 200X, Numero indica paciente 7. a, c, e, h, k, n: Muestras de Pre tratamiento. b, d, f, i, l, o: Muestras de Post tratamiento. g,j,m,p: Controles negativos de inmunotinciones. A y b: Técnica de hematoxilina eosina. c y d: Azul de Toluidina. e- g: CD117, h- j: TUNEL, k- m: PCNA, n-p: CD31.*

## PACIENTE 9



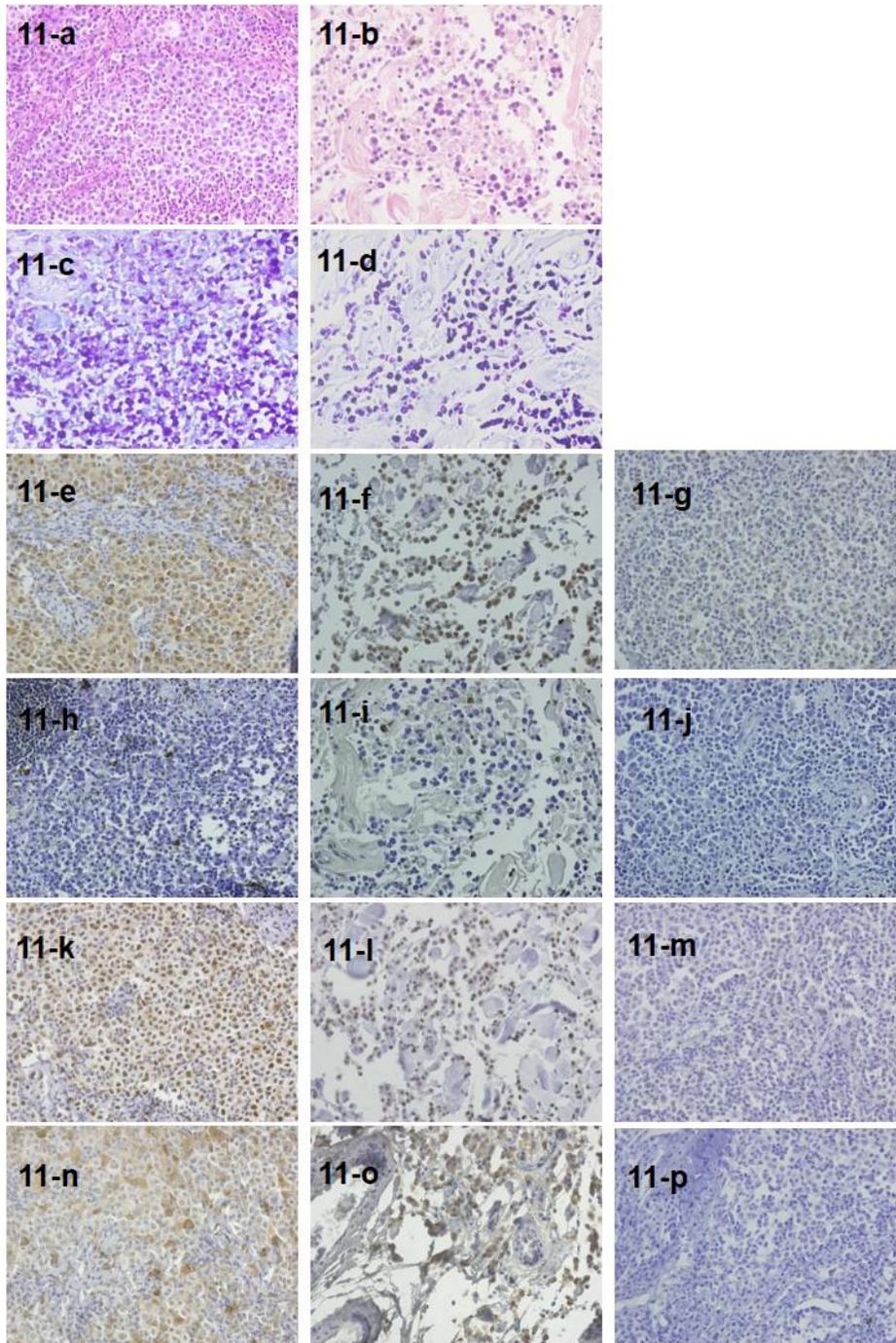
*Microfotografías obtenidas por TMA, 200X, Numero indica paciente 9. a, c, e, h, k, n: Muestras de Pre tratamiento. b, d, f, i, l, o: Muestras de Post tratamiento. g,j,m,p: Controles negativos de inmunotinciones. A y b: Técnica de hematoxilina eosina. c y d: Azul de Toluidina. e- g: CD117, h- j: TUNEL*

**PACIENTE 10:**



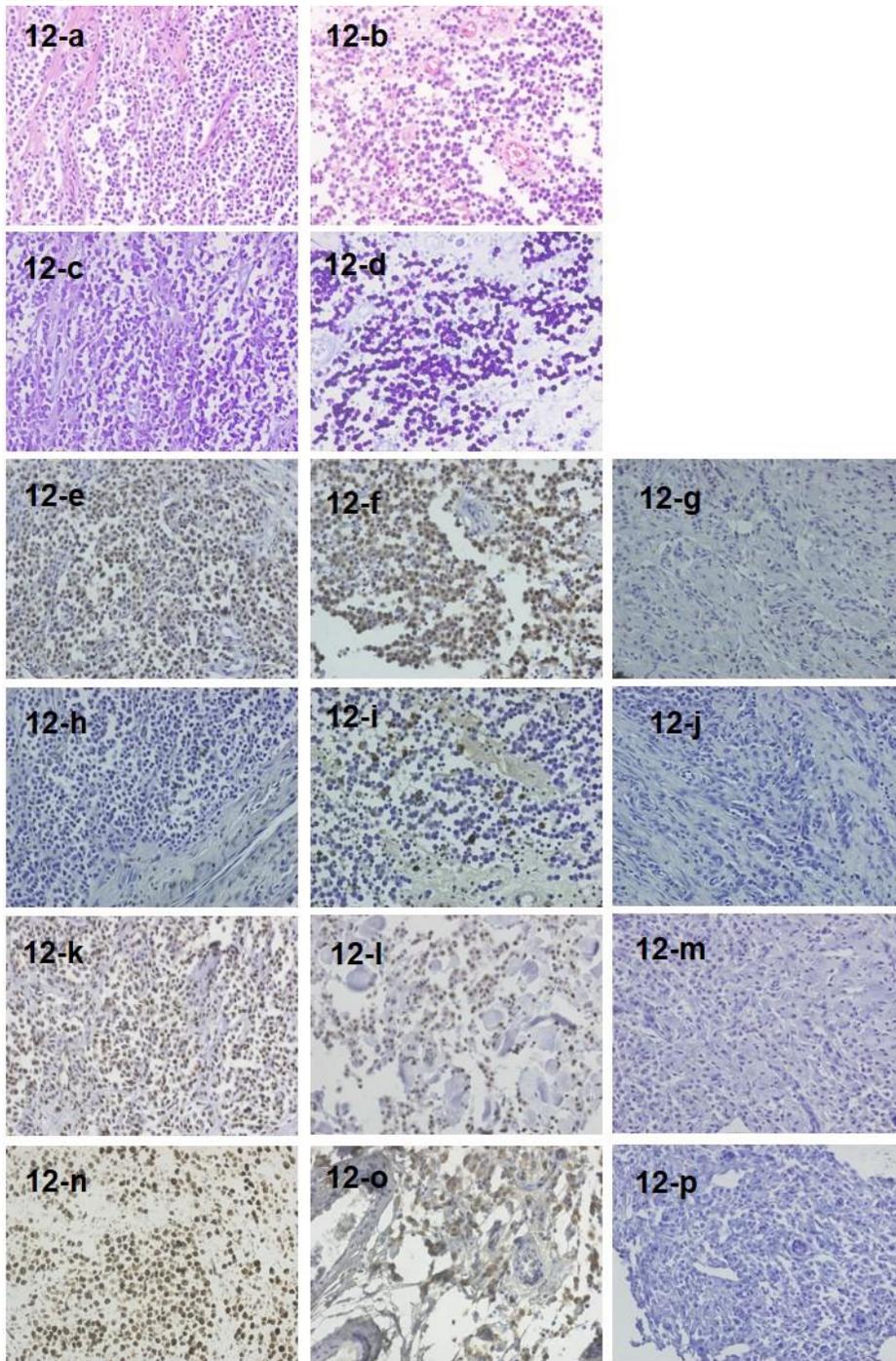
*Microfotografías obtenidas por TMA, 200X, Numero indica paciente 10. a, c, e, h, k, n: Muestras de Pre tratamiento. b, d, f, i, l, o: Muestras de Post tratamiento. g,j,m,p: Controles negativos de inmunotinciones. A y b: Técnica de hematoxilina eosina. c y d: Azul de Toluidina. e- g: CD117, h- j: TUNEL, k- m: PCNA.*

## PACIENTE 11



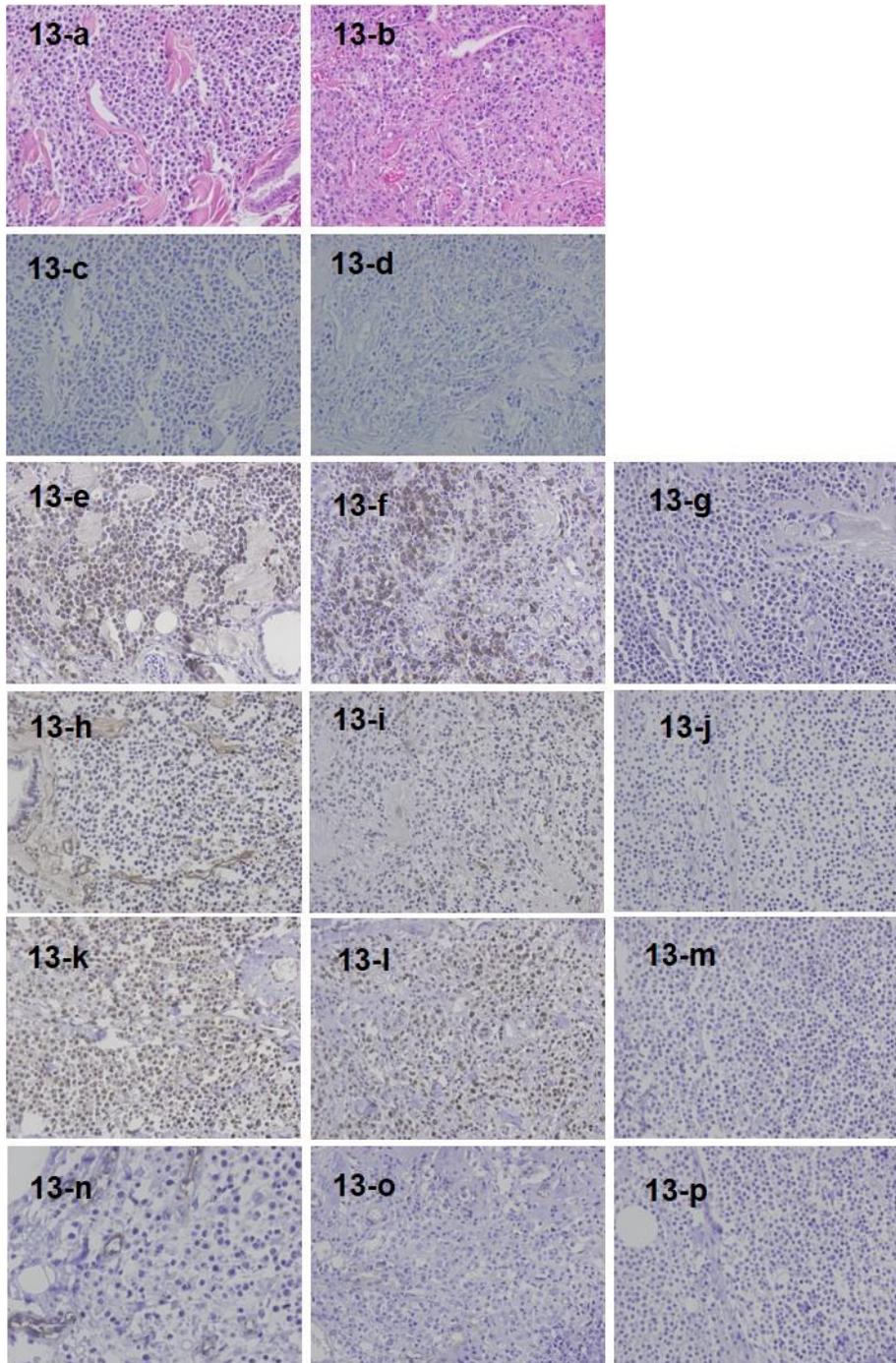
*Microfotografías obtenidas por TMA, 200X, Numero indica paciente 11. a, c, e, h, k, n: Muestras de Pre tratamiento. b, d, f, i, l, o: Muestras de Post tratamiento. g,j,m,p: Controles negativos de inmunotinciones. A y b: Técnica de hematoxilina eosina. c y d: Azul de Toluidina. e- g: CD117, h- j: TUNEL, k- m: PCNA, n-p: CD31.*

**PACIENTE 12:**



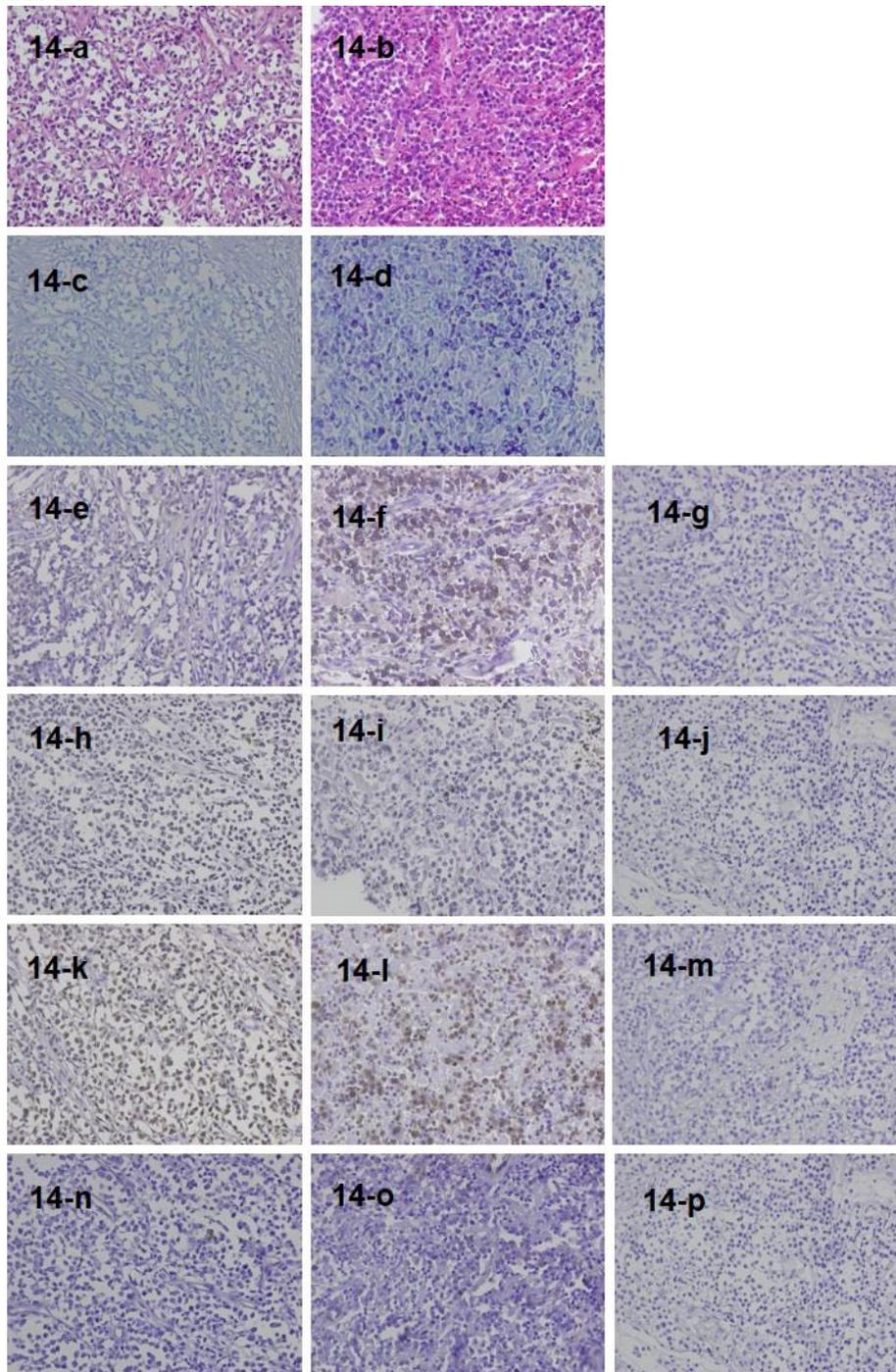
*Microfotografías obtenidas por TMA, 200X, Numero indica paciente 12. a, c, e, h, k, n: Muestras de Pre tratamiento. b, d, f, i, l, o: Muestras de Post tratamiento. g,j,m,p: Controles negativos de inmunotinciones. A y b: Técnica de hematoxilina eosina. c y d: Azul de Toluidina. e- g: CD117, h- j: TUNEL, k- m: PCNA, n-p: CD31.*

## PACIENTE 13



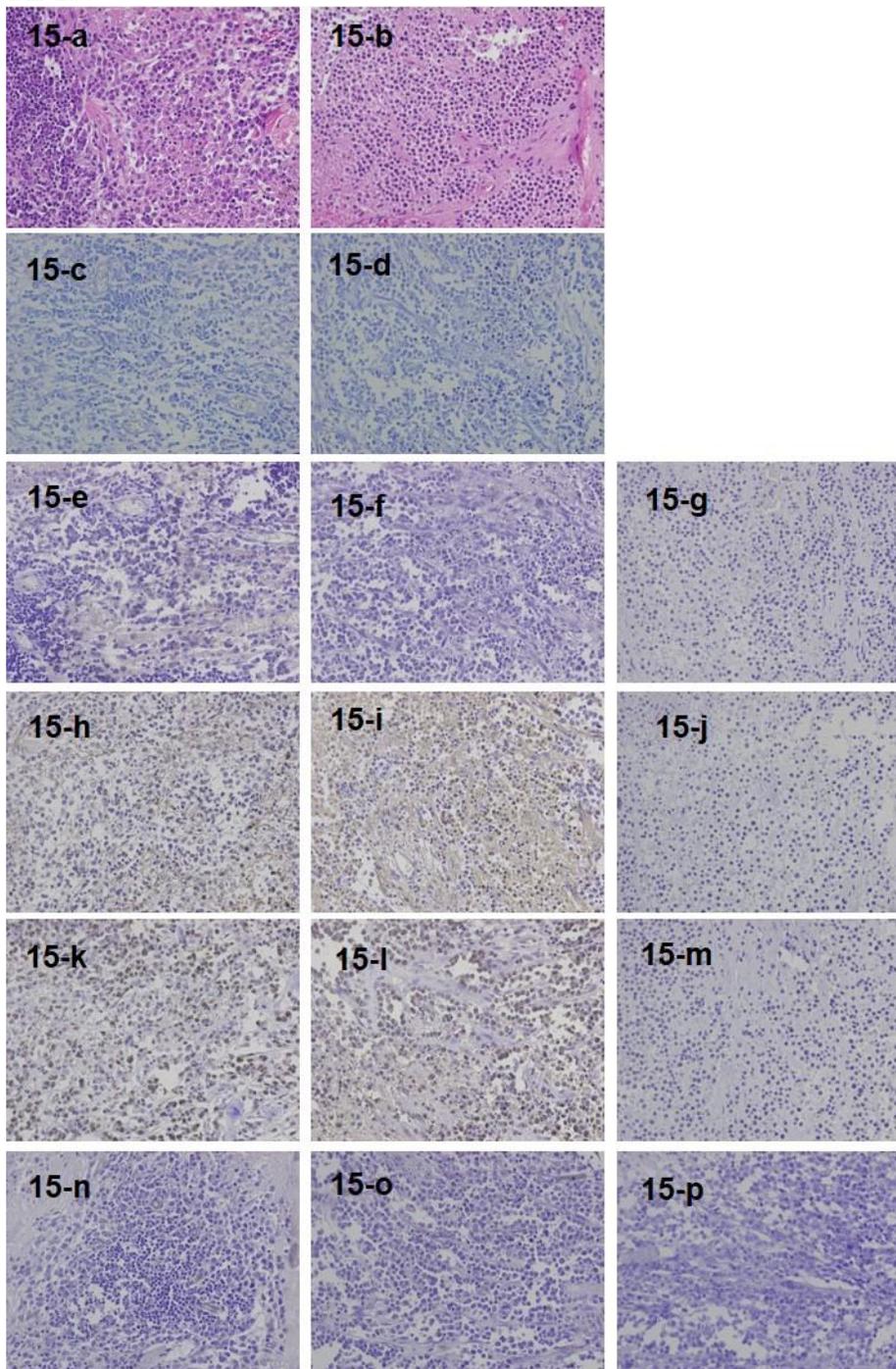
*Microfotografías obtenidas por TMA, 200X, Numero indica paciente 13. a, c, e, h, k, n: Muestras de Pre tratamiento. b, d, f, i, l, o: Muestras de Post tratamiento. g,j,m,p: Controles negativos de inmunotinciones. A y b: Técnica de hematoxilina eosina. c y d: Azul de Toluidina. e- g: CD117, h- j: TUNEL, k- m: PCNA, n-p: CD31.*

**PACIENTE 14:**



*Microfotografías obtenidas por TMA, 200X, Numero indica paciente 14. a, c, e, h, k, n: Muestras de Pre tratamiento. b, d, f, i, l, o: Muestras de Post tratamiento. g,j,m,p: Controles negativos de inmunotinciones. A y b: Técnica de hematoxilina eosina. c y d: Azul de Toluidina. e- g: CD117, h- j: TUNEL, k- m: PCNA, n-p: CD31.*

**PACIENTE 15:**



*Microfotografías obtenidas por TMA, 200X, Numero indica paciente 15. a, c, e, h, k, n: Muestras de Pre tratamiento. b, d, f, i, l, o: Muestras de Post tratamiento. g,j,m,p: Controles negativos de inmunotinciones. A y b: Técnica de hematoxilina eosina. c y d: Azul de Toluidina. e- g: CD117, h- j: TUNEL, k- m: PCNA, n-p: CD31.*

**ANEXO IV**  
**CARTA DE CONSENTIMIENTO**

**CONSENTIMIENTO INFORMADO - Propietarios de pacientes caninos participantes de estudio pre-clínico uso de Imatinib Mesilato en perros con Tumor Venéreo Transmisible o Mastocitoma**

El fin de esta información es ayudarlo a tomar la decisión si su mascota participará o no en este estudio pre-clínico.

**1. OBJETIVO**

El objetivo general de este estudio es analizar los posibles beneficios del tratamiento con Imatinib Mesilato (medicamento que tiene propiedades antitumorales) en perros con Tumor Venéreo Transmisible o Mastocitoma. La información que podamos recopilar nos permitirá sentar las bases para llevar a cabo futuros estudios clínicos con esta droga, tanto en perros como en humanos, de forma tal de explorar nuevas alternativas de tratamiento para el cáncer.

**2. PROCEDIMIENTOS**

Al inicio del ensayo, a su mascota se le realizará un examen físico completo, exámenes sanguíneos (hematología y química sanguínea) y una biopsia incisional bajo sedación o anestesia general (muestra de tejido tumoral de diámetro aproximado de 3-5 mm). Luego se someterá a 7 dosis orales, una vez por día, de Imatinib Mesilato (5 mg/kg/día) o un placebo. Un día después de la última dosificación oral, se procederá a efectuar un nuevo examen físico, con exámenes sanguíneos y una nueva biopsia incisional. Finalmente, se realizará el tratamiento tradicional y definitivo, sin costo para el propietario. Durante el período de estudio, su mascota deberá ser hospitalizada y recibir supervisión veterinaria permanente en dependencias del Centro Médico Veterinario de Colina. El investigador responsable aclarará cualquier consulta relacionada con el ensayo durante el tiempo de estudio.

**3. BENEFICIOS**

Sus aportes y los de otros permitirán disponer de información útil para sustentar futuros estudios clínicos con la droga en ensayo. El estudio contemplará además el manejo quirúrgico o quimioterapéutico convencional al cual se debería someter la mascota como tratamiento definitivo para la enfermedad que padece.

**4. RIESGOS**

La participación de su mascota en este estudio no le debería traer mayores peligros en caso que los exámenes previos se encuentren dentro de rangos normales; sin embargo existe un pequeño riesgo que su mascota presente inconvenientes derivados de la sedación/anestesia, de las biopsias incisionales, inyecciones y/o del medicamento a utilizar (incluyendo la muerte de su mascota). Los inconvenientes pueden ser decaimiento, inapetencia, vómitos, dolor en el sitio de inoculación, entre otros. En caso de ser necesario, se brindará un tratamiento paliativo durante el transcurso del estudio sin costo para usted. Es importante considerar que estudios previos han mostrado que Imatinib Mesilato no provoca toxicidad.

**5. COSTOS**

Aceptar que su mascota participe en este estudio no demandará ningún costo para usted.

**6. COMPENSACIONES**

Usted no recibirá dinero u otra compensación por participar en el estudio, solo información referente al diagnóstico y posterior manejo terapéutico, sin costo, de su mascota.

#### 7. COMUNICACIÓN CON EL INVESTIGADOR

En caso de cualquier duda usted podrá contactarse con el Dr. Carlos González Riveros, profesor de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Andrés Bello, Santiago, en el teléfono 02-7703283 o al correo electrónico [carlosgonzalez@unab.cl](mailto:carlosgonzalez@unab.cl).

#### 8. DERECHOS DEL PARTICIPANTE

Usted puede negarse a que su mascota participe en este estudio en cualquier momento, sin tener que dar ningún tipo de explicación y sin que ello signifique ningún perjuicio para usted.

9. En caso que usted sienta que sus derechos han sido vulnerados de alguna forma, puede dirigirse al comité de Bioética de la Universidad Andrés Bello, cuyo presidente es el Dr. Ariel Reyes ([arielreyes@unab.cl](mailto:arielreyes@unab.cl)).

10. El presente documento será firmado en duplicado quedando una copia en poder del participante y la otra en manos del investigador responsable.

**FECHA**

**NOMBRE Y FIRMA PARTICIPANTE**

