



**IX CONGRESO INTERNACIONAL DE
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**
en especies menores y mayores.
LATACUNGA 2, 3 Y 4 DE OCTUBRE 2019

 UNIVERSIDAD
TÉCNICA DE
COTOPAXI

 EDUCACIÓN
CONTINUA

 Medicina
Veterinaria

 **AGROCALIDAD**
AGENCIA DE REGULACIÓN Y
CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO

 CIDE



M.S. en Investigación en Veterinaria y
Ciencia y Tecnología de Alimentos,
Universidad de León. España

Médica Veterinaria y Zootecnista,
Universidad Técnica de Ambato. Ecuador

Líneas de Interés

Inmunohistoquímica

Histopatología

Oncología

Título de la Investigación

EVALUACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE MACRÓFAGOS ASOCIADOS A HEMANGIOSARCOMAS CANINOS

INTRODUCCIÓN

TUMORES DE ORIGEN ENDOTELIAL

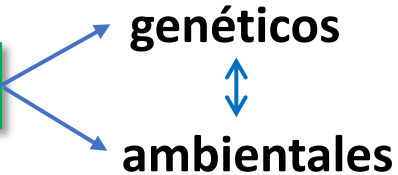
- Hemangioma
- Hemangiosarcoma

Epidemiología

→ Representan **(7%)** → razas → localizaciones

- Dermis -Subcutáneo
- Vísceras

Factores de riesgo



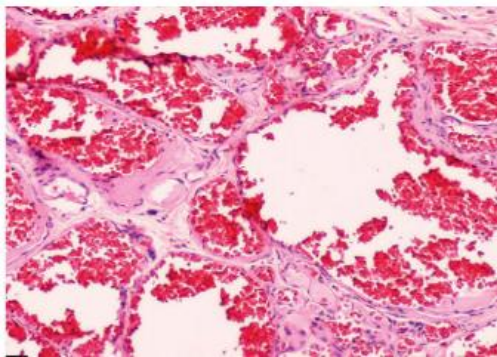
Factores pronósticos.- Clínicos

SISTEMA DE ESTADIFICACIÓN TNM	
I	T0 o T1, N0, M0
II	T1 o T2, N0 o N1, M0
III	T2 o T3, N0, N1 o N2, M1

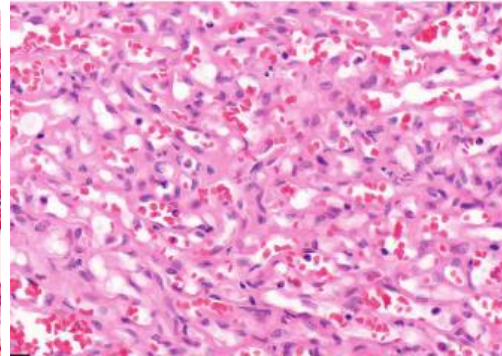


Factores pronósticos.- Histológicos

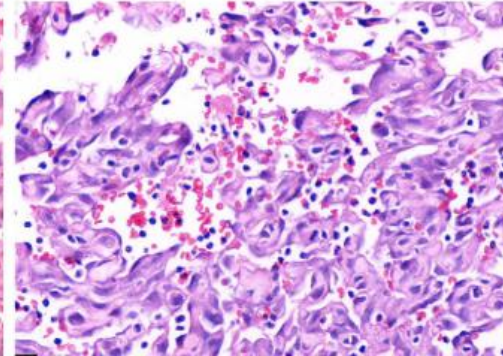
Parénquima: grado de organización celular, pleomorfismo nuclear, necrosis, recuento mitótico.



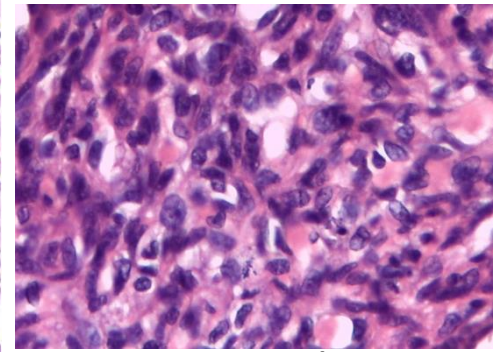
Hemangioma Cavernoso



Hemangioma Capilar

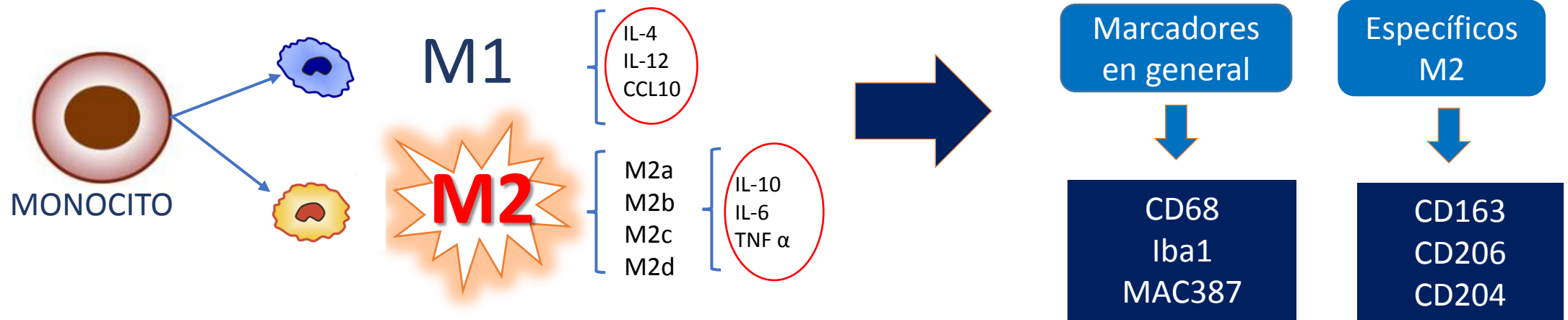


Hemangiosarcoma bien diferenciado



Hemangiosarcoma pobremente diferenciado

Estroma: fibroblastos, vasos sanguíneos, células inflamatorias – Macrófagos asociados al comportamiento de tumores.



Hipótesis

La presencia de un elevado número de macrófagos tipo 2 se relaciona con un comportamiento más agresivo de los hemangiosarcomas en la especie canina.

- Analizar la presencia de macrófagos asociados a tumores en hemangiomas cutáneos caninos mediante el empleo del anticuerpo anti-MAC387, que identifica macrófagos en general y polimorfonucleares neutrófilos, y el anticuerpo anti-CD204 para el reconocimiento de macrófagos tipo M2.
- Relacionar la presencia de los macrófagos asociados a tumores identificados mediante los anticuerpos citados con la capacidad proliferativa evaluada mediante el recuento mitótico y el índice Ki67 de estos tumores benignos.
- Evaluar la infiltración de macrófagos asociados a tumores en hemangiosarcomas cutáneos y viscerales desarrollados de forma espontánea en la especie canina, utilizando los anticuerpos anti-MAC387 y anti-CD204.
- Analizar la expresión con ambos marcadores en los macrófagos asociados a tumores en relación con las características histológicas (grado de malignidad, invasión vascular) y la proliferación celular (recuento mitótico e índice Ki67) en los hemangiosarcomas caninos.
- Comparar la expresión de ambos marcadores de macrófagos en las formas benignas y malignas de los tumores vasculares caninos.

MUESTRA DE ESTUDIO →

47 TUMORES VASCULARES

- Diferentes razas
- Edad 3-14 años

11 hemangiomas

36 hemangiosarcomas

ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO →

13 TUMORES VASCULARES

3 Hemangiomas

10 Hemangiosarcomas

Grado histológico de malignidad (Ogilvie *et al.*,1996)

Organización celular			vascular	1	intermedio	2	sólido	3
Pleomorfismo celular	ausente	0	leve	1	moderado	2	intenso	3
Recuento mitótico	(≤10)	0	11-20	1	21-30	2	>30	3
Porcentaje Necrosis	ausencia	0	25%	1	25% a 50%	2	>50%	3

Grado 1	0-5
Grado 2	6-9
Grado 3	10-12

ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

Macrófagos general



anti-MAC387



- Selección de 5 campos (señal elevada)
- Excluyendo áreas de hemorragia y necrosis

Modificado. Seung *et al.* (2018)

M2



anti-CD204



Proliferación celular

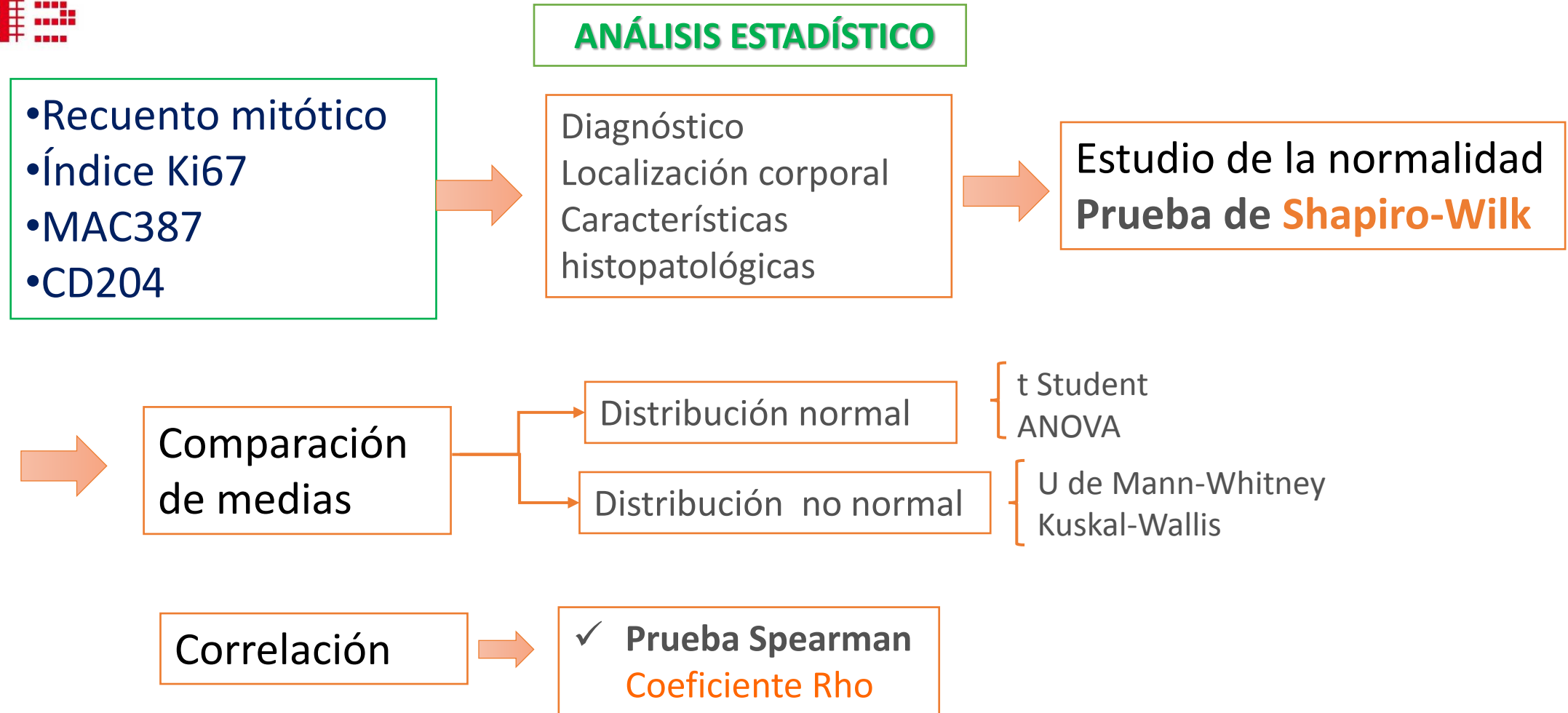


anti-Ki67



- % núcleos positivos en 1.000 células neoplásicas (áreas de mayor positividad)

Kodama *et al.* (2009)



✓ Criterio significación $P < 0,05$ y tendencia $P < 0,10$

Estudio Histopatológico

Proliferaciones benignas (hemangioma)

- *Células neoplásicas organizadas en canales vasculares*
- *Células fusiformes*
- *Escaso pleomorfismo nuclear*
- *Ausencia mitosis*

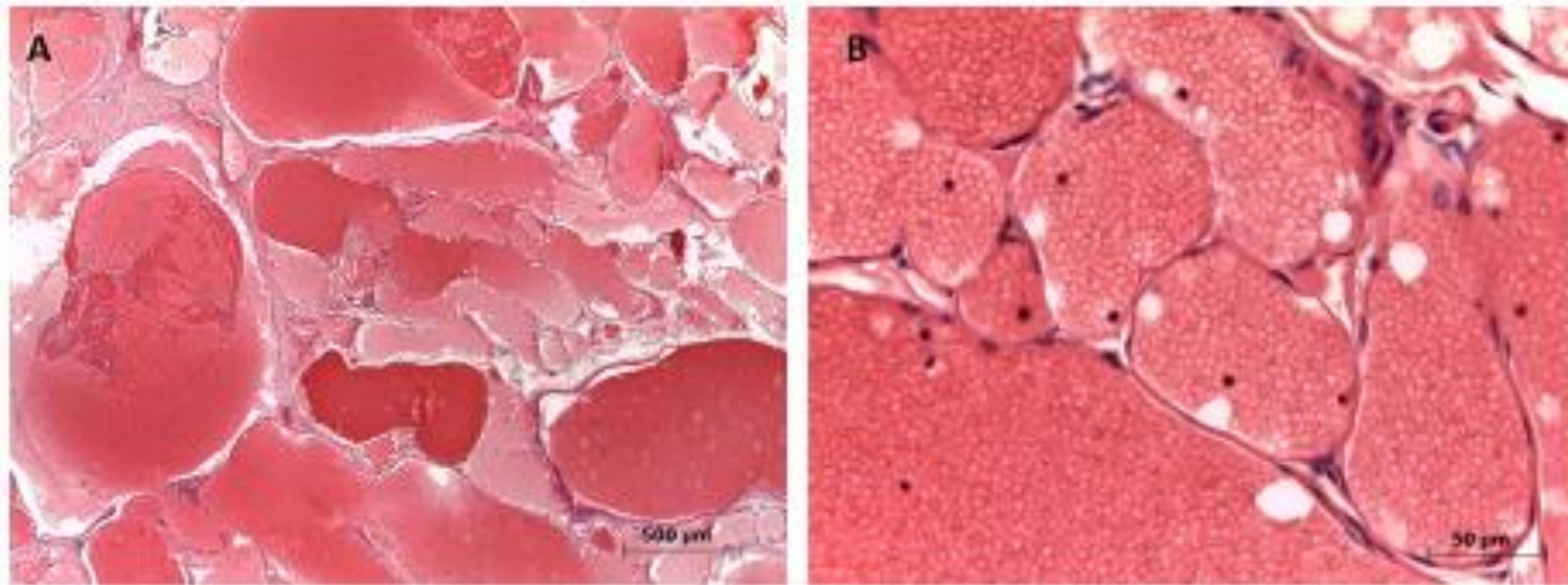


Figura 1. Hemangioma. A) Canales vasculares de diferente tamaño que contienen abundantes glóbulos rojos, con presencia ocasional de trombos. B) Detalle de las células neoplásicas que delimitan los canales vasculares. HE.

Proliferaciones malignas (Hemangiosarcoma)

- Pérdida organización celular
- Pleomorfismo moderado / intenso
- El número de mitosis osciló entre 1 y 72

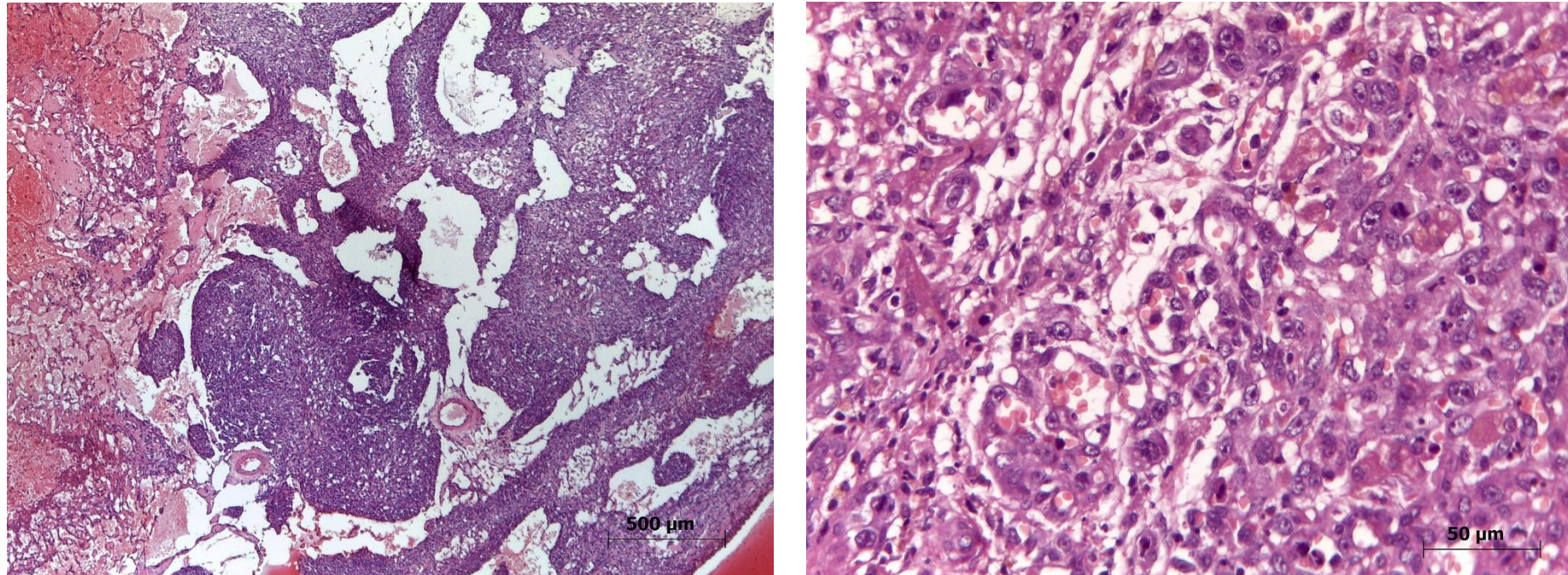


Figura 2. Hemangiosarcoma cutáneo. A) Pérdida de la organización celular. B) Detalle de las células neoplásicas con moderado pleomorfismo. Presencia de mitosis. H E.

Evaluación Actividad Proliferativa

Recuento mitótico

Parámetros	Tumores (n)	Recuento mitótico		Valor P
		Media \pm EE	Mediana (AI)	
<i>Diagnóstico</i>				
Hemangioma	11	0	0	0,000
Hemangiosarcoma cutáneo	21	19,9 \pm 4,7	10 (5,0-33,0)	
Hemangioma	11	0	0	0,011
Hemangiosarcoma cutáneo grado I	6	4,6 \pm 1,17	5 (1,7-6,7)	

Índice de proliferación Ki67 (%)

Parámetros	Tumores (n)	Índice de proliferación Ki67 (%)		Valor P
		Media ± EE	Mediana (AI)	
<i>Diagnóstico-</i>				
Hemangioma	11	1,6 ± 0,6	0,5 (0-2,9)	0,000
Hemangiosarcoma cutáneo	21	28,9 ± 3,2	25,1 (20,6-38,1)	
Hemangioma	11	1,5 ± 0,6	0,5 (0-2,9)	0,002
Hemangiosarcoma cutáneo grado I	6	27,4 ± 9,8	22,5 (13,8-37,0)	



RM e índice **Ki67** → **valor diagnóstico** entre tumor benigno o maligno.
 Descrito en angiosarcomas humanos (Shin *et al.*, 2007)
 en la especie canina (Dayananda *et al.*, 2009)

Actividad proliferativa

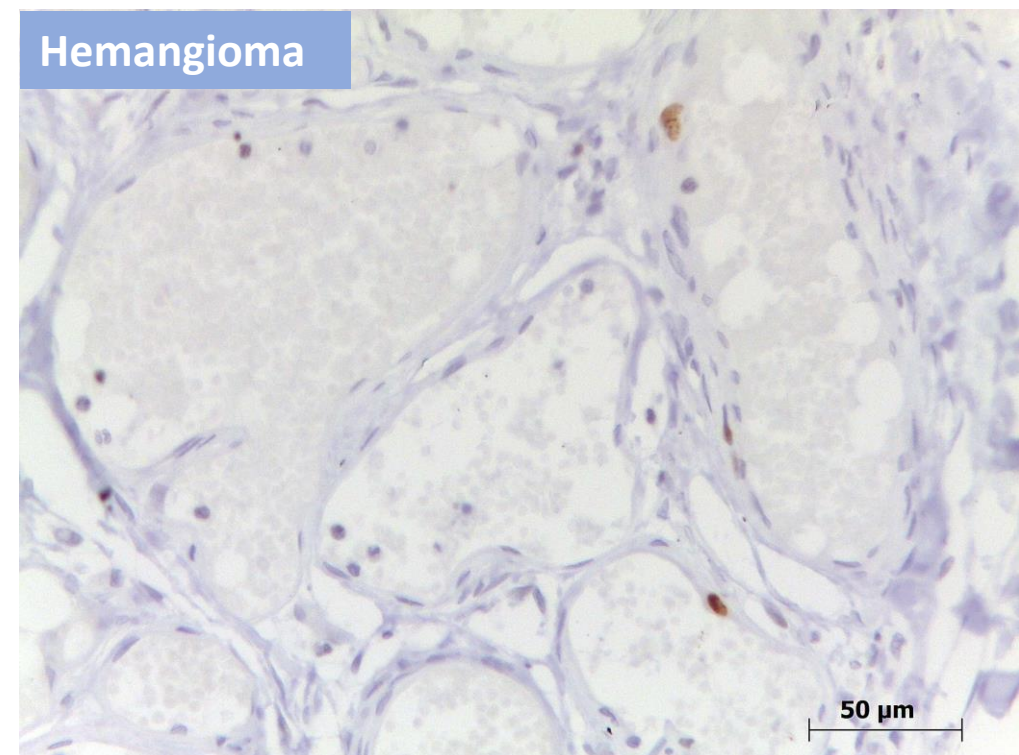
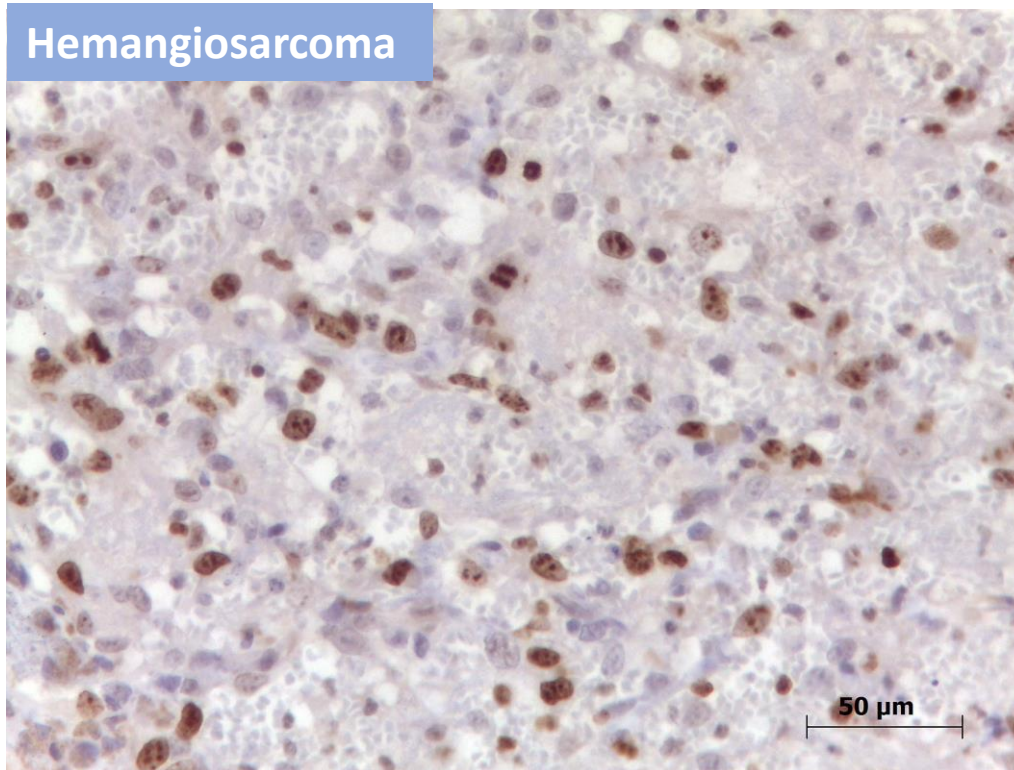


Figura 3. Hemangiosarcoma (A) y hemangioma (B) cutáneos. Se observa un mayor número de núcleos positivos al anticuerpo anti-Ki67 en la forma maligna que en la benigna en la que la señal nuclear es muy escasa. ABC-Peroxidasa

Actividad proliferativa recuento mitótico

Hemangiosarcomas cutáneos

Hemangiosarcomas viscerales

Parámetros	Tumores (n)	Recuento mitótico		Valor P
		Media ± EE	Mediana (AI)	
Hemangiosarcomas cutáneos				
<i>Localización en piel</i>				0,438
Dérmica	10	18,3 ± 7,1	7,5 (4,0-34,2)	
Subcutánea	11	21,4 ± 6,5	14 (5,0-33,0)	
<i>Grado histológico</i>				0,032
I	6	4,6 ± 1,1	5 (1,7-6,7)	
II	13	26,3 ± 6,6	19 (8,0-40,0)	
III	2	24,0 ± 14,0	24 (-)	
<i>Patrón Crecimiento</i>				0,032
Vascular	9	6,8 ± 1,4	6 (3,5-10,0)	
Intermedio	11	25,9 ± 6,4	22 (6,0-38,0)	
Sólido	1			
<i>Invasión vascular</i>				0,771
Ausente	19	21,0 ± 5,15	13 (5,0-33,0)	
Presente	2	9,5 ± 0,5	9,5 (-)	

Parámetros	Tumores (n)	Recuento mitótico		Valor P
		Media ± EE	Mediana (AI)	
Hemangiosarcomas viscerales				
<i>Grado histológico</i>				0,068
I	3	6,6 ± 1,7	6 (-)	
II	9	22,1 ± 6,0	14 (8-37,5)	
III	3	31,6 ± 5,3	37 (-)	
<i>Patrón Crecimiento</i>				0,018
Vascular	3	5,3 ± 0,6	6 (-)	
Intermedio	12	24,8 ± 4,6	20 (10,5-37,0)	
Sólido	0	-	-	
<i>Invasión vascular</i>				1,000
Ausente	13	19,3 ± 3,7	14 (8,0-36)	
Presente	2	31,5 ± 26,5	31,5 (-)	

Actividad proliferativa Ki67

Hemangiosarcomas cutáneos

Parámetros	Tumores (n)	Índice de proliferación Ki67 (%)		Valor P
		Media ± EE	Mediana (AI)	
Hemangiosarcomas cutáneos				
Localización en piel				1,000
Dérmica	10	29,8 ± 5,8	24,8 (21,7-37,9)	
Subcutánea	11	28,0 ± 3,3	27,9 (18,2-39,8)	
Grado histológico				0,323
I	6	27,4 ± 9,8	22,5 (13,8-37,0)	
II	13	28,7 ± 2,8	27,9 (20,6-38,1)	
III	2	33,9 ± 5,8	33,9 (-)	
Patrón Crecimiento				0,910
Vascular	9	29,7 ± 6,7	22,8 (19,2-40,9)	
Intermedio	11	28,1 ± 3,0	28,1 (20,0-37,7)	
Sólido	1			
Invasión vascular				0,553
Ausente	19	28,5 ± 3,4	25,1 (20,0-37,7)	
Presente	2	32,2 ± 7,6	32,2 (-)	

Hemangiosarcomas viscerales

Parámetros	Tumores (n)	Índice de proliferación Ki67 (%)		Valor P
		Media ± EE	Mediana (AI)	
Hemangiosarcomas viscerales				
Grado histológico				0,351
I	3	13,3 ± 4,5	12,8 (-)	
II	9	23,0 ± 6,0	20,5 (5,5-40,4)	
III	3	33,2 ± 7,9	28,8 (-)	
Patrón Crecimiento				0,737
Vascular	3	26,1 ± 13,3	21,3 (-)	
Intermedio	12	22,3 ± 4,4	21,3 (8,1-30,5)	
Sólido	0			
Invasión vascular				0,337
Ausente	13	24,7 ± 4,6	22,2 (9,7-39,9)	
Presente	2	12,4 ± 8,1	12,3 (-)	



Macrófagos positivos MAC387

Parámetros	Tumores (n)	Macrófagos positivos MAC387 (%)		Valor P
		Media \pm EE	Mediana (AI)	
<i>Diagnóstico</i>				
Hemangioma	9	6,1 \pm 0,8	5,4 (4,0-8,4)	0,160
Hemangiosarcoma cutáneo	21	7,9 \pm 0,8	7 (5,3-10,3)	
Hemangioma	9	6,1 \pm 0,8	0,5 (0-2,9)	1,000
Hemangiosarcoma cutáneo grado I	6	6,2 \pm 1,2	5,3 (4,4-7,5)	
Hemangiosarcoma cutáneo	21	7,9 \pm 0,8	7,0 (5,3-10,3)	0,006
Hemangiosarcoma visceral	14	12,0 \pm 1,0	11,2 (9,3-16,6)	

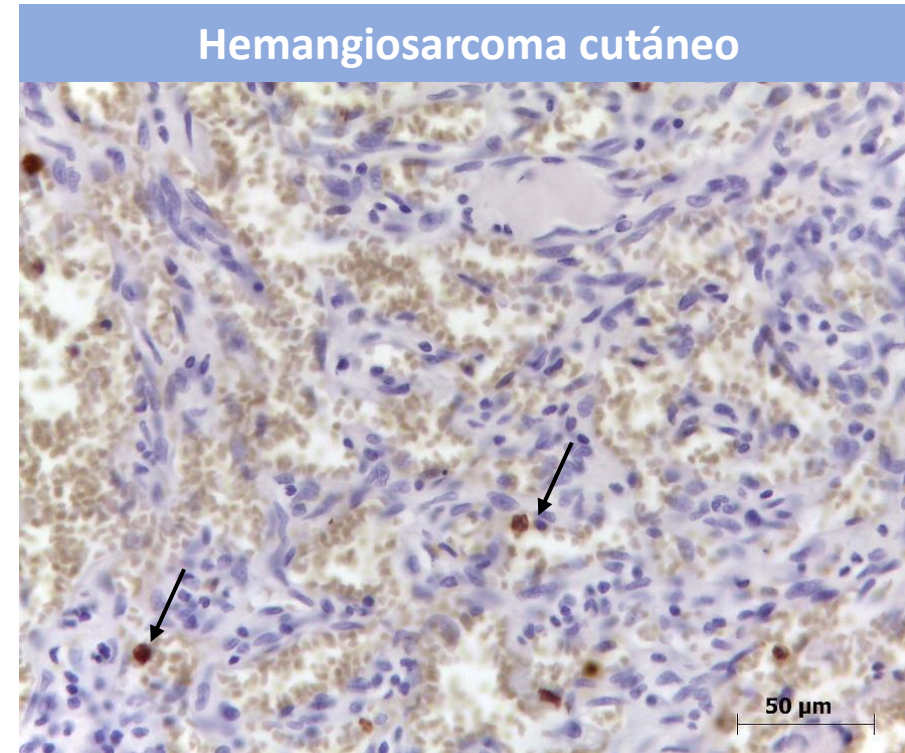
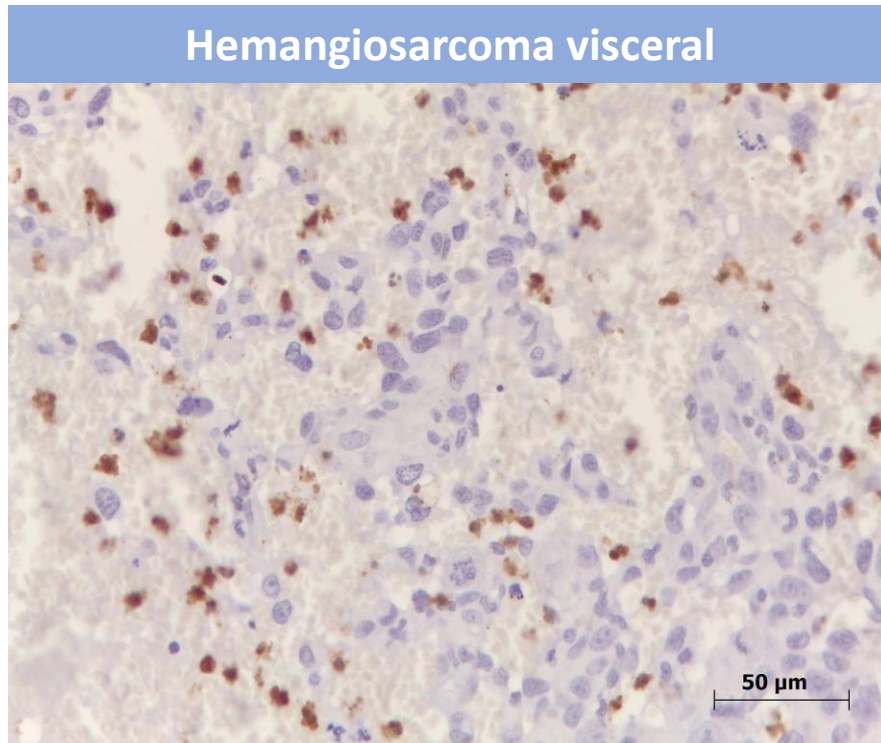


Figura 5. A) **Hemangiosarcoma visceral.** Presencia de elevado número de células MAC387 positivas. B) **Hemangiosarcoma cutáneo.** Se observa un menor número de células MAC387 positivas que el identificado en los HASs viscerales. ABC-Peroxidasa.



Incremento macrófagos → comportamiento más agresivo que se atribuye aparecen vísceras. Células juegan papel importante desarrollo neoplasias caninas (Raposo *et al.*, 2014)

Macrófagos positivos MAC387

Hemangiosarcomas cutáneos

Parámetros	Tumores (n)	Macrófagos positivos MAC387 (%)		Valor P
		Media ± EE	Mediana (AI)	
Hemangiosarcomas cutáneos				
<i>Localización en piel</i>				
Dérmica	10	9 ± 1,4	7,5 (5,8-12)	0,181
Subcutánea	11	6,8 ± 0,8	5,6 (4,2-10,2)	
<i>Grado histológico</i>				
I	6	6,2 ± 1,2	5,3 (4,4-7,5)	0,258
II	13	8,5 ± 1,1	7,8 (5,6-10,3)	
III	2	9,2 ± 2,8	9,2 (-)	
<i>Patrón Crecimiento</i>				
Vascular	9	6,6 ± 1,0	5,4 (4,4-8,9)	0,197
Intermedio	11	9,2 ± 1,2	9,2 (7,0-10,4)	
Sólido	1	0	0	
<i>Invasión vascular</i>				
Ausente	19	8,1 ± 0,9	7,2 (5,2-10,4)	0,771
Presente	2	6,2 ± 0,2	6,2 (-)	

Hemangiosarcomas viscerales

Parámetros	Tumores (n)	Macrófagos positivos MAC387 (%)		Valor P
		Media ± EE	Mediana (AI)	
Hemangiosarcomas viscerales				
<i>Grado histológico</i>				
I	3	14,2 ± 2,8	16,6 (-)	0,119
II	8	10,1 ± 1,2	10,2 (7,2-11,2)	
III	3	14,9 ± 1,5	14,8 (-)	
<i>Patrón Crecimiento</i>				
Vascular	3	12,1 ± 2,4	11,2 (-)	0,957
Intermedio	11	11,9 ± 1,3	11,2 (9,6-16,8)	
Sólido	0	0	0	
<i>Invasión vascular</i>				
Ausente	12	12,7 ± 1,1	11,8 (9,6-16,7)	0,160
Presente	2	8,2 ± 3,0	8,12 (-)	

Expresión de MAC387 en hemangiosarcomas no relación con grado histológico:

- Similar a mastocitomas caninos (Beekman, 2017) y en tumores mamarios caninos (Raposo *et al.*, 2014)

Anticuerpo marca otros tipos celulares

Macrófagos positivos CD204 (M2)

Parámetros	Tumores (n)	Macrófagos positivos CD204 (%)		Valor P
		Media \pm EE	Mediana (AI)	
Diagnóstico				
Hemangioma	11	8,6 \pm 0,4	9,0 (8,0-9,8)	0,000
Hemangiosarcoma cutáneo	21	15,9 \pm 1,0	15,4 (11,3-20,0)	
Hemangioma	11	8,5 \pm 0,4	9,0 (8,0-9,8)	0,003
Hemangiosarcoma cutáneo grado I	6	18,0 \pm 1,8	19,2 (12,8-21,4)	

Puede ser útil desde el punto de vista diagnóstico y pronóstico en las fases iniciales

Estos resultados coinciden con lo descrito por Seung *et al.* (2018) que se demostró que la presencia de CD204 fue mayor en los tumores mamarios malignos que en los benignos.

Difieren de lo observado en distintos tipos de tumores en humana en los que se ha comprobado una relación entre el número de M2 y el grado histológico (Herrera *et al.*, 2013; Ichimura *et al.*, 2014)

Macrófagos positivos CD204 (M2)

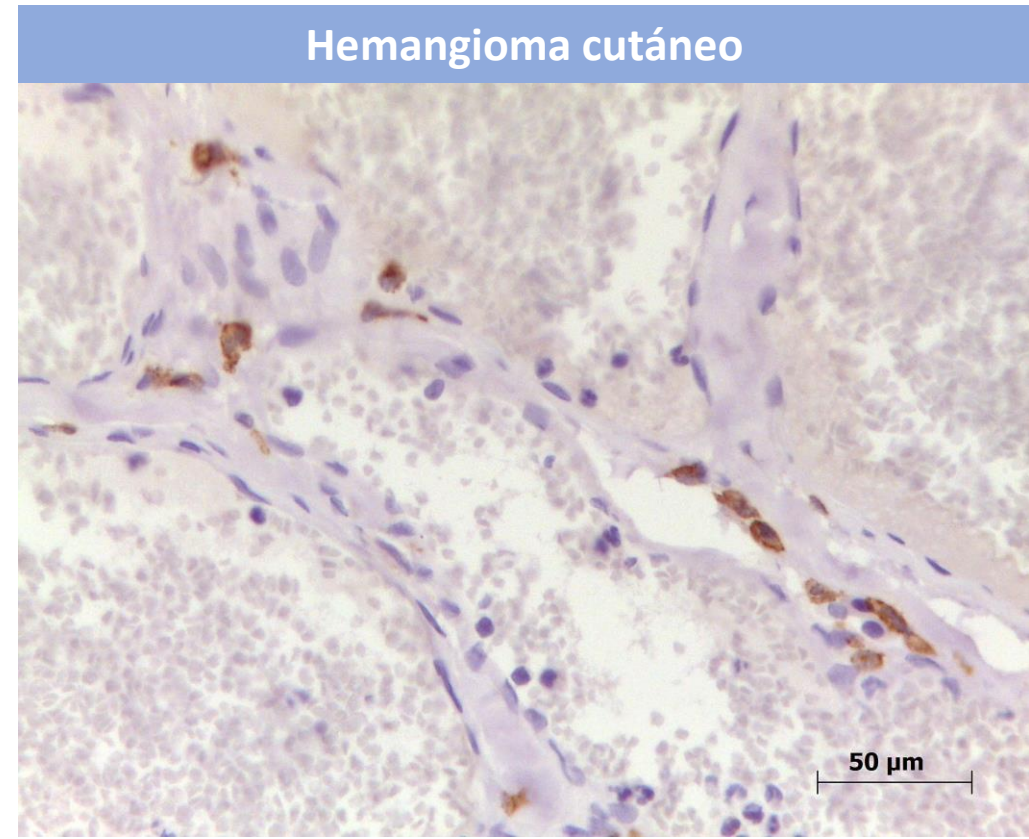
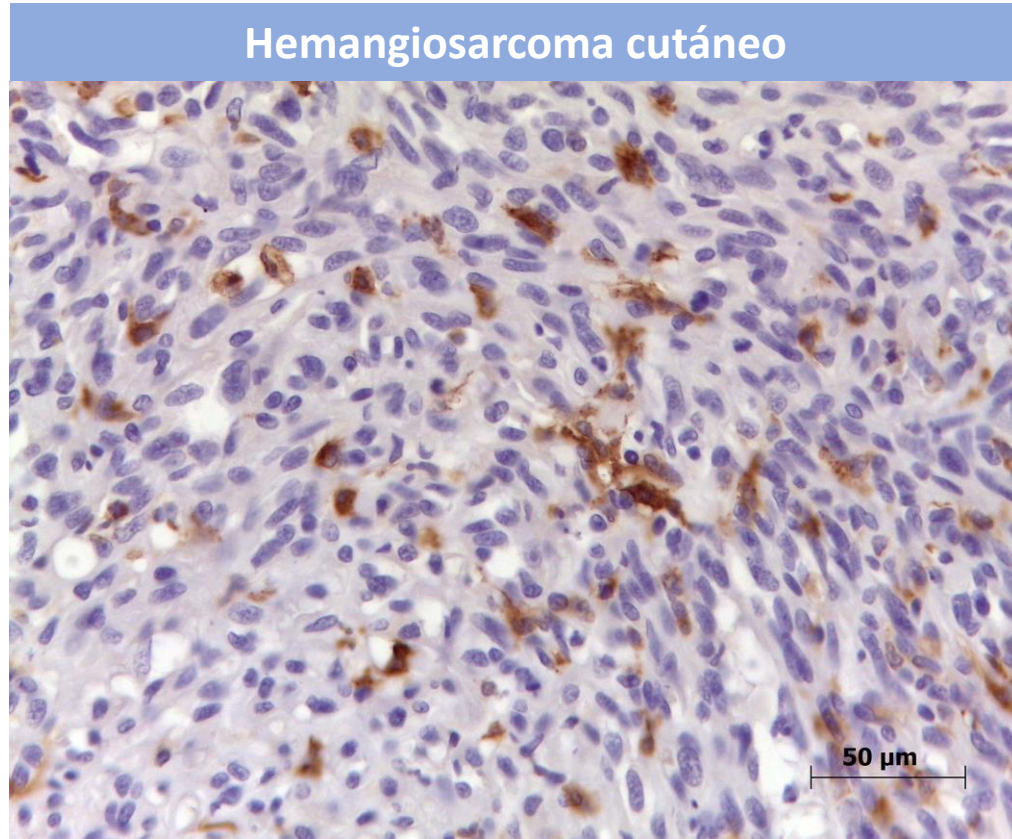


Figura 6. Hemangiosarcoma cutáneo. A) Presencia de numerosas células CD204 positivas. B) **Hemangioma cutáneo.** Escaso número de células CD204 positivas. ABC-Peroxidasa.

MAC387 (M1 y M2) - CD204 (M2)

Parámetros	Tumores (n)	Macrófagos positivos MAC387 (%)		Valor P	Parámetros	Tumores (n)	Macrófagos positivos CD204 (%)		Valor P
		Media ± EE	Mediana (AI)				Media ± EE	Mediana (AI)	
Diagnóstico^a					Diagnóstico^a				
Hemangioma	9	6,1 ± 0,8	5,4 (4,0-8,4)	0,160	Hemangioma	11	8,6 ± 0,4	9,0 (8,0-9,8)	0,000
Hemangiosarcoma cutáneo	21	7,9 ± 0,8	7 (5,3-10,3)		Hemangiosarcoma cutáneo	21	15,9 ± 1,0	15,4 (11,3-20,0)	
Hemangioma	9	6,1 ± 0,8	0,5 (0-2,9)	1,000	Hemangioma	11	8,5 ± 0,4	9,0 (8,0-9,8)	0,003
Hemangiosarcoma cutáneo grado I	6	6,2 ± 1,2	5,3 (4,4-7,5)		Hemangiosarcoma cutáneo grado I	6	18,0 ± 1,8	19,2 (12,8-21,4)	
Hemangiosarcoma cutáneo	21	7,9 ± 0,8	7,0 (5,3-10,3)	0,006	Hemangiosarcoma cutáneo	21	15,9 ± 1,0	15,4 (11,3-20,0)	0,752
Hemangiosarcoma visceral	14	12,0 ± 1,0	11,2 (9,3-16,6)		Hemangiosarcoma visceral	14	17,5 ± 2,1	17,2 (10,8-21,9)	



Problema en el reconocimiento celular de MAC387 mediante la técnica IHQ

A pesar de ser el anticuerpo MAC387 habitualmente utilizado en veterinaria en otros estudios como carcinomas nasales (Vanherberghen *et al.*, 2009) y tumores de mama Raposo *et al.*, 2014); consideramos más adecuado empleo de marcadores específicos en tumores vasculares.

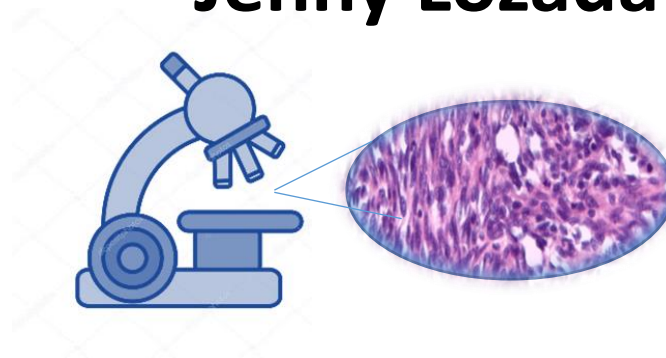
- Existe una polarización de los macrófagos hacia las formas protumorales en los tumores malignos originados a partir de la proliferación de células endoteliales en la especie canina, cuyo papel es preciso concretar.
- La proliferación celular evaluada mediante el RM y el índice Ki67 así como la expresión del anticuerpo anti-CD204 parecen tener un valor diagnóstico al diferenciar las formas benignas de las malignas de grado 1 en los tumores vasculares caninos.
- El marcador general de macrófagos MAC387 parece dar problemas en la valoración de macrófagos al marcar otros tipos celulares, por lo que su utilidad en los estudios sobre tumores es cuestionable y se tiene que evaluar.



EVALUACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE MACRÓFAGOS ASOCIADOS A HEMANGIOSARCOMAS CANINOS

Presentado por:

Jenny Lozada



Coautores:

PhD. María José García

PhD. Claudia Pérez Martínez

Latacunga, octubre 2019