



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación de la expresión de E- Cadherina y la densidad microvascular en tumores mamarios caninos y su relación con el grado de malignidad

Juan Sebastián Suescún Bolívar

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
Bogotá D.C, Colombia, 2025

Evaluación de la expresión de E-Cadherina y la densidad microvascular en tumores mamarios caninos y su relación con el grado de malignidad

Juan Sebastián Suescún Bolívar

Trabajo final presentado como requisito parcial para optar al título de:
Especialista en Anatomopatología Veterinaria

Director:

PhD. Luis Mauricio Montoya Flórez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
Bogotá D.C., Colombia

2025

Dedicatoria

A mis padres

Carlos y María Alejandra

A mi hermano

Nicolas

A mis amigos

*Ángela María, Sazi, Daniel, Dayana,
Sebastián, Ronaldo, Santiago*

Agradecimientos

- Al Laboratorio de Patología Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia.
- Al Dr. Luis Mauricio Montoya Flórez. Director del trabajo.
- A la Universidad de los Llanos, por su colaboración.
- A la Dr. Paula Esquinas, el Dr. Benjamín Doncel, a la Dra. Lucía Botero, por sus enseñanzas y apoyo.
- A Leonardo Bernal y Gilberto Córdoba, por su asistencia técnica.
- A Ángela María Rodríguez Rodríguez, por su apoyo y compañía incondicional.
- A Sazi Camacho, Daniel Gordillo, Sebastián Ruíz, Ronaldo Alfaro, Dayana Betancourt, por su apoyo incondicional

Resumen

Evaluación de la expresión de E-Cadherina y densidad microvascular en tumores mamarios caninos y su relación con el grado de malignidad

El objetivo de este estudio fue evaluar la densidad microvascular como medida de angiogénesis y la expresión de E-cadherina en tumores mamarios caninos, estableciendo la relación de estos parámetros con criterios de malignidad; para esto, fueron evaluados 30 tumores mamarios correspondientes a hiperplasias, adenomas y carcinomas pertenecientes a casos del archivo del Laboratorio de Patología Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia que fueron analizados entre los años 2019 y 2023. Para cada uno de los casos seleccionados se tuvieron en cuenta variables como edad, estado reproductivo, tipo de neoplasia y grado de malignidad, entre otros. Todas las muestras fueron sometidas a clasificación y grado histológico, técnicas de inmunohistoquímica con los anticuerpos CD31 y E-cadherina y medición de microvasculatura; para el análisis estadístico se emplearon técnicas uni y bivariados con niveles de significancia ($p < 0,05$). No hubo asociación estadística entre las variables de estudio y la densidad microvascular, sin embargo, fue posible establecer una asociación significativa entre el tipo de neoplasia y la expresión de E-cadherina, se identificó que tumores malignos tenían una reducción general de la expresión membranosa de E-cadherina en comparación con las lesiones benignas (hiperplasia y adenoma), además, se logró establecer la asociación entre una mayor marcación intracelular de E-cadherina con tumores malignos; estos resultados permiten inferir que los tumores mamarios malignos, efectivamente, sufren una alteración en su expresión de E-cadherina llevando a que adquieran características de malignidad. Este estudio resalta la importancia evaluar diferentes marcadores con valor diagnóstico y pronóstico en futuros estudios con el fin de profundizar en el entendimiento del microambiente tumoral.

Palabras clave: E-cadherina, Densidad microvascular, Tumor mamario canino.

Abstract

Evaluation of E-Cadherin expression and microvascular density in canine mammary tumors and their relationship with the degree of malignancy.

The aim of this study was to evaluate microvascular density as a measure of angiogenesis and the expression of E-cadherin in canine mammary tumors, establishing the relationship of these parameters with malignancy criteria. To do this, 30 mammary tumors, including hyperplasias, adenomas, and carcinomas, were evaluated. These cases came from the archives of the Veterinary Pathology Laboratory at the National University of Colombia that were analyzed between 2019 and 2023. For each selected case, different variables such as age, reproductive status, type of neoplasia, and degree of malignancy, among others, were considered. All samples underwent histological classification and grading, immunohistochemical techniques using CD31 and E-cadherin antibodies, and microvasculature measurement. For statistical analysis, univariate and bivariate techniques were used, with significance levels set at ($p < 0.05$). No statistical association was found between the study variables and microvascular density. However, a significant association was established between the type of neoplasia and E-cadherin expression. It was identified that malignant tumors had a general reduction in membranous E-cadherin expression compared to benign lesions (hyperplasia and adenoma). Additionally, a higher intracellular expression of E-cadherin was associated with malignant tumors. These results suggest that malignant mammary tumors do, in fact, undergo an alteration in E-cadherin expression, leading to the acquisition of malignant characteristics. This study highlights the importance of evaluating different markers with diagnostic and prognostic value in future research in order to deepen the understanding of the tumor microenvironment

Keywords: E-Cadherin, Microvascular density, Canine mammary tumor.

Contenido

	Pág.
1. Lista de figuras	5
2. Lista de tablas	6
3. Introducción	7
4. Materiales y métodos	12
4.1 Selección de casos:.....	12
4.2 Datos/Información:.....	12
4.3 Histopatología:.....	12
4.4 Clasificación y grado histológico:.....	12
4.5 Inmunohistoquímica:.....	15
4.6 Evaluación de microvasculatura:	15
4.7 Evaluación de E-cadherina:.....	16
4.8 Análisis estadístico:	16
5. Resultados.....	17
5.1 Caracterización de la población.....	17
5.2 Angiogénesis	20
5.3 Expresión de E-cadherina:	21
6. Discusión.....	24
7. Conclusión	27
8. Referencias.....	28

1. Lista de figuras

	Pág.
Figura 1: Adenoma mamario. Marcación de endotelio vascular de CD31. 100x....	20
Figura 2: Adenoma mamario. Marcación positiva de endotelio vascular de CD31. 400x.....	21
Figura 3: Asociación entre mediana de marcación citoplasmática de E-cadherina y Tipo de neoplasia.....	22
Figura 4: Marcación intracitoplasmática en carcinoma mamario simple grado 3 (patrón sólido). 400x.....	22
Figura 5: Relación entre mediana de marcación total de E-cadherina y el tipo de neoplasia.....	23
Figura 6: Marcación membranosa de E-cadherina en hiperplasia mamaria lobular. 400x.....	23

2. Lista de tablas

	Pag.
Tabla 1: Grado histológico de neoplasias mamarias caninas (Peña et al., 2013).....	13
Tabla 2: Anticuerpos primarios utilizados en prueba de inmunohistoquímica para la marcación de CD31 (endotelio) y E-cadherina (epitelio).....	15
Tabla 3: Caracterización epidemiológica de las 30 masa evaluadas.....	17

3.Introducción

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, únicamente se encuentra por debajo de las enfermedades cardiovasculares (Bray et al., 2018) y se espera que el número de casos y muertes por la enfermedad crezca rápidamente conforme la población también lo haga; en este mismo sentido, las neoplasias de glándula mamaria son el tercer tumor más frecuente en mujeres y en las hembras caninas sin esterilizar y la principal causa de muerte o eutanasia (Dobson et al., 2002); en el contexto mundial y latinoamericano, el cáncer de mama se considera como la neoplasia maligna más comúnmente diagnosticada en hembras caninas (Cassali, 2013; Aupperle-Lellbach et al., 2022; Esteves et al., 2022) y este aparece en mayor medida en hembras de edades entre los 6 y 12 años (Pastor et al., 2018; Salas et al., 2015; Zheng et al., 2022), no esterilizadas (Salas et al., 2015; Zheng et al., 2022), mestizas y de talla grande (Pastor et al., 2018), a pesar de que puede aparecer en algunas razas puras (Salas et al., 2015; Zheng et al., 2022) y tallas pequeñas (Salas et al., 2015), mostrando algunas diferencias y/o contradicciones dependiendo la región geográfica y prácticas veterinarias (e.g. esterilizaciones) realizadas en las diversas poblaciones. En otros países como Reino Unido, la frecuencia de presentación de tumor mamario canino está cerca de 1948 perros por cada 100 000 (Dobson et al., 2002), de igual manera, se resalta que, en Estados Unidos de América, 30% de muertes se producen en perros mayores a un año como consecuencia de esta neoplasia (Fleming et al., 2011), debido a esta alarmante casuística y a la importancia e incluso como modelos comparativos, el estudio e investigación en esta área cada vez es mayor, en la actualidad junto al profundo conocimiento de las etapas de carcinogénesis, se requiere el asocio de aspectos epidemiológicos que involucran raza, sexo, edad, etc. (Dhein et al., 2024; Esteves et al., 2022), inmunológicos y moleculares cada vez más avanzados (Sassi et al., 2010).

Es importante entender que la glándula mamaria es una glándula apocrina modificada presente en mamíferos exclusivamente, esta se deriva embriológicamente del ectodermo y mesodermo y está conformada por un componente epitelial, fibrovascular y estroma de soporte (Liebich, 2019; Pawlina & Ross, 2020; Sorenmo et al., 2011). La mayoría de caninos poseen 5 pares de glándulas mamarias, distribuidas en línea mamaria izquierda y derecha (2 glándulas torácicas, 2 abdominales y 1 inguinal), histológicamente, cada glándula mamaria se organiza en lóbulos compuestos por unidades secretoras (alveolos) que se encuentran conectadas a una porción excretora (conductos); además, la glándula mamaria sufre diversos cambios morfofisiológicos a lo largo de la vida de acuerdo a la edad y en respuesta a diversos estímulos hormonales (Sorenmo et al., 2011). Además, debido a que algunos tumores mamarios tienen tendencia a generar metástasis, es importante conocer el drenaje linfático de la glándula mamaria y ganglios linfáticos satélite, puesto que estos suelen ser los primeros tejidos en los que se evidencia la metástasis y son útiles como órganos centinelas (Sorenmo et al., 2011).

En los tumores mamarios caninos, así como en los tumores mamarios en humanos, existen sistemas de graduación de malignidad, los que tienen como fin intentar dar un pronóstico y entender el comportamiento biológico de los mismos; en el caso de medicina veterinaria, existen varias propuestas, sin embargo, los sistemas de clasificación y graduación más ampliamente utilizados son los descritos por Goldschmidt et al. (2011) y Peña et al. (2013), donde se establecen 3 criterios a evaluar: porcentaje de formación de túbulos, pleomorfismo nuclear y conteo mitótico en 10 campos de alto poder (HPF). Al sumar puntaje de cada uno de los criterios, se consigue graduar del 1 a 3 los tumores mamarios malignos en caninos. En esta especie, este sistema ha mostrado correlación de su grado de malignidad con recidivas, metástasis y muertes relacionadas a las neoplasias, siendo el grado 3 el que posee un peor pronóstico de supervivencia (Peña et al., 2013).

Para complementar la estadificación, proveer mayor información, una mejor y mayor aproximación al diagnóstico/pronóstico, es necesaria la implementación de biomarcadores inmunohistoquímicos en estos tumores; a pesar de su amplio y común uso en medicina humana, en veterinaria es aún incipiente, en este sentido, en los últimos años, se han visto avances en estas técnicas como lo mostrado en los trabajos de Peña et al., 2014 y de Nosalova et al., 2024, en el que se hace una revisión de algunos marcadores usados en tumores mamarios humanos como receptores hormonales (receptor de estrógenos y

progesterona), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano, marcadores de proliferación celular, expresión de la proteína p53, entre otros.

La evaluación de inmunomarcadores se puede hacer mediante técnicas de inmunohistoquímica, y son utilizadas para confirmar el origen del tumor, distinguir metástasis de lesiones primarias, definir subtipos y obtener más información con valor diagnóstico/pronóstico (Zaha, 2014). En el caso de tumores mamarios, en humanos, son de uso común marcadores como mammaglobina (para confirmar origen mamario), HER2 y Receptores hormonales (valor pronóstico y respuesta al tratamiento) o E-cadherina (diferenciación entre carcinomas ductales de lobulares) (Bonacho et al., 2019). En veterinaria, pese a que la evaluación de inmunomarcadores con valor pronóstico se realiza con menor frecuencia, los marcadores más utilizados con este fin son Ki-67, Receptor del Factor de Crecimiento Endotelial, HER-2, Receptores hormonales y COX-2; en el caso de la evaluación de E-Cadherina se reconoce su potencial como marcador en relación con el alto grado de malignidad tumoral y tendencia a hacer metástasis (Kaszak et al., 2018).

La E-Cadherina es una glicoproteína de membrana dependiente de calcio perteneciente a la familia de las Cadherinas, su función se asocia a la morfogénesis de órganos y a la unión entre células, esta unión se da a través del complejo E-Cadherina/B-Catenina/E-catenina (CCC), que favorecerá la unión intercelular a través de su dominio extracelular y la unión con el citoesqueleto de actina en su dominio intracelular (Knudsen & Wheelock, 2005; van Roy & Berx, 2008). En el caso específico de la E-cadherina, esta es considerada una proteína de unión intercelular específica de los epitelios, dado que una amplia variedad de tumores en humanos y veterinaria son de origen epitelial, este marcador ha despertado mucho interés en cuanto a su papel en la carcinogénesis (Kaszak et al., 2018; Matos et al., 2006), así mismo, se plantea su participación como proteína supresora tumoral al demostrarse que la activación de la E-cadherina en algunos tumores puede disminuir la extravasación de células neoplásicas, así como favorecer la apoptosis celular (Na et al., 2020).

La disminución de su expresión está asociada a transición epitelial-mesenquimal (EMT), característica que suele asociarse con invasión tisular y metástasis, permitiendo que las células neoplásicas se desasocien entre sí e invadan tejidos adyacentes, sin embargo, se han visto que algunas neoplasias con metástasis aún conservan su expresión de E-cadherina, lo cual también supone un papel a favor de la metástasis (Na et al., 2020).

Además de la evaluación de marcadores como la E-cadherina, también se pueden evaluar otros factores que pueden influir en el medio intratumoral afectando el comportamiento biológico de los tumores, uno de estos factores es el relacionado con la vasculatura intratumoral (microvasculatura y angiogénesis); una de las formas de evaluar esta angiogénesis es mediante la medición de la densidad microvascular (MVD) como la descrita por Weidner et al., 1991, además, se han encontrado resultados variables con respecto al grado de malignidad en tumores y pronóstico (dos Anjos et al., 2019; Franco et al., 2023; Sakalauskaitė et al., 2022) relacionados con la microvasculatura y angiogénesis. La angiogénesis puede ser definida como la formación de nuevos vasos sanguíneos derivados de vasos pre-existentes (Ackerman, 2017), este proceso puede ser consecuencia de un evento reparativo como se ve en la neovascularización de algunos tejidos en reparación (tejido de granulación), sin embargo, esta también puede ser estimulada por algunos procesos tumorales, este último ocurre con el objetivo de suministrar la mayor cantidad de oxígeno y nutrientes a las células neoplásicas (Lugano et al., 2020) y se produce mediante múltiples mecanismos inducidos por el tumor, entre los que se destacan la regulación de algunos factores angiogénicos (ej. VEGF y FGF) y factores antiangiogénicos (ej. Disminución de la producción de trombospondina) (Newkirk et al., 2017), sin embargo, se han logrado establecer muchos otros mecanismos de angiogénesis tumoral. Además del importante papel que cumple la angiogénesis en el crecimiento tumoral, también es de vital importancia para la presentación de metástasis en los procesos neoplásicos (Newkirk et al., 2017).

La evaluación de la angiogénesis y MVD ha sido objeto de estudio en múltiples tumores en medicina humana, en el caso de tumores mamarios, se evidenció una relación de la MVD con pronóstico y tiempo de supervivencia en mujeres con tumores mamarios de diversos grados de malignidad (Krabby et al., 2019; Krishnapriya et al., 2019; Uzzan et al., 2004). Así mismo, en medicina veterinaria existen reportes y estudios sobre densidad vascular (VD) en tumores mamarios, en los que también se evidencia relación de la densidad vascular con el pronóstico, presentación de metástasis y tiempo de supervivencia (Sakalauskaitė et al., 2022).

De acuerdo con lo expuesto, el fin de este estudio fue de evaluar la expresión de E-Cadherina y medición de angiogénesis correlacionándolos con los grados de malignidad y presencia/ausencia de metástasis en tumores mamarios caninos que fueron remitidos al

Evaluación de la expresión de E-Cadherina y la densidad microvascular en tumores mamarios caninos y su relación con el grado de malignidad

Laboratorio de Patología de Mamíferos de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia, para diagnóstico histopatológico.

4. Materiales y métodos

4.1 Selección de casos:

Se utilizaron casos que estaban en el archivo de diagnóstico del Laboratorio de Patología de Mamíferos de Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá; fueron seleccionadas 30 lesiones tumorales (benignas y malignas), que ingresaron a la rutina diagnóstica entre los años 2019 y 2023, como criterio de inclusión se consideraron que cada uno de los casos hubiese sido remitido con ganglio linfático regional para la evaluación de metástasis, adicionalmente, en cuanto a los tumores malignos (carcinomas), solo fueron incluidos los tumores simples, es decir, solo mamas con un tipo de proliferación maligna del componente epitelial.

4.2 Datos/Información:

De cada uno de los casos, se registraron los siguientes datos: especie, raza, sexo, edad, estado reproductivo, ubicación y tamaño de la masa, evidencia de posible macrometástasis por medio de otras pruebas diagnósticas (radiografía/ultrasonografía).

4.3 Histopatología:

Las láminas provenientes del archivo fueron reevaluadas en microscópico óptico (Olimpus) con el fin de emitir un diagnóstico morfológico y grado de neoplasia (en caso de aplicar) y evaluar los ganglios linfáticos, además de los grados y diagnóstico del tumor, se tuvieron en cuenta factores como necrosis, inflamación y ulceración, a las cuales les fue atribuida un número según el grado de severidad (0 – 3).

4.4 Clasificación y grado histológico:

Para la clasificación y grado histológico se utilizó la establecida por Goldschmidt et al., 2011 y Peña et al., 2013, resumida en la tabla 1.

Tabla 1: Grado histológico de neoplasias mamarias caninas (Peña et al., 2013).

Criterios de malignidad en tumores mamarios de caninos		
Criterio	Puntuación	Descripción
A. Formación tubular	1	Formación de túbulos en >75%
	2	Formación de túbulos en 10-75% (moderada formación de tubular mezclada con áreas sólidas)
	3	Formación de túbulos en (<10%) (mínima o sin formación tubular)
B. Pleomorfismo nuclear	1	Núcleo uniforme o regular, y ocasionalmente nucléolo
	2	Variación moderada del tamaño y forma nuclear, núcleo hipercromático, presencia de nucléolo (algunos de los cuales pueden ser prominentes).
	3	Variación marcada del tamaño, núcleo hipercromático, a menudo con uno o dos nucléolos prominentes.
C. Mitosis por 10 campos de alta potencia)	1	0-9 mitosis/10 campos de alta potencia
	2	10-19 mitosis/10 campos de alta potencia

Evaluación de la expresión de E-Cadherina y la densidad microvascular en tumores mamarios caninos y su relación con el grado de malignidad

o (magnificación de 400x).	3	≥20 mitosis/10 campos de alta potencia
Grado histológico de malignidad		
Puntaje total		Grado de malignidad
3-5		I (Bajo grado)
6-7		II (Intermedio grado)
8-9		III (Alto grado)

4.5 Inmunohistoquímica:

La técnica inmunohistoquímica fue realizada por laboratorios externos (Laboratorio particular Inmunotech.), como anticuerpos primarios se utilizaron: Anti E-cadherina y Anti CD31; resumidos en la Tabla 2.

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados en prueba de inmunohistoquímica para la marcación de CD31 (endotelio) y E-cadherina (epitelio).

Anticuerpo	Clon	Dilución
Anti- CD31	PECAM-1	1:200
Anti-E-cadherina	M168	1:100

4.6 Evaluación de microvasculatura:

En cada uno de los casos fueron evaluadas las siguientes variables: densidad de microvasculatura tumoral (DMT), Calibre vascular (CV) y Perímetro total de la microvasculatura tumoral (PTMT). Para las mediciones se utilizó el Software de libre acceso *QuPath*; inicialmente se detectaron los “hot spots” en cada uno de los casos (en 4x y 10x se detectaron los focos con mayor presencia de vasos sanguíneos), posteriormente se registraron 5 fotomicrografías equivalentes a 5 campos de 40x (1mm²), posteriormente en el programa *QuPath*, se contaron el total de vasos por campo de cada caso.

Los criterios de inclusión fueron, los campos a evaluar debían tener vasos completos, vasos con marcación positiva al marcador CD31, aquellos que morfológicamente eran compatibles con vasos sanguíneos, pese a su positividad leve o negativa al marcador CD31; en el caso de vasos cortados en dos segmentos se tomaron como vasos sanguíneos distintos.

Densidad microvascular tumoral (DMT): la DMT se realizó mediante la evaluación de 5 campos de alta potencia (40x) aleatorios no superpuestos y mediante un conteo total de los vasos dividido en el número de campos evaluados (número de vasos/campo de 400x). Calibre vascular (CV): el CV fue medido de acuerdo con lo estipulado por Milosevic et al., (2023), en el que se consideró como medida el diámetro de Feret, esto con el fin de disminuir el artefacto de cortes no tangenciales de los vasos sanguíneos. Perímetro total de la microvasculatura tumoral (PTMT): el PTMT fue calculado con la suma del perímetro de los vasos sanguíneos en los 5 campos de alta potencia (40x).

4.7 Evaluación de E-cadherina:

Por cada caso fueron registradas 10 microfotografías de 10 campos de alto poder (40x) aleatorios y no superpuestos, cada una de las imágenes fue procesada a través del Software de acceso libre *ImageJ* para el conteo de células con marcación membranosa positiva (definidas como una marcación parda bien definida que delimitaba el contorno celular), células con marcación citoplasmática positiva (definidas como marcación granular fina a gruesa dentro del citoplasma de las células neoplásicas) y células con marcación negativa, dando como resultado un porcentaje de células positivas (marcación membranosa y citoplasmática) y negativas. Como control positivo se utilizó la piel y glándula mamaria tomada de una perra sin lesiones mamarias.

4.8 Análisis estadístico:

Para el análisis descriptivo de los 30 casos se realizó un análisis univariado teniendo en cuenta medidas como media, desviación estándar, medias y cuartiles; adicionalmente, fueron empleadas pruebas estadísticas de análisis bivariado como Chi-cuadrado de Pearson, Chi-cuadrado de McNemar, Test exacto de Fisher y Prueba de Kruskal-Wallis, para establecer asociaciones estadísticamente significativas entre la variable dependiente “tipo de neoplasia” (adenoma, carcinoma, hiperplasia) y variables independientes como estado reproductivo, raza, edad, ubicación de la masa, densidad de microvasculatura tumoral (DMT), calibre vascular (CV), perímetro total de la microvasculatura tumoral (PTMT) y expresión de la E-cadherina.

5. Resultados

5.1 Caracterización de la población

En la tabla 3 se resume el análisis descriptivo de los 30 casos evaluados. No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre el tipo de neoplasia y el estado reproductivo ($p=0.09$), raza ($p=0.209$), edad ($p=0.3$), ubicación ($p=0.586$), tamaño ($p=0.601$).

Tabla 3. Caracterización epidemiológica de las 30 masas evaluadas.

Características de la población			
VARIABLE		n	%
Estado reproductivo	No Reporta	10	33,33
	Entera	17	56,67
	Castrada	3	10,00
Raza	Beagle	4	13,33
	Bobtail	2	6,67
	Cocker	1	3,33
	French Poodle	13	43,33

Evaluación de la expresión de E-Cadherina y la densidad microvascular en tumores mamarios caninos y su relación con el grado de malignidad

	Jack Russel	2	6,67
	Mestiza	7	23,33
	Pinscher	1	3,33
Edad	<7 años	2	6,67
	8 a 12 años	18	60,00
	>13 años	10	33,33
Ubicación del tumor	Abdominal Caudal	9	30
	Abdominal Craneal	1	3,33
	Desconocido	1	3,33
	Inguinal	12	40
	Torácica Caudal	4	13,33
	Torácica Craneal	3	10
Tamaño tumor	< 3 cm	14	46,67
	3 a 5 cm	7	23,33

Evaluación de la expresión de E-Cadherina y la densidad microvascular en tumores mamarios caninos y su relación con el grado de malignidad

	> 5 cm	9	30
Tipo de Neoplasia	Adenoma	5	16,67
	Carcinoma	22	73,33
	Hiperplasia	3	10

5.2 Angiogénesis

En cuanto a los parámetros evaluados para la medición de la angiogénesis no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre el tipo de neoplasia y la densidad de la vasculatura ($p=0.6$), calibre vascular ($p=0.5$), perímetro total de la microvasculatura tumoral ($p=0.6$). (Figura 1 y 2).

Figura 1: Adenoma mamario. Marcación de endotelio vascular de CD31. 100x.

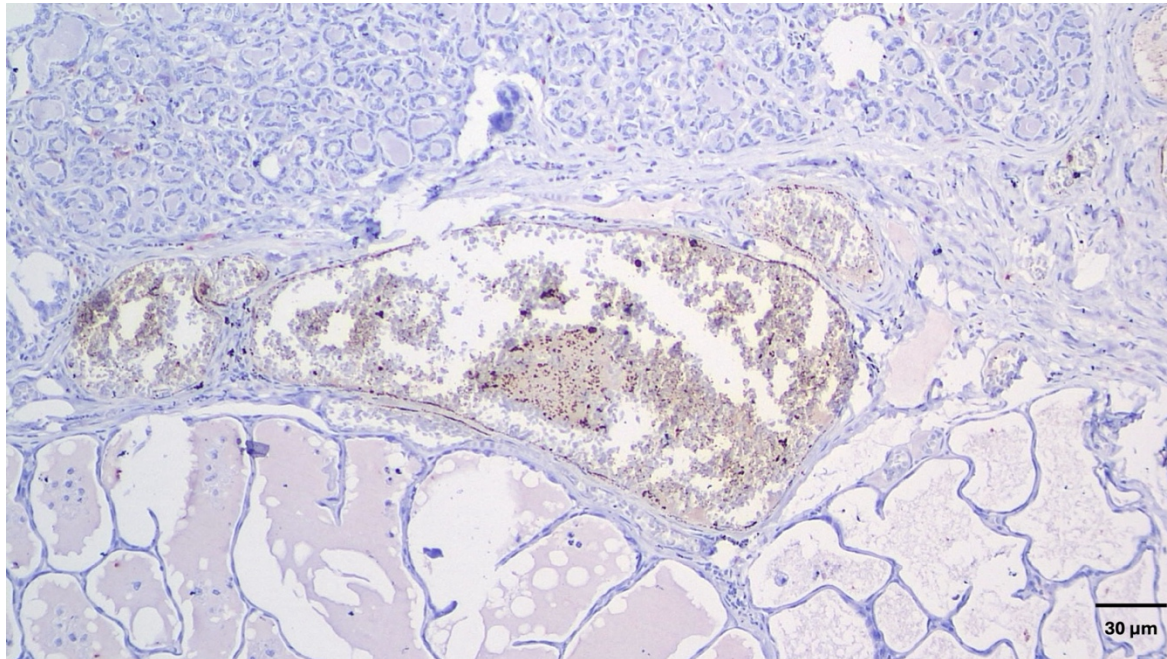
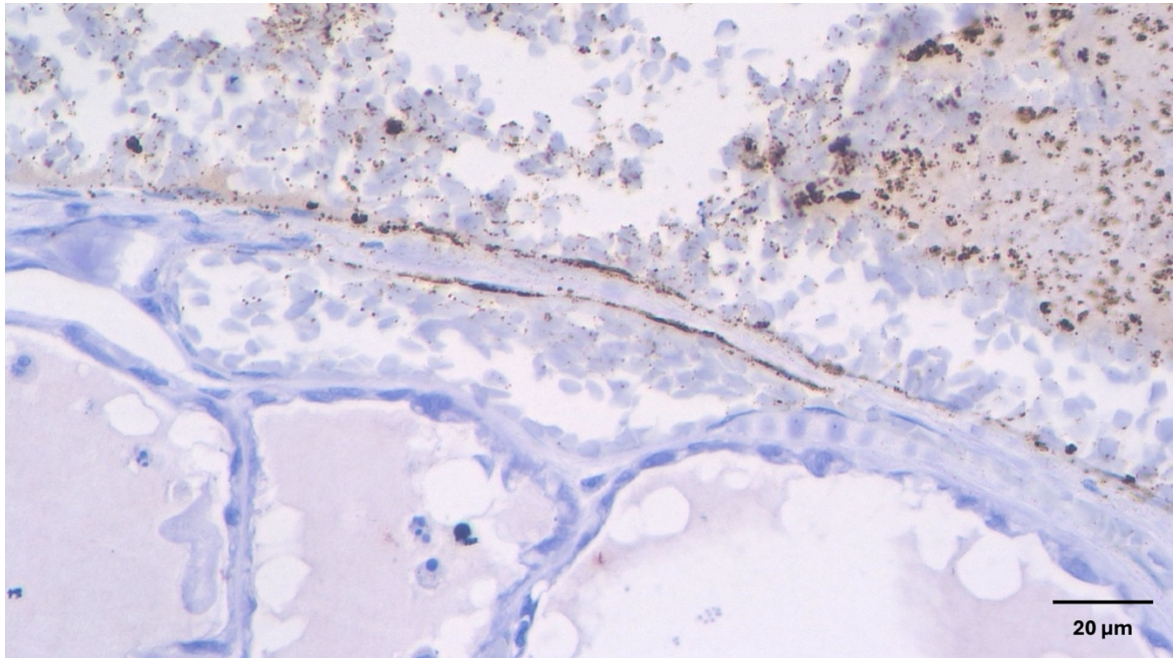


Figura 2: Adenoma mamario. Marcación positiva de endotelio vascular de CD31. 400x.



5.3 Expresión de E-cadherina:

Se evidenció una asociación estadísticamente significativa entre el tipo de neoplasia y la mediana de la expresión de E-Cadherina intracitoplasmática ($p=0.04$) (Figura 3.) evidenciando que los carcinomas tenían una mayor expresión citoplasmática en comparación con las lesiones benignas (adenomas e hiperplasias) (Figura 4.), así mismo, se evidenció una asociación estadísticamente significativa entre el tipo de neoplasia y la mediana de la expresión total de E-Cadherina (membranosa e intracitoplasmática) ($p=0.04$) (Figura 5.) en este caso la marcación positiva fue mayor en los adenomas que en el resto de procesos neoplásicos (Figura 6.), sin embargo, no se evidenció una asociación estadísticamente significativa entre el tipo de neoplasia y la mediana de la expresión de E-Cadherina membranosa ($p=0.3$).

Figura 3: Asociación entre mediana de marcación citoplasmática de E-cadherina y Tipo de neoplasia.

Evaluación de la expresión de E-Cadherina y la densidad microvascular en tumores mamarios caninos y su relación con el grado de malignidad

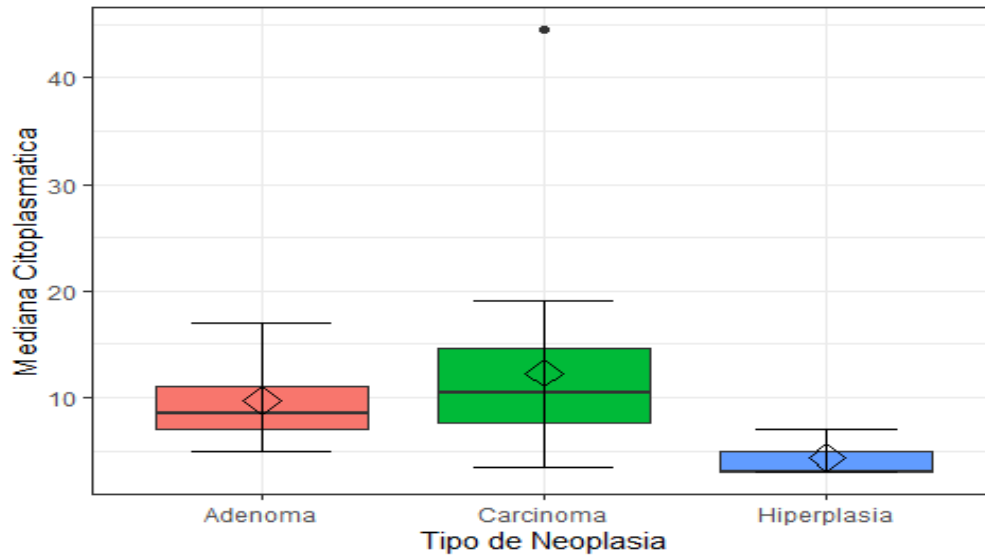


Figura 4: Marcación intracitoplasmática en carcinoma mamario simple grado 3 (patrón sólido). 400x.

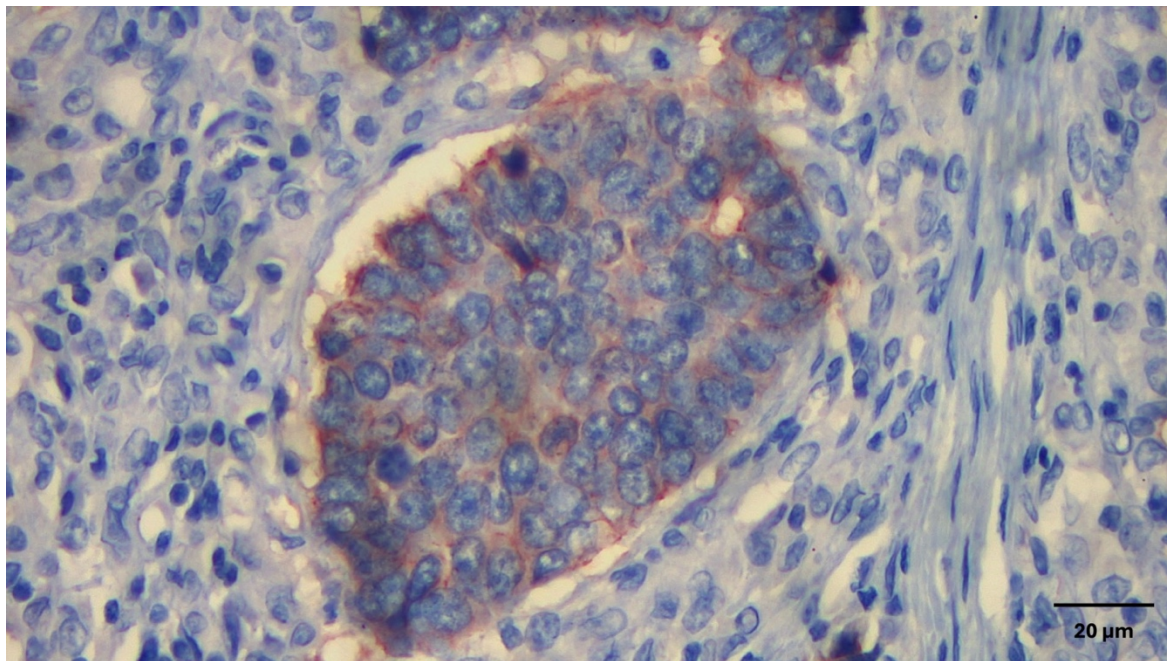


Figura 5: Relación entre mediana de marcación total de E-cadherina y el tipo de neoplasia.

Evaluación de la expresión de E-Cadherina y la densidad microvascular en tumores mamarios caninos y su relación con el grado de malignidad

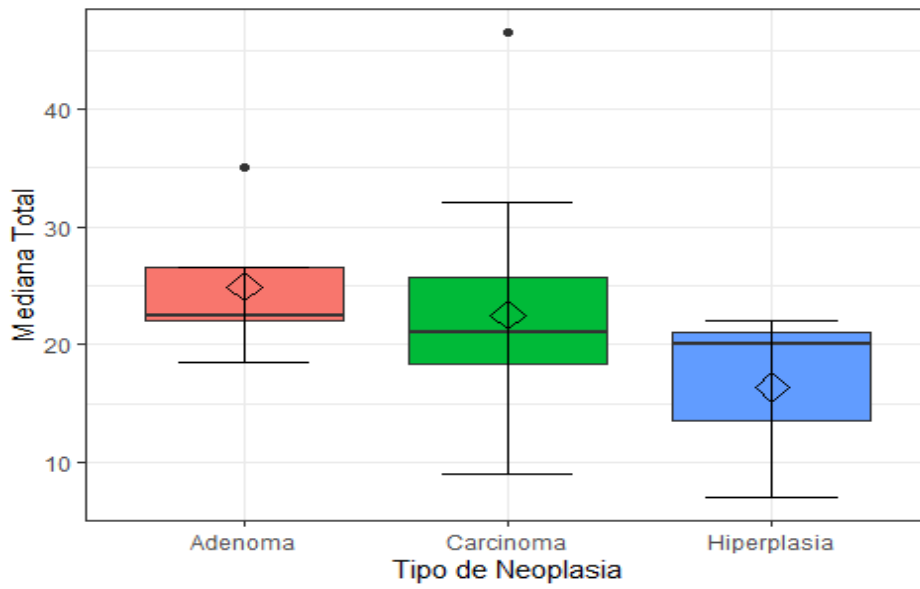
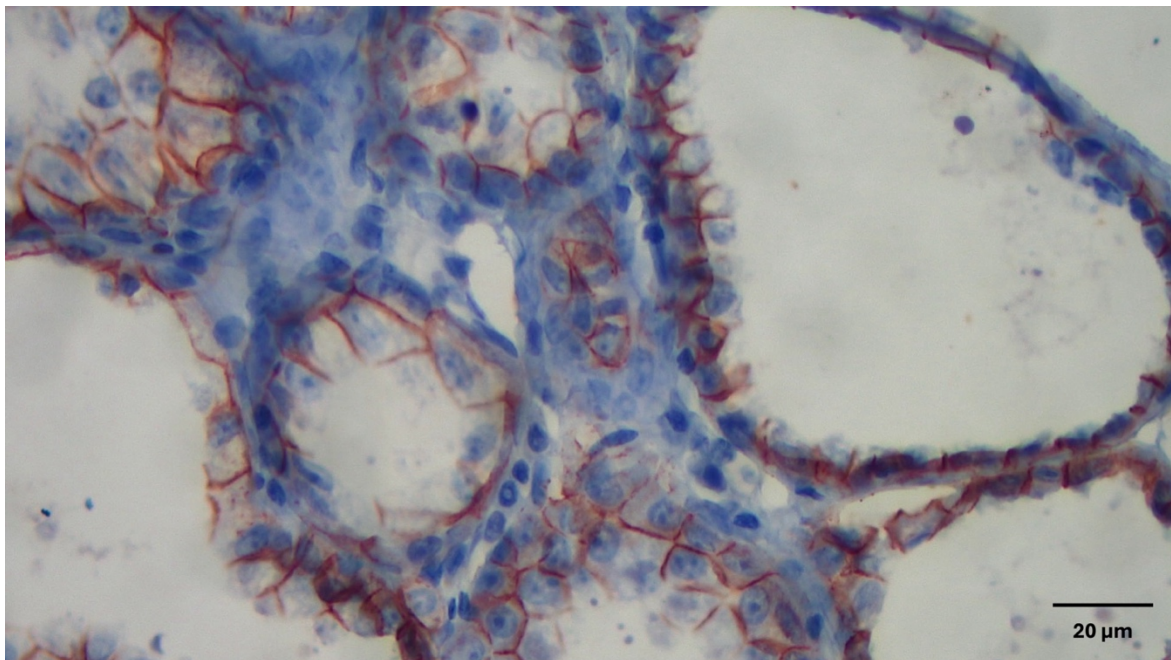


Figura 6: Marcación membranosa de E-cadherina en hiperplasia mamaria lobular. 400x.



6. Discusión

En el estudio no se evidenciaron asociaciones significativas en ninguna de las mediciones de angiogénesis (densidad vascular, calibre vascular y perímetro total de la microvasculatura tumoral) con algún criterio de malignidad, sin embargo, en múltiples estudios se ha planteado la evaluación de angiogénesis como valor pronóstico y se han evidenciado asociaciones de estos resultados con diversas características de malignidad en caninos, así como en humanos (Sennazli, 2015; Sakalauskaitė, 2022; Carvalho, 2013; dos Anjos; 2019).

En diversos estudios se ha evidenciado que una mayor densidad vascular está asociada a un mayor grado de malignidad de la neoplasia, patrón histológico (tumores simples sólido con una mayor microvasculatura en comparación a tumores complejos o mesenquimales en glándula mamaria), metástasis a ganglios linfáticos o pulmones (Sennazli, 2015; Carvalho, 2013; dos Anjos, 2019), según Sakalauskaitė, 2022, el área vascular se asocia positivamente con el grado histológico, índice mitótico y disminución en la formación de túbulos (lo que puede implicar un mayor grado de malignidad); en contraste, en el mismo trabajo realizado por Sakalauskaitė (2022), no se lograron asociar esas características de malignidad con la medida de densidad microvascular, similar a lo evidenciado en nuestro estudio.

En la literatura también se ha reportado el caso contrario como lo visto en el trabajo realizado por Franco et al., (2023) en el que se demostró una mayor densidad microvascular en tumores malignos de menor grado de malignidad (túbulo-papilar) en correlación con una mayor área de luz vascular, así como mayor marcación de VEGF-A y BMP2 (Proteínas morfogenéticas de hueso), mientras que todas estas mediciones fueron menores en tumores de mayor grado de malignidad (sólido).

Igualmente, en algunos estudios se ha establecido una relación positiva entre la densidad microvascular y distintos factores de crecimiento/receptores como EGFR (Carvalho, 2013), PDGFR (dos Anjos, 2019); y se describe la posible participación de otras células que promuevan la angiogénesis como lo reportado por Sakalauskaitė (2022), en el que evidenció una asociación positiva en el número total de mastocitos tumorales y la densidad microvascular. Una de las posibles explicaciones para la negatividad de nuestros resultados puede ser debido al reducido número de muestras incluidos en las mediciones, así mismo, la poca especificidad especialmente para tejidos caninos del marcador utilizado para la expresión del marcador CD31; lo cual pudo influir en una baja

marcación de vasos sanguíneos; de esta manera se recomienda realizar estudios incluyendo un número mayor de casos, así como hacer pruebas de especificidad del anticuerpo; en nuestro caso debido a limitaciones económicas y propias del medio no se puede acceder a anticuerpos especie específicos.

En diversos trabajos como el realizado por Sleenckx (2014) también plantean la importancia de hacer la medición de los diversos parámetros de angiogénesis sumado a la medición de características de proliferación celular de las células endoteliales mediante la utilización de marcadores de proliferación como Ki-67; además, en su trabajo mostraron que hay diferencias de estos parámetros en los vasos sanguíneos intratumorales y peritumorales, estas mediciones pueden llegar a aplicarse en futuros estudios porque se conoce que tejidos adyacentes a los tumores están expuestos a diversos agentes angiogénicos y contribuyen al ambiente tumoral.

En cuanto a la evaluación de expresión de la E-Cadherina, en este estudio se evidenciaron asociaciones positivas entre el tipo de neoplasia (adenoma, carcinoma, hiperplasia) y la disminución de expresión de E-Cadherina, este resultado es similar a evidenciados en la literatura donde se describe una disminución de la expresión de E-Cadherina en comparación con tejido mamario sano y el grado histológico, patrón histológico (menor expresión en patrones sólidos), comportamiento invasivo, índice mitótico, metástasis a ganglio linfático, tamaño del tumor, ulceración, menor tiempo de supervivencia y tiempo libre de enfermedad (Sarli, et al. 2004; Matos, et al. 2006; Gama, et al. 2008; Li, et al. 2017).

Además, en la literatura se da cierta relevancia a los patrones de marcación de E-Cadherina, siendo la membranosa (considerada normal) y una atípica intracitoplasmática; en algunos estudios se reporta que este cambio de expresión en las células neoplásicas posee una asociación positiva con respecto al grado de malignidad y patrón histológico en los tumores mamarios (Sarli, et al. 2004); este cambio de la expresión membranosa a citoplasmática se puede deber a una falla en la traslocación de la proteína hacia la membrana celular, lo que se asocia con una disminución en su función a la hora de mantener las uniones intercelulares (Sarli, et al. 2004).

En este estudio evidenciamos que algunos casos (7/30) tenían un predominio de la marcación intracitoplasmática (por encima del 50% de las células) y entre estos la mayoría eran tumores de grado 2 y grado 3 (5/7), con una ligera tendencia de esta marcación atípica con el grado de malignidad de los tumores, similar a lo reportado por la literatura.

El papel de la expresión de E-Cadherina en el desarrollo de metástasis es controversial debido a que en algunos estudios se describe que una disminución en la expresión o funcionalidad de esta proteína se asocia con el tránsito epitelio-mesenquimal, lo que le confiere la capacidad a las células neoplásicas de invadir los tejidos y hacer metástasis (Sarli, et al. 2004; Matos, et al. 2006; Gama, et al. 2008; Li, et al. 2017); sin embargo, en algunos tumores incluyendo los mamarios en mujeres, han mostrado que algunos focos metastásicos (principalmente, pulmonares) muestran una conservación de la marcación membranosa, este comportamiento puede estar asociado a un tránsito mesenquimal-epitelial en el que las células neoplásicas deben volver a adquirir características propias de los epitelios para favorecer los procesos de colonización en estos focos metastásicos (Li, et al. 2017; Na, et al. 2020).

En nuestro estudio se logró establecer una asociación estadísticamente significativa entre el tipo de tumor y la expresión de E-cadherina, en la que los tumores malignos poseían una menor expresión de E-cadherina en comparación con las lesiones benignas (adenoma, hiperplasia), mostrando un papel importante en el tránsito epitelial-mesenquimal de los tumores malignos favoreciendo la capacidad invasiva de estos, adicionalmente, algunos de los tumores de más alto grado (grado 3) mostraron una expresión aberrante (intracitoplasmática) de la E-cadherina, esta se asocia a que este grado de tumores suelen representar a los tumores con patrones histológicos como el sólido, en el que se pierde esa formación tubular clásica del tejido mamario, característica que suele estar comandada por la función de unión intercelular de la E-cadherina cuando es expresada en la membrana celular.

7. Conclusión

La evaluación de diferentes marcadores (como E-Cadherina) en los tumores mamarios pueden ser útiles para fortalecer las herramientas diagnósticas en la histopatología y hacer una mejor aproximación al pronóstico de los pacientes; además, este tipo de estudios debe considerar un mayor número de variables que incluya entre otras la expresión marcadores como VEGF, PDGF y sus receptores, receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR), evaluación de índice mitótico mediante la realización de marcaciones como Ki-67; todo esto sumado a la elaboración de trabajos de carácter prospectivo con seguimiento de pacientes para permitir hacer asociaciones más precisas de la caracterización de los tumores y su comportamiento biológico.

8. Referencias

Ackerman, M. R. (2017). Inflammation and Healing. In J. F. Zachary (Ed.), *Pathologic Basis of Veterinary Disease* (Sixth Edition, pp. 73–131). Elsevier.

Aupperle-Lellbach, H., Grassinger, J. M., Floren, A., Törner, K., Beitzinger, C., Loesenbeck, G., & Müller, T. (2022). Tumour Incidence in Dogs in Germany: a Retrospective Analysis of 109,616 Histopathological Diagnoses (2014–2019). *Journal of Comparative Pathology*, 198, 33–55. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2022.07.009>

Bhatia, J. K., Chaudhary, T., Boruah, D., & Bharadwaj, R. (2022). Study of angiogenesis in invasive breast carcinoma by morphometry and immunohistochemistry. *Medical journal, Armed Forces India*, 78(3), 345–354. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2021.10.013>

Bonacho, T., Rodrigues, F., & Liberal, J. (2020). Immunohistochemistry for diagnosis and prognosis of breast cancer: a review. *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission*, 95(2), 71–91. <https://doi.org/10.1080/10520295.2019.1651901>

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

Carvalho, M. I., Guimarães, M. J., Pires, I., Prada, J., Silva-Carvalho, R., Lopes, C., & Queiroga, F. L. (2013). EGFR and microvessel density in canine malignant mammary

tumours. *Research in veterinary science*, 95(3), 1094–1099. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.09.003>

Cassali G. D. (2013). Comparative mammary oncology: canine model. *BMC proceedings*, 7 Suppl 2(Suppl 2), K6. <https://doi.org/10.1186/1753-6561-7-S2-K6>

Dhein, E. S., Heikkilä, U., Oevermann, A., Blatter, S., Meier, D., Hartnack, S., & Guscetti, F. (2024). Incidence rates of the most common canine tumors based on data from the Swiss Canine Cancer Registry (2008 to 2020). *PLOS ONE*, 19(4), e0302231. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0302231>

Dobson, J. M., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K., & Wood, J. L. N. (2002). Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 43(6), 240–246. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2002.tb00066.x>

dos Anjos, D. S., Vital, A. F., Lainetti, P. de F., Leis-Filho, A. F., Dalmolin, F., Elias, F., Calazans, S. G., & Fonseca-Alves, C. E. (2019). Deregulation of VEGFR-2 and PDGFR expression and microvascular density in a triple-negative model of canine malignant mammary tumors with lymph node or lung metastasis. *Veterinary Sciences*, 6(1). <https://doi.org/10.3390/VETSCI6010003>

Esteves, F. S. C., Cassali, G. D., Souza, F. R., & Santos, F. G. de A. (2022). Aspectos epidemiológicos, clínicos e histopatológicos das neoplasias mamárias em cães do município Rio Branco, Acre, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, 43(6), 2547–2562. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2022v43n6p2547>

Fleming, J. M., Creevy, K. E., & Promislow, D. E. L. (2011). Mortality in North American Dogs from 1984 to 2004: An Investigation into Age-, Size-, and Breed-Related Causes of Death. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(2), 187–198. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0695>

Evaluación de la expresión de E-Cadherina y la densidad microvascular en tumores mamarios caninos y su relación con el grado de malignidad

Franco, P. I. R., Pereira, J. X., Ferreira, H. H., de Menezes, L. B., & Miguel, M. P. (2023). Low-Grade Mammary Gland Tumors in Dogs Have Greater VEGF-A and BMP2 Immunostaining and Higher CD31 Blood Vessel Density. *Topics in Companion Animal Medicine*, 53–54 <https://doi.org/10.1016/j.tcam.2023.100778>

Gama, A., Paredes, J., Gärtner, F., Alves, A., & Schmitt, F. (2008). Expression of E-cadherin, P-cadherin and beta-catenin in canine malignant mammary tumours in relation to clinicopathological parameters, proliferation and survival. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 177(1), 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.05.024>

Goldschmidt, M. H., Peña, L., Rasotto, R., & Zappulli, V. (2011). Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 48(1), 117–131. <https://doi.org/10.1177/0300985810393258>

Kaszak, I., Ruszczak, A., Kanafa, S., Kacprzak, K., Król, M., & Jurka, P. (2018). Current biomarkers of canine mammary tumors. In *Acta Veterinaria Scandinavica* (Vol. 60, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13028-018-0417-1>

Knudsen, K. A., & Wheelock, M. J. (2005). Cadherins and the mammary gland. In *Journal of Cellular Biochemistry* (Vol. 95, Issue 3, pp. 488–496). <https://doi.org/10.1002/jcb.20419>

Kraby, M. R., Opdahl, S., Russnes, H. G., & Bofin, A. M. (2019). Microvessel density in breast cancer: The impact of field area on prognostic informativeness. *Journal of Clinical Pathology*, 72(4), 304–310. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2018-205536>

Krishnapriya, S., Malipatil, B., Surekha, S., Sundersingh, S., Sridevi, V., Ananthi, B., Selvaluxmy, G., & Ganesan, T. S. (2019). Microvessel density (MVD) in locally advanced breast cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 20(5), 1537–1545. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.5.1537>

Li Z, Yin S, Zhang L, Liu W, Chen B. Prognostic value of reduced E-cadherin expression in breast cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017 Mar 7;8(10):16445-16455. doi: 10.18632/oncotarget.14860. PMID: 28147315; PMCID: PMC5369975.

Liebich, H.-G. (2019). *Veterinary Histology of Domestic Mammals and Birds* (5th ed.). 5M Publishing Ltd. Lugano, R., Ramachandran, M., & Dimberg, A. (2020). Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 77, Issue 9, pp. 1745–1770). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03351-7>

Matos, A. J. F., Lopes, C., Carvalheira, J., Santos, M., Rutteman, G. R., & Gärtner, F. (2006). E-cadherin Expression in Canine Malignant Mammary Tumours: Relationship to Other Clinico-Pathological Variables. *Journal of Comparative Pathology*, 134(2–3), 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.10.004>

Na, T.-Y., Schecterson, L., Mendonsa, A. M., & Gumbiner, B. M. (2020). The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps. *CELL BIOLOGY*, 117(11), 5931–5937. <https://doi.org/10.1073/pnas.1918167117/-/DCSupplemental>

Newkirk, K. M., Brannick, E. M., & Kusewitt, D. F. (2017). Neoplasia and Tumor Biology. In J. F. Zachary (Ed.), *Pathologic Basis of Veterinary Disease* (Sixth Edition, pp. 286–323).

Nosalova, N., Huniadi, M., Horňáková, L., Valenčáková, A., Horňák, S., Nagoos, K., Vozar, J., & Cizkova, D. (2024). Canine Mammary Tumors: Classification, Biomarkers, Traditional and Personalized Therapies. *International journal of molecular sciences*, 25(5), 2891. <https://doi.org/10.3390/ijms25052891>

Pastor, N., Caballé, N. C., Santella, M., Ezquerra, L. J., Tarazona, R., & Duran, E. (2018). Epidemiological study of canine mammary tumors: age, breed, size and malignancy. In *Austral J Vet Sci* (Vol. 50).

Pawlina, W., & Ross, M. H. (2020). *Histology: A Text and Atlas: with Correlated Cell and Molecular Biology* (8th ed.). Wolters Kluwer.

Peña, L., De Andrés, P. J., Clemente, M., Cuesta, P., & Pérez-Alenza, M. D. (2013). Prognostic Value of Histological Grading in Noninflammatory Canine Mammary Carcinomas in a Prospective Study With Two-Year Follow-Up: Relationship With Clinical and Histological Characteristics. *Veterinary Pathology*, 50(1), 94–105. <https://doi.org/10.1177/0300985812447830>

Peña, L., Gama, A., Goldschmidt, M. H., Abadie, J., Benazzi, C., Castagnaro, M., Díez, L., Gärtner, F., Hellmén, E., Kiupel, M., Millán, Y., Miller, M. A., Nguyen, F., Poli, A., Sarli, G., Zappulli, V., & Mulas, J. M. de las. (2014). Canine Mammary Tumors: A Review and Consensus of Standard Guidelines on Epithelial and Myoepithelial Phenotype Markers, HER2, and Hormone Receptor Assessment Using Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, 51(1), 127–145. <https://doi.org/10.1177/0300985813509388>

Sakalauskaitė, S., Riškevičienė, V., Šengaut, J., & Juodžiukynienė, N. (2022). Association of mast cell density, microvascular density and endothelial area with clinicopathological parameters and prognosis in canine mammary gland carcinomas. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 64(1). <https://doi.org/10.1186/s13028-022-00633-2>

Salas, Y., Márquez, A., Diaz, D., & Romero, L. (2015). Epidemiological study of mammary tumors in female dogs diagnosed during the period 2002-2012: A growing animal health problem. *PLoS ONE*, 10(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127381>

Sarli, G., Preziosi, R., De Tolla, L., Brunetti, B., & Benazzi, C. (2004). E-cadherin immunoreactivity in canine mammary tumors. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 16(6), 542–547. <https://doi.org/10.1177/104063870401600608>

Sassi, F., Benazzi, C., Castellani, G., & Sarli, G. (2010). Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *BMC Veterinary Research*, 6(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-6-5>

Schneider, R. (1970), Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer*, 26: 419-426. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197008\)26:2<419::AID-CNCR2820260225>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197008)26:2<419::AID-CNCR2820260225>3.0.CO;2-U)

Sennazli, Gulbin, et al. "Immunohistochemical detection of tumour cell proliferation and intratumoural microvessel density in canine malignant mammary tumours" *Journal of Veterinary Research*, vol. 59, no. 2, Sciendo, 2015, pp. 255 - 261. <https://doi.org/10.1515/bvip-2015-0038>

Sleeckx, N., Van Brantegem, L., Van den Eynden, G., Franssen, E., Casteleyn, C., Van Cruchten, S., Veldhuis Kroeze, E., & Van Ginneken, C. (2014). Angiogenesis in canine mammary tumours: a morphometric and prognostic study. *Journal of comparative pathology*, 150(2-3), 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2013.09.005>

Sorenmo, K. U., Rasotto, R., Zappulli, V., & Goldschmidt, M. H. (2011). Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Veterinary Pathology*, 48(1), 85–97. <https://doi.org/10.1177/0300985810389480>

Uzzan, B., Nicolas, P., Cucherat, M., & Perret, G.-Y. (2004). Microvessel Density as a Prognostic Factor in Women with Breast Cancer: A Systematic Review of the Literature and Meta-Analysis. In *CANCER RESEARCH* (Vol. 64). <http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/64/9/2941/2530422/zch00904002941.pdf>

Varney D, O'Neill D, O'Neill M, Church D, Stell A, Beck S, et al. Epidemiology of mammary tumours in bitches under veterinary care in the UK in 2016. *Vet Rec*. 2023;e3054. <https://doi.org/10.1002/vetr.3054>

Vascellari, M., Capello, K., Carminato, A., Zanardello, C., Baioni, E., & Mutinelli, F. (2016). Incidence of mammary tumors in the canine population living in the Veneto region (Northeastern Italy): Risk factors and similarities to human breast cancer. *Preventive veterinary medicine*, 126, 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.02.008>

Evaluación de la expresión de E-Cadherina y la densidad microvascular en tumores mamarios caninos y su relación con el grado de malignidad

van Roy, F., & Berx, G. (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(23), 3756–3788. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8281-1>

Weidner, N., Semple, J. P., Welch, W. R., & Folkman, J. (1991). Tumor Angiogenesis and Metastasis — Correlation in Invasive Breast Carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 324(1), 1–8. <https://doi.org/10.1056/NEJM199101033240101>

Zaha D. C. (2014). Significance of immunohistochemistry in breast cancer. *World journal of clinical oncology*, 5(3), 382–392. <https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.382>

Zheng, H. H., Du, C. T., Yu, C., Zhang, Y. Z., Huang, R. L., Tang, X. Y., & Xie, G. H. (2022). Epidemiological Investigation of Canine Mammary Tumors in Mainland China Between 2017 and 2021. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.843390>