

Histogénesis de los tumores mixtos de glándula mamaria canina

Enrique Aburto Fernández*
Laura Chávez Macías**
Nuria de Buen de A.*
Francisco Trigo Tavera*
Jesús Reynaga Obregón***
Luz María Rosales M.*

Abstract

The origin of different mesenchymal components which characterizes the canine mixed mammary tumours has been controversial since they were first described. Most of the authors have found, through different methods, important evidence that point out the myoepithelial cells as the responsables ones. In the present study, 15 canine mixed mammary tumours were studied using the avidin-biotin-peroxidase complex method with the 7 primary antibodies: Citokeratine, epithelial membrane antigen, carcinoembrionic antigen, muscle-specific actin, vimentin, S-100 protein and desmin. Commercially produced antibodies were used, and their specificity was previously determined regarding its reaction on control tissues to correlate expression of these antigens with the ultraestructural changes. Specificity was reliable for canine tissues except for S-100 protein. Cytokeratin, muscle-specific actin and vimentin expressed themselves remarkably on epithelial, myoepithelial and mesenchymal elements, respectively. Ultraestructurally, 6 main cellular types were identified and characterized; from those, the transitional cells were outstanding (filamentous, stellate and chondroid cells) and remained characteristic and specific of myoepithelial cell origin with actin filaments (5 to 8 nm thick), desmosomes and dense bodies. These electron microscopic findings, together with the expression of the membrane and structural proteins manifested by immunoperoxidase, pointed out the myoepithelial cell origin of their precursors as responsible for the formation of the heterologous mesenchymal component, typical of these tumors. The possibility that the epithelial component is originated from cells capable to have divergent epi-myoepithelial differentiation, as it apparently occurs in the pleomorphic adenomas of the human mammary and salivary glands, is also considered.

Key words: CANINE MIXED MAMMARY TUMORS, HISTOGENESIS.

Resumen

A partir de su descripción primaria, el origen de los distintos componentes mesenquimatosos que caracterizan a los tumores mixtos de la glándula mamaria canina ha sido controvertido. La mayoría de los autores han encontrado, mediante diferentes métodos, evidencias importantes que señalan a las células mioepiteliales como responsables de lo anterior. En el presente trabajo se estudiaron 15 tumores mixtos caninos por medio de la técnica del complejo avidina-biotina-peroxidasa. Se utilizaron 7 marcadores

Recibido el 8 de enero de 1997 y aceptado el 27 de mayo de 1997.

* Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

** Unidad de Patología, Hospital General de México, Secretaría de Salud, Dr. Balmis 148, Col. Doctores, 06726, México, D.F.

*** Coordinación General del Colegio de Ciencias y Humanidades, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

(citoqueratinas, antígeno de membrana epitelial, antígeno carcinoembrionario, actina músculo-específica, vimetina, proteína S-100 y desmina) comerciales para humanos, previa determinación de su reacción en tejidos testigos de caninos, con el propósito de correlacionar la expresión de dichos antígenos con los cambios ultraestructurales que se presentan en los componentes tisulares en transición. La mayoría de los anticuerpos resultaron confiables en tejidos caninos, excepto la proteína S-100. Por su parte, la citoqueratina, actina músculo-específica y vimetina se expresaron de forma notable en elementos epiteliales, mioepiteliales y mesenquimatosos, respectivamente. Ultraestructuralmente se identificaron 6 tipos celulares principales, de éstos las denominadas células de transición (filamentosas, estelares y condroides) conservaban características específicas de células mioepiteliales como filamentos de actina (5 a 8 nm), desmosomas y cuerpos densos. Dichos hallazgos por microscopia electrónica aunados a la expresión de antígenos de membrana y proteínas estructurales, manifiesta por inmunoperoxidasa, señalan a las células mioepiteliales o sus precursoras como responsables de la formación del componente mesenquimatoso heterólogo característico de estos tumores. Se considera también la posibilidad de que el componente epitelial se origine de células con capacidad de diferenciación divergente epimioepitelial, como aparentemente ocurre en los adenomas pleomorfos de la glándula mamaria y salival del humano.

Palabras clave: TUMORES MIXTOS DE GLANDULA MAMARIA, HISTOGENESIS.

Introducción

Los tumores de glándula mamaria ocupan el segundo lugar en frecuencia después de los tumores de piel en los perros de diferente sexo,¹ aunque en la perra son más comunes, en la cual representan del 25% al 30% de todas las neoplasias.^{2,3}

Aproximadamente 65% del total de tumores mamarios son tumores mixtos benignos, de éstos 25% son carcinomas,^{4,5,6} el resto son adenomas, hiperplasias, tumores mixtos malignos y mioepiteliomas.⁷ Los tumores mixtos reciben esta denominación debido a que están constituidos por diversos componentes tisulares como: epitelio glandular, tejido mixoide, cartílago y hueso.^{7,8}

La frecuencia de tumores mixtos mamarios en el perro comienza a ser alta a partir de los 6 años de edad, de tal manera que el riesgo de presentación aumenta con la edad y es mucho mayor en las perras viejas.^{3,9}

El origen del tejido mixoide, cartilaginoso y óseo en estos tumores, ha sido una controversia desde que fueron descritos por primera vez. Se ha pensado que estos tejidos son resultado de la metaplasia de tejido conectivo del estroma,^{2,10,11,12,13,14,15,16} del epitelio^{6,17,18,19,20} o de las células mioepiteliales que rodean a los alvéolos y conductos mamarios.^{8,12,21,22,23,24,25,26,27,28}

Actualmente en patología humana es común el uso de técnicas de inmunoperoxidasa cuyo principio es demostrar la existencia de antígenos estructurales presentes en un tejido determinado.^{29,30,31} En el caso de las lesiones neoplásicas, es de gran ayuda para identificar el origen tisular de los tumores indiferenciados, su variedad antigénica o funcional, así como para clasificar las neoplasias cuyas células alteradas muestran desdiferenciación y diferenciación hacia otros componentes distintos como es el caso de los adenomas pleomorfos y carcinomas metaplásicos de glándula mamaria, entre otros.^{30,31,32,33} Los marcadores celulares que con frecuencia se han utilizado para el estudio

de las lesiones antes mencionadas son citoqueratinas (CK), antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de membrana epitelial (EMA), actina músculo-específica (MSA), proteína S-100 (PS-100), vimetina (VIM) y desmina (DESM).^{32,33,34} Los tres primeros marcan principalmente antígenos epiteliales, siendo las CK una familia heterogénea de proteínas que varían en peso molecular y cuya expresión puede ser diferente en epitelios y mesotelios normales, así como neoplásicos. El CEA es más específico de epitelios glandulares y más abundante en superficies lumenales. El EMA es una glicoproteína aislada de la membrana de glóbulos de grasa en la leche, por lo general es complemento del anterior. Actina es una proteína contráctil presente en las células de músculo liso y estriado, pericitos y células mioepiteliales de glándula mamaria, salival y sudorípara. La PS-100 está presente en tejido nervioso central y periférico, células de Langerhans y melanocitos de la piel, células reticulares interdigitantes, condrocitos y otros elementos como el mioepitelio de la glándula mamaria y salival. Vimetina es un filamento intermedio no específico que puede estar presente en una variedad de tejidos normales y neoplásicos, principalmente de tipo mesenquimatoso. Esta última puede expresarse junto con otros filamentos intermedios como desmina, presentes en músculo liso, esquelético y cardíaco, cuya demostración establece la naturaleza miogénica de cualquier neoplasia.^{29,30,31}

El objetivo del presente estudio fue demostrar la expresión de proteínas estructurales y antígenos de membrana, que se pueden poner de manifiesto en los distintos componentes tisulares del tumor mixto de glándula mamaria canina por medio de técnicas de inmunoperoxidasa, y correlacionarlos con los hallazgos estructurales.

Material y métodos

Para el presente trabajo se seleccionaron 15 biopsias de tumores mixtos típicos de glándula mamaria canina, ob-

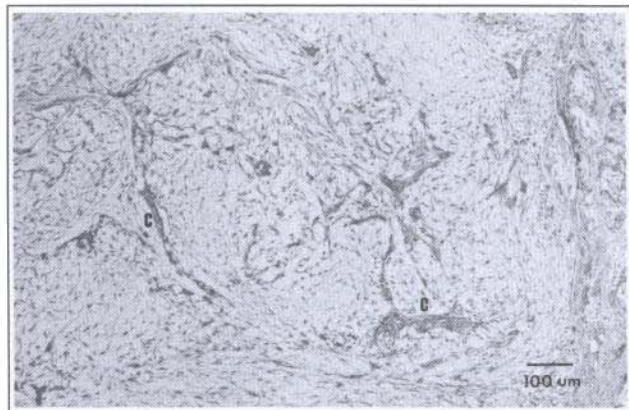


Figura 1. Área mixoide, compuesta por la proliferación de células fusiformes y estelares separadas por abundante sustancia intercelular. Nótese la presencia de conductos glandulares colapsados. H&E, 100X.

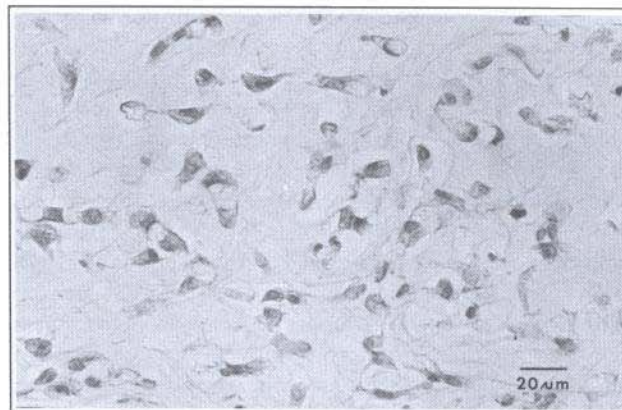


Figura 2. Área condroide en la cual se observan células precartilaginosas en forma de estrella, separadas por matriz de aspecto cartilaginoso. H&E, 400X.

tenidos del archivo de la sección de patología quirúrgica del Departamento de Patología, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, a partir de la revisión de 180 casos diagnosticados, desde 1984 hasta 1991. La selección se realizó con base en la presencia de células que proliferan a partir de conductos y lóbulos mamarios, los cuales aparentemente reflejan diversos grados de dediferenciación y diferenciación hacia tejidos mesenquimatosos.

Los tejidos fueron fijados durante 48 horas con formalina amortiguada (pH 7.4) al 10%, incluidos en parafina, cortados a 4 µm de espesor y teñidos con hematoxilina y eosina (H y E) para su observación por microscopía de luz.

Simultáneamente se procedió a evaluar si existía inmunorreactividad similar entre los marcadores celulares utilizados en tejidos humanos y los correspondientes tejidos caninos que sirvieron como testigos. De tal manera que se utilizaron anticuerpos comerciales contra CK, CEA, EMA, PS-100, VIM, MSA y DESM para ser incubados con cortes histológicos de glándula salival, glándula mamaria, cartílago hialino, músculo esquelético y huesos normales; además de epitelio neoplásico (carcinoma epidermoide), y hueso con cartílago neoplásico (sarcoma osteogénico) de cánidos. Asimismo, se evaluó la reactividad de dichos marcadores en los diferentes componentes del tejido mamario residual en cada caso (testigos internos).

Por otro lado, se utilizó un testigo negativo para cada tejido y un testigo positivo para cada anticuerpo. El primero consistió en sustituir al primer anticuerpo por líquido ascítico normal de ratón; el segundo consistió en someter a cada anticuerpo con un tejido humano de reactividad conocida, para lo cual se utilizaron cortes histológicos de un melanoma para PS-100 y VIM, un rabdiomiosarcoma para MSA y DESM, un carcinoma de colon para CEA y un carcinoma de células renales para EMA y CK.

Se utilizó la técnica del complejo avidina-biotina (ABC) de acuerdo con el procedimiento descrito por Hsu *et al.*³⁵ Una vez evaluados los testigos se procedió a realizar la

técnica de ABC con los mismos marcadores en cortes de 3 o 4 µm de grosor, a partir de los tumores mixtos seleccionados con la finalidad de establecer el grado de intensidad de las reacciones, así como el patrón de inmunorreactividad celular. Para el grado de intensidad se interpretó como fuertemente positivo cuando las células presentaban un citoplasma de color café oscuro, débilmente positivo cuando las células presentaban citoplasma de color café claro, dudoso cuando las células tenían citoplasma de color café claro pero en forma irregular y poco definida; es decir, cuando no se podía diferenciar entre débilmente positivo y una reacción negativa caracterizada por la ausencia de este pigmento. El patrón de inmunorreactividad fue denominado difuso cuando la reacción dentro de un área era positiva o dudosa en una extensión de más del 30%, fue intermedio cuando la reacción se extendía entre 10% y 30%, y focal cuando la reacción estaba presente en uno o varios focos dentro del área en observación.

Para poder llevar a cabo la correlación de los resultados por inmunoperoxidasa con los hallazgos ultraestructurales, cada tumor se estudió en 4 áreas principales: adenomatosa, mixoide, condroide y osteoide (Figuras 1, 2 y 3).

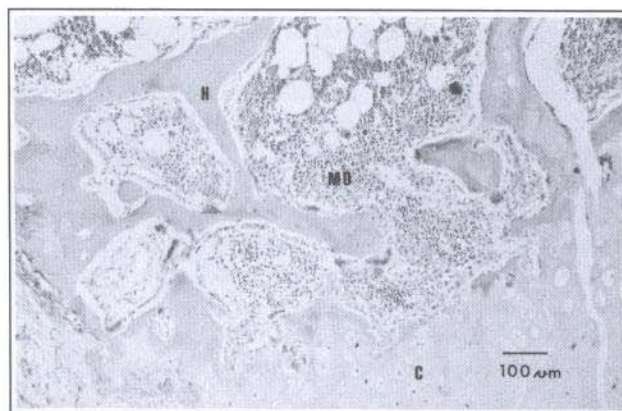


Figura 3. Corte histológico correspondiente a material osteoide, se aprecia cartilago maduro (C) y trabéculas de matriz osteoide (H) que rodean fragmentos de médula ósea. (MO) H&E, 100X.

Las áreas seleccionadas a partir de las muestras previamente evaluadas por inmunoperoxidasa fueron desparafinadas con xilol, hidratadas en concentración descendente de alcoholes al 100%, 96%, 80%, 70%, 60% y 50%; pos fijadas en tetraóxido de osmio al 1% durante 2 horas, lavadas en una solución amortiguadora de cacodilatos al 0.1M, deshidratadas en concentración ascendente de alcoholes al 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96% y 100% para ser incluidas en cápsulas de gelatina con resina epóxica (EPON-812) e incubadas durante 18 horas a 70°C para su polimerización. Posteriormente se realizaron los cortes semifinos en un ultramicrotomo,* fueron teñidos con parafénico y observados en un microscopio de luz para escoger los campos que se llevaron a cortes finos, utilizando soluciones acuosas de acetato de uranio y citrato de plomo como medios de contraste. Estos cortes finos fueron observados en un microscopio electrónico de transmisión** y fotografiados a 12 000, 7 000 y 4 400 aumentos y ampliados X 4.

La información obtenida fue ordenada en una base de datos (d-Base 3 plus) y dividida en las cuatro áreas principales, presentes en cada tumor. Los datos se vaciaron en tablas de contingencia para poder realizar pruebas de Ji cuadrada con el propósito de determinar una asociación estadísticamente significativa, entre el grado de intensidad de la reacción por inmunoperoxidasa y su correspondiente patrón de distribución en cada área, así como entre cada una de las variables antes mencionadas y sus hallazgos ultraestructurales.

Resultados

En la evaluación de los anticuerpos comerciales usados para tejidos humanos en los tejidos testigo, provenientes de cánidos, se observó que la inmunorreactividad fue la esperada excepto para PS-100 cuya reacción para cartílago normal resultó débilmente positiva y focal. Para el caso de nervios, melanocitos, glándulas sudoríparas y mioepitelio de glándula salival, resultó dudoso; en el resto de los constituyentes tisulares fue negativa. Asimismo, los testigos positivos (tejidos humanos) confirmaron la especificidad de los anticuerpos, al reaccionar estos últimos en la forma esperada (Figuras 1, 2, 3).

El anticuerpo para CK resultó fuertemente positivo con distribución difusa en las células epiteliales que revisten a los conductos y papilas intraductales, localizadas en el área adenomatosa; las células mioepiteliales ubicadas junto a la membrana basal y la mayoría de los elementos que proliferan en el área mixoide, fueron negativos o dudosos (Figura 4). En torno al área cartilaginosa se observaron focos de células estelares débilmente positivas, siendo negativa la reacción en cartílago maduro y hueso. Los marcadores para CEA y EMA fueron débilmente positivos en forma

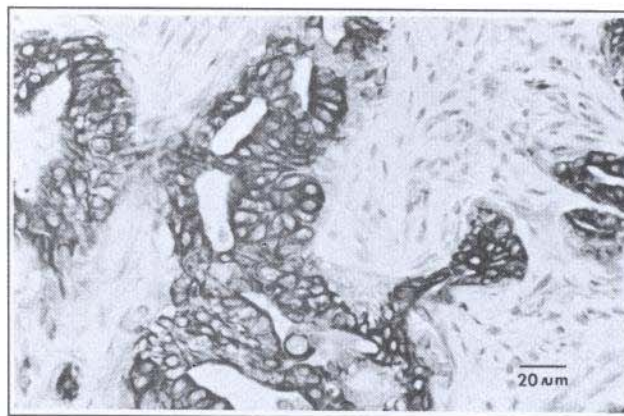


Figura 4. Corte histológico que ejemplifica una reacción fuertemente positiva para citoqueratina (café oscuro) en las células epiteliales que revisten conductos. 400X.

difusa para las células epiteliales, mientras que CEA resultó débilmente positivo para algunos grupos de células transicionales, estelares y condroides en las áreas mixoide y cartilaginosa, así como EMA fue dudosa y focal en las células transicionales. Para el caso de MSA, el anticuerpo marcó fuertemente positivo con distribución difusa en las células mioepiteliales junto a la membrana basal de los conductos y papilas intraductales; sin embargo, a medida que las células proliferaban en el área mixoide y en las zonas precartilaginosas (células estelares y condroides), se tornaban débilmente positivas (Figura 5). En algunos casos se apreciaron zonas de tejido con apariencia de músculo liso (mioides) de escasa celularidad y matriz colagenizada, en donde MSA era débilmente positiva. Tanto el cartílago maduro como el hueso fueron negativos. El marcador para VIM fue fuertemente positivo y difuso en las células mioepiteliales de los conductos, en las células que ocupaban el área mixoide, y en las células estelares y condroides, aun en las áreas de cartílago maduro (Figura 6). Los osteoblastos resultaron débilmente positivos a VIM. Para el caso de PS-100, únicamente las células de las zonas precartilaginosa y condroide marcaron débilmente con distribución intermedia; en el área mixoide, hubo algunos focos de células en transición, débilmente positivas. El resto de los constituyentes, resultaron negativos. Para DESM, únicamente algunas células alargadas en las denominadas áreas "mioides" resultaron positivas, así como en el músculo liso vascular. Los demás elementos de tumor mixto fueron negativos para este anticuerpo.

Como se mencionó anteriormente, los tumores fueron estudiados en cuatro áreas principales (adenomatosa, mixoide, condroide y osteoide), en cada una de las cuales se observaron 6 diferentes tipos celulares, que fueron clasificados con base en sus características ultraestructurales.

Las células *epiteliales lumbinales*, localizadas en el borde apical de conductos y acinos, principalmente en el área adenomatosa, se caracterizaron por ser poliédricas y presentar desmosomas y uniones estrechas con otras células epiteliales. El núcleo era ovoide, redondo o de forma irregular, las mitocondrias eran relativamente grandes; sin

* Porter Blume MT-2.

**Zeiss 900.

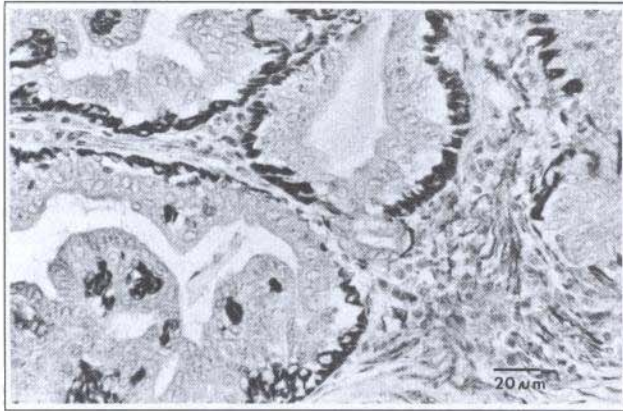


Figura 5. Área adenomatosa que muestra una proliferación de conductos cuyas células epiteliales unidas a la membrana basal, son fuertemente positivas (café oscuro) para actina músculo-específica, 400X.

embargo, la mayoría estaban crenadas, posiblemente debido al proceso de desparafinación del tejido. También presentaban un retículo endoplásmico bien desarrollado con cisternas dilatadas, además de filamentos de 8 a 10 nm de grosor orientados al azar y un segundo tipo de filamentos de 5 a 8 nm orientados hacia las zonas apicales del citoplasma. En algunos casos se apreciaban luces intracitoplásmicas con microvellosidades que se proyectan, así como luces formadas por la unión de varias células.

Las células *mioepiteliales* presentes principalmente en las áreas adenomatosas y con menos frecuencia en las áreas mixoides, generalmente se hallaban en contacto con una membrana basal, unidas a ella por hemidesmosomas o bien unidas a otras células epiteliales y mioepiteliales por desmosomas. Su forma era alargada o irregular, el núcleo, redondo, ovoide o irregular con heterocromatina y en ocasiones un nucleolo aparente. En estas células también fueron identificados dos tipos de filamentos, los más delgados cuyo diámetro era de 5 a 8 nm, esparcidos en el citoplasma, o bien distribuidos en paquetes compactos. Los filamentos más gruesos cuyo diámetro oscilaba entre 8 y 10 nm, eran más electrodensos y estaban distribuidos entre los filamentos delgados. Además algunas células mioepiteliales presentaban cuerpos densos de contornos irregulares, distribuidos de igual forma en el citoplasma, y un retículo endoplásmico rugoso bien desarrollado.

Las células *filamentosas*, consideradas como un estadio transicional, constituían el principal tipo celular en las áreas mixoides, aunque también se podían encontrar en las áreas condroides y adenomatosas. En estas últimas, se localizaban entre las células epiteliales luminales y las células mioepiteliales o la membrana basal. En la medida en que las células filamentosas se hacían más numerosas, aumentaba el espacio entre ellas, el cual estaba ocupado por matriz intercelular mucoide o condroide de las zonas correspondientes. Asimismo, las células más alejadas de la zona adenomatosa perdían sus uniones tipo desmosoma y hemidesmosoma. El núcleo de estas células era ovoide o

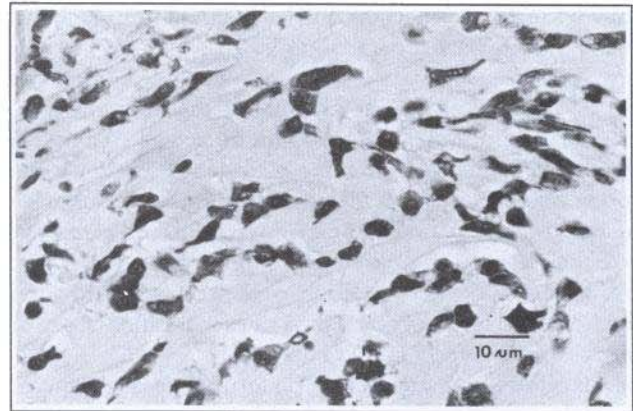


Figura 6. Sección de una área precartilaginosa formada por células alargadas y estelares fuertemente positivas a vimetina (café oscuro), 400X.

irregular, en ocasiones con uno o dos nucleolos prominentes. El citoplasma era por lo regular electrodensito debido a la gran cantidad de filamentos orientados en distintas direcciones, en ocasiones paralelos al eje longitudinal de la célula, o bien alrededor del núcleo. Dichos filamentos medían por lo regular de 8 a 10 nm de diámetro; sin embargo, en algunos casos el grosor que predominaba era de 5 a 8 nm. Ocasionalmente se observaron cuerpos densos similares a los descritos en las células mioepiteliales (Figura 7).

Las células *estelares*, denominadas de esta manera por su forma de estrella, se caracterizaban por presentar prolongaciones citoplásmicas pronunciadas. Dichas células eran

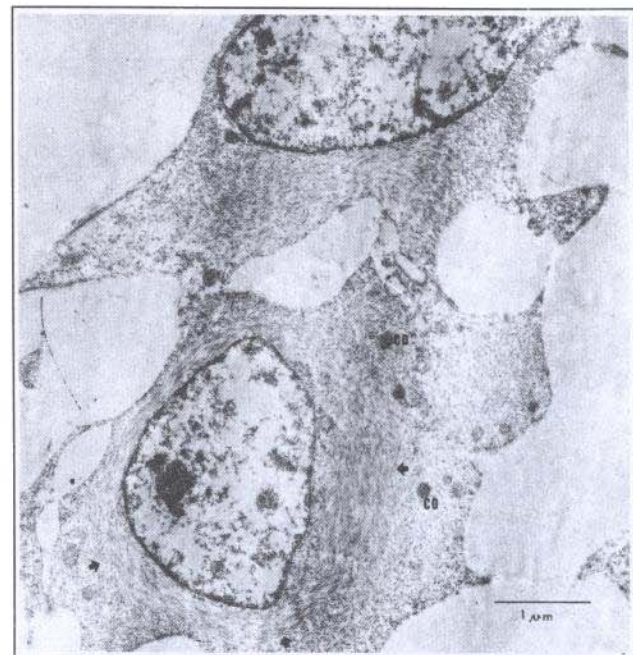


Figura 7. Células filamentosas de contornos irregulares que tienden a aislarse en una matriz mucoide. El citoplasma es electrodensito debido a la gran cantidad de filamentos de 5 a 8 nm orientados predominantemente alrededor del núcleo (flechas). También pueden observarse algunos cuerpos densos (CD), 28000X.

mucho menos numerosas que las filamentosas y se hallaban por lo general separadas por la formación de grandes espacios intercelulares o bien aisladas por abundante sustancia intercelular, en las zonas mixoide y condroide. Su núcleo era oval o irregular con nucleolos aparentes y heterocromatina reativamente abundante. El citoplasma presentaba abundantes filamentos gruesos y delgados de diámetros similares a los descritos en las células mioepiteliales y filamentosas con aparente predominio de 5 a 8 nm. Asimismo, se observaron cuerpos densos, así como gotas de lípidos dentro del citoplasma y era más difícil observar algún tipo de unión intercelular.

Las células *condroides* incluyeron formas precartilaginosas y células parecidas a condrocitos. Las primeras eran más abundantes, sobre todo en las zonas de cartílago inmaduro y en las áreas periféricas de cartílago maduro. Se caracterizaban por presentar grandes gotas de lípidos en su citoplasma y aún se observaban filamentos principalmente de 5 a 10 nm de grosor. Los cisternas de retículo endoplásmico comenzaban a dilatarse para formar grandes espacios dentro del citoplasma y ocasionalmente se apreciaban gránulos de glucógeno dispersos, así como algunos lisosomas (Figura 8). Las células que se asemejaban a condrocitos eran de forma irregular con abundantes procesos citoplásmicos aislados e inmersas en matriz condroide. Dichas células presentaban además cambios degenerativos avanzados caracterizados por la dilatación de cisternas de retículo endoplásmico y núcleo con abundante heterocromatina de contornos irregulares. Era difícil apreciar cambios en otros organitos como mitocondrias, aparato de Golgi y lisosomas debido al proceso de desparafinación al que fueron sometidos los tejidos. Por

otro lado, se apreciaban abundantes cuerpos densos generalmente redondos de características diferentes a las mencionadas en las células mioepiteliales.

Finalmente las células *osteoides* localizadas exclusivamente en los bordes de las trabéculas de matriz osteoide, eran escasas y presentaban las características típicas en los osteoblastos como son: forma oval con prolongaciones citoplásmicas, núcleo oval o redondo, excéntrico con cromatina concentrada en la periferia o formando nucleolos y retículo endoplásmico bien desarrollado; en ocasiones con dilatación de sus cisternas. En torno a estas áreas, podían observarse células condroides con cambios degenerativos y algunas células estelares.

Debido al limitado número de casos en estudio, así como a la imposibilidad de aglutinar renglones o columnas en las tablas de contingencia, no se observó asociación significativa desde la perspectiva estadística ($P > 0.05$). Sin embargo, el ordenamiento de los resultados y la revisión de los mismos en tablas de contingencia, permitió realizar la descripción que a continuación se discute.

Discusión

De acuerdo con los hallazgos informados por otros autores, la mayoría de los marcadores utilizados por inmunoperoxidasa en el presente trabajo fueron considerados como confiables, durante su evaluación en los testigos correspondientes, incluyendo a los tumores mixtos; ya que por lo regular se obtuvo la inmunorreactividad esperada, excepto en el caso de PS-100.^{30,32,33,34,36,37}

Como se describió en los resultados, EMA, CEA y CK reaccionaron de acuerdo con lo esperado, como marcadores de elementos epiteliales; de hecho la reacción para CK, fue casi siempre intensa en tejidos normales y neoplásicos; sin embargo, las células mioepiteliales no neoplásicas resultaron negativas en los testigos normales y testigos internos, similar a lo informado por Morinaga *et al.*³⁴ En las áreas adenomatosas y mixoides de los tumores mixtos, las células mioepiteliales y en transición eran débilmente positivas a CK, lo cual concuerda con algunos trabajos.^{32,34,37}

El marcador para MSA resultó ser un excelente indicador de células mioepiteliales en tejidos normales y neoplásicos, así como para músculo liso vascular de los tejidos residuales. Sin embargo, la intensidad disminuía a medida que las células que proliferaron se alejaban del área adenomatosa, y era nula en las áreas de cartílago maduro, probablemente debido a la pérdida de proteínas contráctiles durante el proceso de desdiferenciación mioepitelial y diferenciación hacia cartílago.

Vimentina es uno de los llamados filamentos intermedios que conforman al citoesqueleto al igual que CK y DESM, se denominan intermedios debido a que su tamaño se ubica entre el de los microfilamentos (4 a 6 nm) y los microtúbulos (25 nm). El primero no es específico y está presente en una gran variedad de células y tejidos, como es el caso del músculo liso vascular, en la mayoría de sarcomas, en melanomas, linfomas y en algunas neoplasias de estirpe

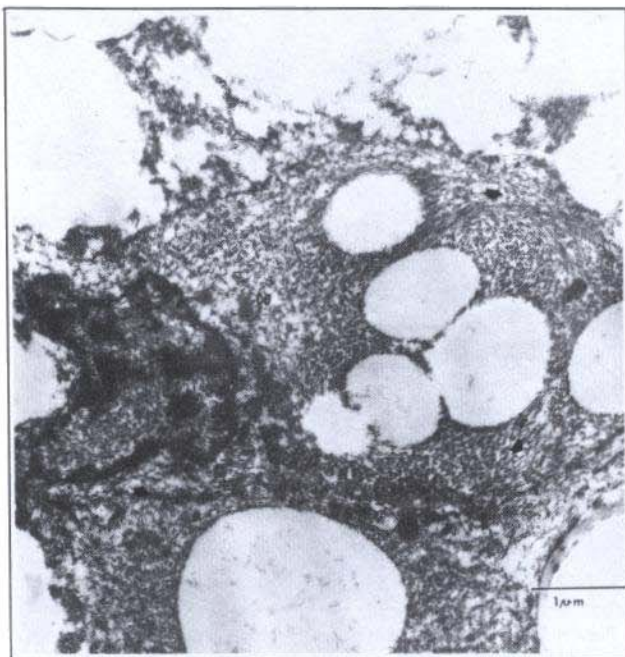


Figura 8. Célula precartilaginosa en la que se observan grandes vacuolas en su citoplasma y aun presenta filamentos de diferente grosor (flechas), así como cuerpos densos (CD), 28000X.

epitelial. De hecho, algunos laboratorios utilizan a VIM como un testigo de tinción obligado con el fin de verificar la preservación de antígenos en el tejido en estudio.^{29,30,34} En el presente trabajo, el anticuerpo para VIM respondió conforme a lo esperado al reaccionar intensamente y en forma difusa en la mayoría de los tejidos testigos y en estudio, denotando la presencia de filamentos mesenquimales. De igual forma a lo informado por Morinaga *et al.*³⁴ en las glándulas salivales normales no hubo reacción en las células mioepiteliales, tal como sucedió en CK. Para el caso de los tumores mixtos, únicamente los elementos epiteliales resultaron negativos o dudosos, mientras que las células mioepiteliales, así como las células en transición, las condroides y osteoides, eran fuertemente positivas a VIM. Esto último probablemente se debe a que la expresión de VIM aumentaba a medida que las células perdían cohesión, contrario a lo observado con CK cuya intensidad está influida por el grado de contacto entre célula y célula. Lo anterior puede constituir una característica de las células mioepiteliales normales y neoplásicas.³⁸

Asimismo, se puede afirmar con base en la expresión de VIM, que la conservación de los tejidos utilizados es lo suficientemente confiable para la interpretación de los demás marcadores, tomando en cuenta también los resultados en los testigos negativos y positivos.

Como se mencionó, DESM es otro filamento intermedio, presente en todo tipo de tejido muscular, a nivel de las líneas "Z" que sirven para interconectar filamentos en este tipo de células. Si bien el anticuerpo para DESM reaccionó en el músculo liso vascular en los controles internos, así como en algunas células aisladas de las áreas mioides; las células mioepiteliales y las células de transición resultaron negativas, a diferencia de lo encontrado por otros autores.³⁴ Por otro lado, la reacción para PS-100 fue negativa en la mayoría de los elementos que normalmente la manifiestan, como en el mioepitelio normal y neoplásico de glándula mamaria y salival; en glándulas sudoríparas, nervios periféricos, melanocitos, etc. Únicamente se observaron algunos focos débilmente positivos en las áreas de transición mixoides, precondroides y cartílago. Tomando en cuenta que la expresión de PS-100 en el testigo positivo (melanoma) resultó intensa y difusa, se puede pensar que la especificidad de especie de anticuerpo explica los resultados en tejidos heterólogos.

Los hallazgos ultraestructurales en el presente trabajo son similares a los descritos por Kaldrimidou *et al.*,³⁹ y Tateyama y Cotchin⁴⁰ en sus respectivas investigaciones. Básicamente se describen 6 tipos celulares que permiten seguir una secuela lógica de transformación a partir de las células mioepiteliales que empiezan a proliferar en las áreas adenomatosas, hasta la formación de cartílago maduro. Se ha considerado que algunos de los principales marcadores ultraestructurales de las células mioepiteliales son: su relación con membrana basal, la presencia de desmosomas y hemidesmosomas, miofilamentos de actina (5 a 7 nm), cuerpos densos y vesículas pinocitóticas. En este trabajo, las últimas no se observaron, probablemente

debido a que los tejidos en estudio fueron sometidos a desparafinación para su evaluación ultraestructural, o bien a que la preservación de las muestras no fue idónea. Las células filamentosas, estelares y condroides, mantienen algunas características en común con las mioepiteliales, como la presencia de filamentos de actina, desmosomas, cuerpos densos y fragmentos de membrana basal, que tienden a desaparecer en las zonas de cartílago bien diferenciado. Los denominados cuerpos densos, frecuentes en muchas de las células neoplásicas, probablemente correspondan a agregados de tonofilamentos (filamentos intermedios) de 8 a 10 nm de grosor.⁴⁰ Por otro lado, los gránulos electrodensos irregulares, presentes en las células y matriz condroide, pueden corresponder a la síntesis de glicoproteínas características de este tejido.³⁹

La conservación de miofilamentos de actina y de filamentos intermedios (8 a 10 nm) como CK y VIM, en la mayoría de los componentes neoplásicos mesenquimatosos, apoya la teoría de que los mismos se originan de una célula en común con características mioepiteliales. Asimismo, es bien conocida la capacidad que las células mioepiteliales tienen para diferenciarse en distintos elementos mesenquimales, y producir mucopolisacáridos ácidos, matriz mixoide, colágena y matriz cartilaginosa, particularmente bajo condiciones patológicas.^{17,33}

De manera similar a lo informado por Von Bomhard *et al.*,⁴¹ no se encontró evidencia que indique que las células mioepiteliales o transicionales den lugar a la formación de hueso en forma directa. Al parecer este último es formado por osificación endocondral, y las células que participan en la osificación endocondral de los tumores mixtos son indistinguibles de células normalmente encontradas en dicha transformación, esto está apoyado por la observación de que únicamente fue factible encontrar focos de tejido osteoide, en torno o dentro de cartílago generalmente maduro.

En cuanto al componente epitelial neoplásico que prolifera casi en forma paralela con las células mioepiteliales para formar conductos, acinos, papilas o nidos, aun en las áreas mixoides, éste posiblemente deriva de las células localizadas en la membrana basal con capacidad de desarrollar una diferenciación divergente, epitelial y mioepitelial, como parece ocurrir en los adenomas pleomorfos de la glándula salival y mamaria del humano, y cuya imagen histológica es notablemente similar a los tumores mixtos de glándula mamaria canina.³²

De lo anterior, se concluye que los resultados obtenidos en el análisis por inmunoperoxidasa y microscopia electrónica, dan continuidad a las observaciones realizadas por otros autores, para confirmar que las células mioepiteliales son las responsables de la formación de tejido mixoide, cartílago e indirectamente tejido óseo, en los denominados tumores mixtos de glándula mamaria canina. Por otro lado, la mayoría de los marcadores comerciales utilizados para la técnica del complejo avidina-biotina peroxidasa, fueron de utilidad para llevar a cabo este estudio. De éstos destaca la reacción para CK, MSA y VIM, los cuales proporcionaron datos importantes para correlacionar ultra-

estructuralmente. De tal manera que es recomendable el manejo de técnicas de inmunoperoxidasa para realizar trabajos similares en cánidos, aun utilizando marcadores para humanos; siempre y cuando se utilicen los testigos apropiados para cada uno y se verifique previamente si son confiables en tejidos heterólogos.

El presente trabajo proporciona conocimientos básicos en torno a la patología neoplásica de la glándula mamaria de la perra. En este caso el conocimiento de la histogénesis en un tumor de aspecto histológico tan variable y complejo, es determinante para su clasificación y denominación correcta; ya que una vez establecido lo anterior, se crea la necesidad de investigar respecto de su etiología, comportamiento biológico y pronóstico; estos últimos mediante estudios de correlación clínico-patológica, fundamentales para crear medidas profilácticas, terapéuticas, o ambas. Por otro lado, este tipo de trabajos, llevados a cabo en cánidos, puede proporcionar información de utilidad en la patología neoplásica de la glándula mamaria y salival del humano, ya que existen lesiones con características morfológicas muy similares en este último.

Referencias

- Prier JE, Brodey RS. Canine neoplasia. A prototype for human cancer study. *Bull Wld Hlth Org* 1963;29:331-344.
- Bloom F. Pathology of the dog and cat. Evanston, Illinois: American Veterinary Publications, 1954.
- Dorn CR, Taylor DON, Frye FL, Hibbard HH. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties California. I. Methodology and description of cases. *J Natl Cancer Inst* 1968;40:295-305.
- Dahme E, Wiess E. Zur Systematik der Mammatumoren des Hundes. *Dtsch Tierärztl Wschr* 1958;65:458-461.
- Mulligan RM. Neoplasms of the dog. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins, 1949.
- Nieberle K. Zur Kenntnis des Hundes. Mammamischgeschwülste des Hundes. *Ztschr Krebsforsch* 1933;39:113-127.
- Moulton JE. Tumors in domestic animals. 3rd ed. San Diego, California: California Press, 1990.
- Moulton JE, Taylor DON, Dorn CR, Andersen AC. Canine mammary tumors. *Pathol Vet* 1970;7:289-320.
- Harvey HJ, Gilbertson SR. Canine mammary gland tumors. *Vet Clin North Am* 1975;5:495-506.
- Auler H, Wernicke H. Über Tumoren des Hundes. *Ztschr Krebsforsch* 1932;35:1-49.
- Feldman WH. Neoplasms of domesticated animals. Mayo Clinic Monographs. Philadelphia: WB Saunders, 1932.
- Hampe JF, Misdorp W. Tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bull Wld Hlth Org* 1974;50:111-133.
- Huggins C, Moulder PV. Studies on the mammary tumors of dogs. *J exp Med* 1944;80:441-454.
- Mulligan RM. Some endocrinologic considerations of canine neoplastic diseases. *Arch Pathol* 1945;39:162-171.
- Palmer TE, Monlux AW. Acid mucopolysaccharides in mammary tumors of dogs. *Vet Pathol* 1979;16:493-509.
- Schmidt Y. Zur Frage der Entstehung der Mischgewächse an Hand von zwei Fällen von Milchdrüsenmischgeschwülsten des Hundes. *Virchows Arch Pathol Anat* 1933;291:491-506.
- Allen AC. So-called mixed tumors of the mammary gland of dog and man. With special reference to the general problem of cartilage and bone formation. *Arch Pathol* 1940;9:589-624.
- Jabara AG. Canine mixed tumors. *Austr vet J* 1960;36:212-221.
- Kaufman MW, Marti JR, Gallager HS, Hoehn JL. Carcinoma of breast with pseudosarcomatous metaplasia. *Cancer* 1984;53:1908-1917.
- Misdorp W, Cotchin E, Hampe JF, Jabara AG, Sandersleben von J. Canine malignant mammary tumors. III special types of carcinomas, malignant mixed tumors. *Vet Pathol* 1973;10:241-256.
- Biggs R. The myoepithelium in certain tumors of the breast. *J Pathol Bacteriol* 1947;59:437-444.
- Cotchin E. Mammary neoplasms of the bitch. *J comp Pathol* 1958;68:1-22.
- Hamperl H. Über die Myoethelien (myoepithelialen Elemente) der Brustdrüse. *Virchows Arch Pathol Anat* 1940;305:171-215.
- Peyron A. Development des tumeurs de la glande mammaire chez la chienne. *Rec Vet Toulouse* 1924;76:764-765.
- Pulley LT. A study of myoepithelium in canine mammary mixed tumours. *Vet Bull* 1972;42:224-227.
- Pulley LT. Ultrastructural and histochemical demonstration of myoepithelium in the normal canine mammary gland. *Am J vet Res* 1973;34:1505-1512.
- von Sandersleben J. Die Myoepithelzelle und ihre Bedeutung für die Histogenese der Mamma Tumoren der Hündin. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 1976;89:67-71.
- Schlotke B. Histochemische Untersuchungen zur Rolle der Myoepithelzellen bei der Morphogenese von Mamma Tumoren der Hündin. *Zntb Veterinaermed* 1976;23a:661-682.
- Battifora H. Precongreso: Inmunohistoquímica aplicada. Memorias de la XXXV Reunión Anual. Puebla, México. Puebla, (Puebla) México: Asociación Mexicana de Patólogos; 1992:1-20.
- Nadji M, Azoride RM. Immunoperoxidase techniques: a practical approach to tumor diagnosis. Chicago, Illinois: American Society of Clinical Pathologists, 1986.
- Taylor CR. Immunomicroscopy: a diagnostic tool for the surgical pathologist. Philadelphia: WB Saunders, 1986.
- Díaz DM, McDivitt RW, Wick MR. Pleomorphic adenoma of the breast: A clinicopathologic and immunohistochemical study of 10 cases. *Hum Pathol* 1991;22:1206-1214.
- Wargots EJ, Norris HJ. Metaplastic carcinomas of the breast. Matrix-producing carcinoma. *Hum Pathol* 1989;20:628-635.
- Morinaga S, Nakajima T, Shimozato Y. Normal and neoplastic myoepithelial cells in salivary glands: An immunohistochemical study. *Hum Pathol* 1987;18:1218-1226.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1984;29:577-580.
- Arai K, Uehara K, Nagai Y. Expression of type II and type XI collagens in canine mammary mixed tumors and demonstration of collagen production by tumor cells in collagen gel culture. *Jpn J Cancer Res* 1989;80:840-847.
- Tavassoli FA. Myoepithelial lesions of the breast. Myoepitheliosis, adenomyoepithelioma, and myoepithelial carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1991;15:554-568.
- Ben-Ze'ev A. Differential control of cytokeratins and vimentin synthesis by cell-cell contact and cell spreading in culture epithelial cell. *J Cell Biol* 1984;22:1424-1426.
- Kaldrimidou E, Kanakoudis G, Tsangaris T, Karagiannopoulou M. Metaplastic stages of myoepithelial cells in canine mammary mixed tumors. *Bull Hellenic Vet Med Soc* 1986;37:156-169.
- Tateyama S, Cotchin E. Electron microscopic observations on canine mixed mammary tumors, with special reference to cytoplasmic filamentous components. *Am J vet Res* 1978;39:1494-1501.
- von Bomhard D, Schaeffer E, von Sandersleben J. Histogenesis of osseous structures in epithelial tumors. A light and electron microscopic study on the so called mixed tumour of the mammary gland in bitches. *Ztschr Krebsforsch* 1977;89:19-29.