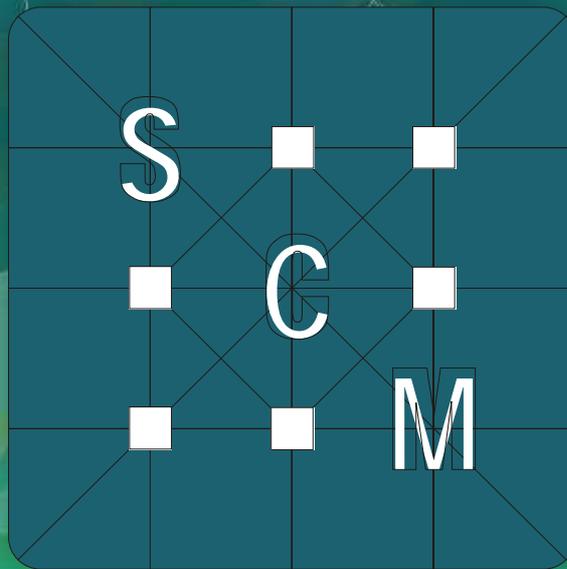


ISSN 1851-7862

Vol. XI, N° 1



CIENCIAS MORFOLÓGICAS

Publicación periódica de la Sociedad de Ciencias Morfológicas de la Plata

Julio 2009

CIENCIAS MORFOLÓGICAS

Revista de la Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata
Publicación periódica de trabajos científicos del área de la Morfología

EDITOR CIENTÍFICO

Dr. Claudio Barbeito. Universidad Nacional de La Plata. CONICET. Argentina.

COMITÉ DE POLÍTICA EDITORIAL

Dra. Graciela Navone. Universidad Nacional de La Plata. CONICET. Argentina.

Dr. Mario Restelli. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

Dra. Susana Salceda. Universidad Nacional de La Plata. CIC. Argentina.

PhD Gustavo Zuccolilli. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

CONSEJO CIENTÍFICO EDITORIAL

Dra. María del Carmen Carda Batalla. Universidad de Valencia. España.

Dra. Ana Lía Errecalde. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

MSc Antonio Felipe. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Argentina.

Dra. María Teresa Ferrero. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

MSc Stella Maris Galván. Universidad Nacional del Litoral. Argentina.

PhD Eduardo Gimeno. Universidad Nacional de La Plata. CONICET. Argentina.

Dra. María Elsa Gómez de Ferraris. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

Dra. Alda González. Universidad Nacional de La Plata. CONICET. Argentina.

PhD Ben Hanelt. Universidad de Nebraska. Estados Unidos.

Dr. Daniel Lombardo. Universidad Nacional de Buenos Aires. Argentina.

Dra. Inés Martín Lacave. Universidad de Sevilla. España.

Dra. Marta Graciela Méndez. Universidad Nacional de La Plata. CONICET. Argentina.

Dr. Hugo Ortega. Universidad Nacional del Litoral. CONICET. Argentina.

Dr. Martí Pomarola. Universidad Autónoma de Barcelona. España.

Dr. Enrique Portiansky. Universidad Nacional de La Plata. CONICET. Argentina.

Dra. Sara Sánchez. Universidad Nacional de Tucumán. CONICET. Argentina.

PhD Andreas Schmidt-Rhaesa. Biekefeld. Alemania.

Dr. Eduardo Tonni. Universidad Nacional de La Plata. CIC. Argentina.

Dra. Irene von Lawzewitzch. Universidad Nacional de Buenos Aires. CONICET. Argentina.

Dr. Mauricio Zamponi. Universidad Nacional de Mar del Plata. CONICET. Argentina.

EDITOR ASOCIADO

Msc. Norma Viviana González. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

Edición técnica y compaginación:

Méd. Vet. Pedro Fernando Andrés Laube. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

Propiedad: Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata.

Sede: Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

Distribución: Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata.

VOLUMEN 11, NÚMERO 1 - JULIO 2009 -

CIENCIAS MORFOLÓGICAS

Publicación periódica de la Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata

Vol. 11, N° 1 - JULIO 2009

ÍNDICE

TRABAJOS ORIGINALES

Damián MOAVRO; Marina MARTÍNEZ; Marcela GARCÍA; Adriana GARCÍA; Laura ANDRINI; Ana María INDA; Ana Lía ERRECALDE. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA SINTESIS DE ADN EN HÍGADO Y RIÑÓN DE RATONES LACTANTES Y ADULTOS	1-4
Rocío GARCÍA MANCUSO. DIFERENCIAS SEXUALES EN VARIABLES MÉTRICAS DEL ILION FETAL	5-14
Mónica Elizabeth DIESSLER, María Cecilia CASTELLANO, Enrique Leo PORTIANSKY, Sarah Lilian BURNS, Julio Roberto IDIART. INVASIÓN VASCULAR, EXPRESIÓN DEL RECEPTOR 2 DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE ENDOTELIOS VASCULARES (VEGFR-2) Y DENSIDAD DE MICROVASOS EN CARCINOMAS MAMARIOS DE PERRAS. VALOR PRONÓSTICO	15-24

PRESENTACIÓN

Con el presente número creemos cumplir uno de los principales objetivos de nuestra revista: mostrar la producción científica en distintas áreas de las Ciencias Morfológicas.

El estudio de la proliferación celular y sus modificaciones relacionadas con los ritmos circadianos ha sido el área de investigación del Instituto de Biología, Histología y Embriología de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP durante décadas. Sin embargo, en el trabajo "ESTUDIO COMPARATIVO DE LA SÍNTESIS DE ADN EN HÍGADO Y RIÑÓN DE RATONES LACTANTES Y ADULTOS" se introducen aspectos sorprendentemente muy poco estudiados: los ritmos diarios de proliferación en poblaciones celulares de animales lactantes.

La participación de la antropología biológica en las reuniones científicas y en las revistas de Ciencias Morfológicas se incrementa año a año. En el trabajo "DIFERENCIAS SEXUALES EN VARIABLES MÉTRICAS DEL ILION FETAL" García Mancuso, la autora plantea el uso de diferentes características de los huesos ilíacos de fetos como posible método para reconocer el sexo.

En los últimos años, la patología veterinaria ha incorporado técnicas como la inmunohistoquímica y el análisis digital de imágenes. Estas metodologías se han hecho indispensables para la investigación en el área e, inclusive, se están incorporando al diagnóstico. El trabajo "INVASIÓN VASCULAR, EXPRESIÓN DEL RECEPTOR 2 DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE ENDOTELIOS VASCULARES (VEGFR-2) Y DENSIDAD DE MICROVASOS EN CARCINOMAS MAMARIOS DE PERRAS. VALOR PRONÓSTICO" aplica estas técnicas a uno de los temas más importantes de la patología de los animales domésticos: el estudio de los tumores de mama en la perra.

Esperemos que el material presentado sea de su agrado.

Los editores

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA SINTESIS DE ADN EN HÍGADO Y RIÑÓN DE RATONES LACTANTES Y ADULTOS

COMPARATIVE STUDY OF LIVER AND KIDNEY DNA SYNTHESIS IN ADULT AND YOUNG MICE

Damián MOAVRO¹; Marina MARTÍNEZ¹; Marcela GARCÍA¹; Adriana GARCÍA¹; Laura ANDRINI¹; Ana María INDA^{1,2}; Ana Lía ERRECALDE¹.

1-Cátedra de Citología, Histología y Embriología "A". Facultad de Ciencias Médicas. UNLP. Calle 60 y 120, La Plata (1900), Buenos Aires, Argentina.

2-CIC, Pcia. de Buenos Aires.

e-mail: mngarcia@med.unlp.edu.ar

RESUMEN. En trabajos previos hemos observado que la actividad proliferativa de numerosas poblaciones celulares del ratón lactante y joven difiere de la encontrada en el adulto. En el presente trabajo experimental, se estudia la síntesis de ADN del ratón lactante y adulto, mediante el método inmunohistoquímico de la BrdU (Bromodeoxiuridina), en las poblaciones celulares de hepatocitos y renocitos, a las 00:00 h y 16:00 h, con el objeto de establecer la correspondencia en la proliferación celular entre ambos grupos etarios. Para ello se utilizaron machos lactantes de 21 días de edad y adultos de 90 días, de la cepa C3H/S. Los resultados muestran que los valores de síntesis de ADN de los renocitos y hepatocitos en los ratones lactantes son significativamente mayores ($p < 0.001$) a los observados en los adultos, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los valores de ambos puntos horarios en los órganos estudiados. Podemos concluir que estos hallazgos demuestran que, si bien en los ratones lactantes aparecen valores máximos y mínimos en la actividad proliferativa de distintas poblaciones celulares, estas aun no presentan la ritmicidad establecida para los adultos.

Palabras clave: síntesis de ADN, hígado, riñón, ratones, bromodeoxiuridina.

ABSTRACT. In previous papers we have observed that the proliferative activity of numerous cell populations of suckling and young mice was different than the observed in adults. In the present work we analyzed the DNA synthesis of suckling and adult mice, by immunohistochemistry (Bromodioxiuridine) in both hepatocytes and renocytes, at two different time points. The object of the present experiment was to establish the correlation in cellular proliferation between both groups. We used C3HS suckling male mice of 21 days old and adult mice of 90 days old. The results showed that DNA synthesis of renocytes and hepatocytes in suckling mice were significantly higher than the adults, and we didn't find statistically differences between the values of both analysed time points. We can conclude that in suckling mice we could observe maximum and minimum values but we couldn't find a circadian rhythm like those established in adults.

Keywords: DNA synthesis, liver, kidney, mice, bromodeoxiuridine.

INTRODUCCIÓN

El ciclo celular puede variar en respuesta a condiciones particulares durante diferentes estadios del lapso de vida de un individuo, por lo que sería esperable encontrar diferencias en la actividad proliferativa normal de los organismos en distintas etapas de la vida. En trabajos previos se ha establecido que la actividad proliferativa de numerosas poblaciones celulares del ratón lactante y joven difiere de la observada en el adulto (1, 2, 3, 4). Por ejemplo, podemos mencionar que los hepatocitos de ratas y células de la *pars intermedia* de la hipófisis de ratones hembra, de 14 días de edad, en estadio de lactantes, no exhiben la periodicidad circadiana que observamos en los adultos (5). Sabemos, además, que estas variaciones relativas a la periodicidad diaria dependen del momento del desarrollo ontogénico analizado y de la maduración de los mecanismos de control de la proliferación celular.

En el ratón adulto el momento de mayor actividad de síntesis de ADN (ADNs) en los hepatocitos se produce alrededor de las 00:00 hs y el de máxima actividad mitótica alrededor de las 16:00 hs (6, 7). Tomando como base estos antecedentes, en el presente trabajo experimental, se estudia la ADNs del ratón lactante y adulto, mediante el método inmunohistoquímico de la Brdu (Bromodeoxiuridina), en las poblaciones celulares de hepatocitos y renocitos, en los puntos horarios antes mencionados, con el objeto de establecer la correspondencia en la proliferación celular entre ambos grupos etarios.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ratones: Se utilizaron machos lactantes de 21 días de edad y adultos de 90 días, de la cepa C3H/S. Los lactantes se mantuvieron junto a sus madres mientras que los adultos de 75 días de edad se colocaron en cajas

individuales en una sala de ritmos, durante 15 días, bajo condiciones de estandarización para análisis de periodicidad.

Diseño experimental: Se utilizaron 26 ratones en total, 13 lactantes y 13 adultos. En cada uno de los grupos los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 2 lotes y sacrificados a las 00:00 y 16:00 hs respectivamente. El sacrificio se realizó al día 21 de nacidos en los lactantes y a los 15 días de estandarización en los adultos. Durante el sacrificio se extrajeron el hígado y el riñón de cada animal. Estos órganos se procesaron de la forma descripta anteriormente.

Técnica inmunohistoquímica: 1 hora antes del sacrificio se les inyectó intraperitonealmente a todos los animales una solución de 5-bromodeoxiuridina (Sigma) en una dosis de 50 mg/kg. Los cortes obtenidos se marcaron con el Ac Bu20a, previo tratamiento en horno microondas (2x 5 mín., 750 w) con buffer citrato pH 6. Para la detección se utilizó el Sistema Envision y se realizó el revelado con diaminobencidina (DAB). Por último, se contrastó con una coloración suave de hematoxilina, observándose de color marrón los núcleos de las células marcadas positivamente.

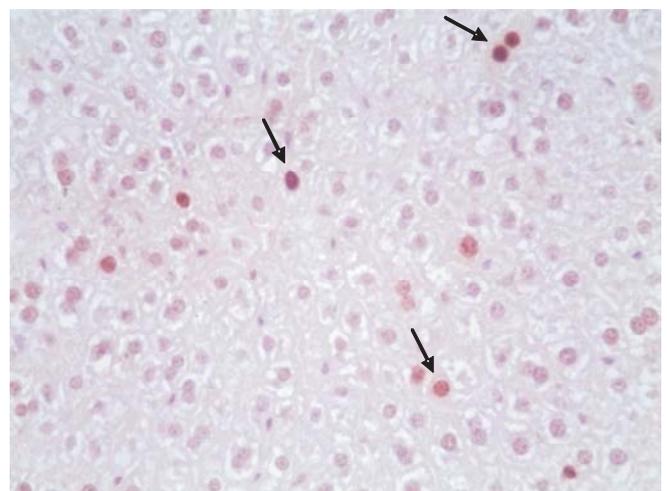


Figura 1. Síntesis de ADN. Las flechas indican núcleos de hepatocitos marcados con Brdu. 40X.

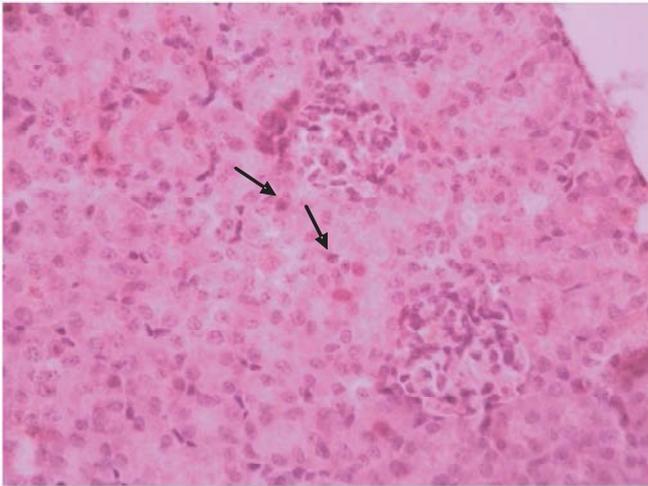


Figura 1. Síntesis de ADN. Las flechas indican núcleos de renocitos marcados con Brdu. 40 X.

Tratamiento estadístico: A partir de la observación de los preparados (con una magnificación de 100 X) se calculó el índice de ADNs de cada muestra y la $X \pm ES$ de cada lote.

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante el *Student t Test*. Se consideraron significativas las diferencias $p < 0.05$.

RESULTADOS

Como observamos en las tablas y gráficos los valores de ADNs de los renocitos y hepatocitos en los ratones lactantes son significativamente mayores ($p < 0.001$) a los observados en los adultos en ambos puntos horarios analizados.

Hora del día	Lactantes	(n)	Adultos	(n)	P
00:00	30.1 ± 3.9	6	1.04 ± 0.1	6	0.001
16:00	38.3 ± 2.5	7	0.1 ± 0.01	6	0.001

Tabla 1. ADNs en renocitos de ratones lactantes y adultos.

Hora del día	Lactantes	(n)	Adultos	(n)	P
00:00	34.3 ± 8.5	6	0.1 ± 0.0	6	0.001
16:00	24.7 ± 4.7	7	0.4 ± 0.1	6	0.001

Tabla 2. ADNs en hepatocitos de ratones lactantes y adultos.

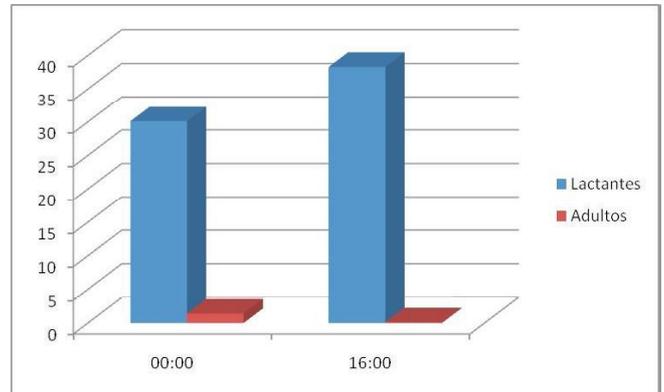


Gráfico 1. Comparación entre los valores de ADNs en renocitos de ratones lactantes y adultos.

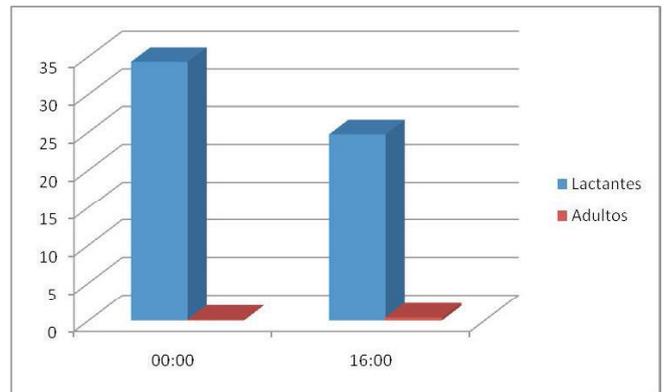


Gráfico 2. Comparación entre los valores de ADNs en hepatocitos de ratones lactantes y adultos.

CONCLUSIONES

Como observamos en los resultados, los ratones machos lactantes de la cepa C3H/S poseen una elevada actividad de ADNs en las poblaciones celulares de hepatocitos y renocitos en comparación a los valores hallados en los adultos. Esto podría deberse a que a tan temprana edad encontramos un mayor nivel sérico en las hormonas y factores de crecimiento lo que desencadena un aumento en la proliferación y desarrollo celular (8). Entre los factores involucrados, podemos mencionar a miembros de varias familias de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento para hepatocitos (HGF),

el factor de crecimiento semejante a insulina (IGFs), el factor de crecimiento derivado del endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) entre otros, todos involucrados en la proliferación hepática y renal (9,10).

En el presente trabajo, en los hepatocitos de ratones lactantes, la mayor actividad proliferativa se encontró durante la medianoche mientras que en el riñón se observó a las 16:00h, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Barbeito *et al.* (5) encontró que ratones hembras de 14 días de edad, también de la cepa C3H/S, las células epiteliales de la *pars intermedia* de la hipófisis, presentan una tendencia a establecer un ritmo con una actividad mayor durante la medianoche, aunque las diferencias temporales en los valores de actividad mitótica no fueron estadística-

mente significativas. El mismo autor, estudiando los enterocitos del duodeno de ratones machos de la cepa C3HS, de 14 días de edad, observó un pico en la actividad mitótica a las 12:00 h (11). Estos hallazgos demostrarían, que si bien en los ratones lactantes aparecen valores máximos y mínimos en la actividad proliferativa de algunas poblaciones celulares, estas aun no presentan la ritmicidad establecida para los adultos; lo que podría deberse a la falta de maduración del eje hipotálamo-hipofisiario, responsable del establecimiento de los ritmos circadianos en el organismo (12).

AGRADECIMIENTOS

A Javiera Marini por su asistencia técnica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barbeito CG, Catalano VA, Flamini MA, *et al.* (1999). Age influence in epidermal cell proliferation. *Cs Morfol*; 3:17-24.
2. McNicol AM, Penman ID, Duffy AE. (1989). Age related variation in circadian rhythms of mitosis in the adrenal cortex of the male rat. *J Endocrinol*; 120:307-10.
3. Reyna JC, Barbeito CG, Moreno FR, *et al.* (1997). Mitotic activity of duodenal - crypt enterocytes in mice bearing a transplanted hepatocarcinoma. *Medicina (Bs As)*; 57:708-12.
4. Savignone CA, Barbeito CG, Flamini MA, *et al.* (1998). Sexual dimorphisms in the proliferation of submaxillary glands epithelial cell from adult mouse: a preliminary report. *Biocell*; 22:83.
5. Barbeito CG, Surur JM, Badrán AF. (2000). Mitotic activity of the *pars intermedia* in the female mouse: age - associated variations in proliferation rate and circadian periodicity. *Chronobiol Int*; 17:751-56.
6. García MN. (2005). Estudio de la síntesis de ADN de poblaciones celulares hepáticas, duodenales, linguales y del tumor ES12a en ratones. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP.
7. Errecalde AL, Inda AM, García AL. (1995). Ritmos circadianos en la proliferación celular. *Cs Morfol*; 1:33-39.
8. Gattone VH, Sherman DA, Hinton DA, Fu-Weng N, Topham RT, Klein RM. (1992). Epidermal Growth Factor in the neonatal mouse salivary gland and kidney. *Biol neonate*; 61:54-67.
9. Scheving LA, Tsai TH, Scheving LE. (1987). Circadian-dependent response in DNA synthesis to epidermal growth factor in spleen, bone marrow and lung and mitotic index of corneal epithelium in ad-libitum fed and fasted CD2F1 mice. *Prog Clin Biol Res*; 227:181-91.
10. Michalopoulos GK, DeFrances MC. (1997). Liver regeneration. *Science*; 276:60-66.
11. Barbeito CG, González N, Badrán AF. (2003). Sex - and age - related temporal variations in intestinal-epithelium proliferation in the suckling mouse. *Chronobiol Int*; 20:37-47.
12. Barbason H, Herens C, Robaye B, Milis G, Sulon J, Bouzahzak B, Van Cantfort J. (1995). Importance of cell kintetics rhythmicity for the control of cell proliferation and carcinogenesis in rat liver. *In vivo*; 9:539-48.

DIFERENCIAS SEXUALES EN VARIABLES MÉTRICAS DEL ILION FETAL

SEX DIFFERENCES IN METRIC VARIABLES OF FETAL ILIUM

Rocío GARCÍA MANCUSO.

Laboratorio de Investigaciones Morfológicas Aplicadas, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP. Conicet.

e-mail: rgarciamancuso@gmail.com

RESUMEN. En este trabajo se analiza el hueso ilíaco a través de medidas lineales, ángulos e índices, con el fin de evaluar la presencia de las diferencias dimórficas en los estadios más tempranos de la vida. Se seleccionó una muestra de 62 individuos de sexo conocido (29♀ y 33♂) de entre 25 y 45 semanas de gestación pertenecientes a la colección Lambre. La muestra fue analizada en dos grupos de edad, cada uno de los cuales comprende 10 semanas del desarrollo. Se encontraron correlaciones significativas con la edad en casi todas las variables analizadas. Se realizó el test de t para muestras independientes por sexo, analizando toda la muestra y se encontraron diferencias significativas para el índice distancia/profundidad. Para el grupo de entre 35 y 45 semanas de gestación se encontraron diferencias significativas en la longitud del ilion, profundidad y ángulo de la escotadura mayor, en el índice de la escotadura y en el índice distancia/profundidad. Sobre la base de los resultados encontrados, se considera que las diferencias dimórficas en etapas tempranas solo pueden analizarse en períodos de tiempo acotados dado que las modificaciones ocurridas durante el crecimiento son heterogéneas. Nuevas exploraciones, en otras poblaciones y rangos etarios, permitirían conseguir una guía ajustada para la estimación del sexo en individuos en desarrollo.

Palabras clave: dimorfismo sexual, escotadura ciática mayor, subadultos.

ABSTRACT. This paper analyzes the ilium through linear measurements, angles and indices in order to evaluate the presence of dimorphic differences in the earliest stages of life. The sample consists of 62 known sex individuals (29 ♀ and 33 ♂) within the age range of 25-45 weeks after conception from the Lambre collection. The sample was analyzed in two age groups each comprising 10 weeks of development. There were significant correlations with age in almost all variables. We performed the t test for independent samples by sex and found significant differences for the index distance/depth. For the age group between 35 and 45 weeks of gestation significant differences were found in length of ilium, depth and angle of the greater sciatic notch, the index of the sciatic notch and the index distance/depth. On the basis of the findings is considered that dimorphic differences in early stages can only be analyzed in bounded time periods since the changes occurring with growth are heterogeneous. New explorations in other populations and other age ranges could get a guide for estimating adjusted sex in developing individuals.

Keywords: sexual dimorphism, sciatic notch, subadults.

INTRODUCCIÓN

Los intentos por explicar las variaciones observadas en el esqueleto humano son un tema de interés inagotable en los estudios morfológicos. En este sentido, las modificaciones ontogenéticas y el dimorfismo sexual son las principales fuentes de la variación en el esqueleto humano (1).

Estas fuentes de variación se imbrican al considerar que en el proceso de crecimiento y desarrollo se revelan los caracteres sexuales secundarios, que constituyen la divergencia morfológica y dimensional entre los sexos y que se manifiestan con el despegue puberal, como consecuencia de la secreción gonadal de hormonas sexuales (2).

Los rasgos observados sobre el esqueleto humano que se han considerado de mayor relevancia para diagnosticar el sexo son aquellos observados sobre la pelvis y el cráneo (figs. 1 y 2). Sin embargo, el valor de las características a ser observadas varía según el grupo humano que se esté estudiando y es necesario realizar comparaciones dentro del mismo grupo.

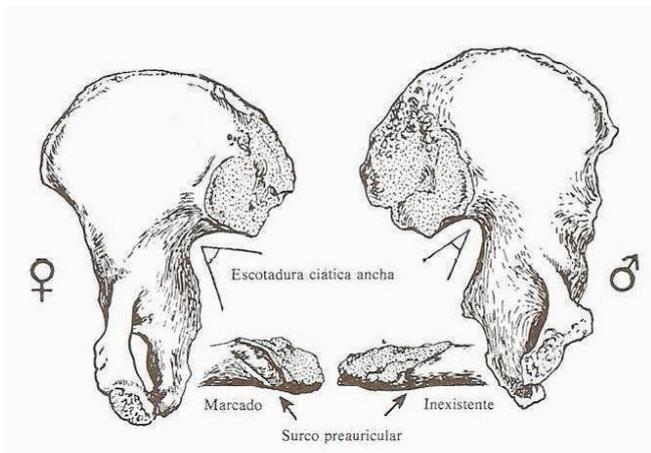


Figura 1. Dos características sexuales en pelvis adulta. Modificado de Brothwell (3).

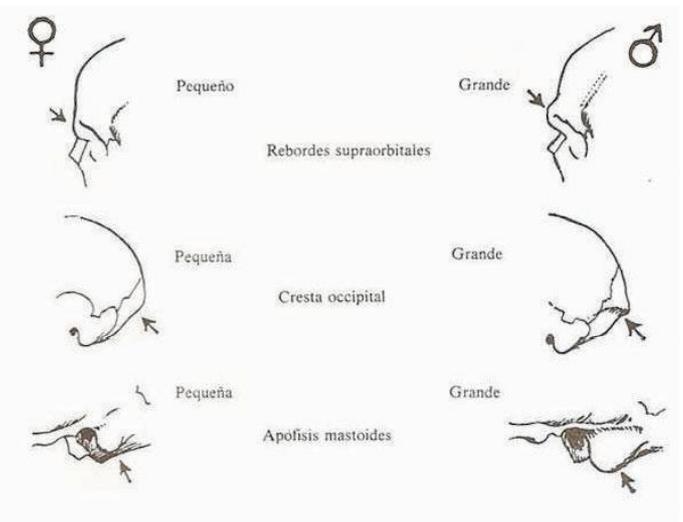


Figura 2. Características sexuales en cráneo adulto. Modificado de Brothwell (3).

La pelvis es considerada como la parte del esqueleto que nos ofrece información más fiable para la determinación del sexo en adultos y sobre ella podemos evaluar tanto rasgos cualitativos como métricos. La importancia diagnóstica de la pelvis se relaciona con que la pelvis femenina tiene una primordial importancia en la gestación y el alumbramiento, de manera que sus características han evolucionado con nuestra especie siendo capaz de conjugar el desplazamiento bípedo y el desarrollo de un canal de parto apropiado para la expulsión del recién nacido con un cerebro particularmente grande en comparación con otras especies de primates (4).

En términos comparativos generales, la pelvis ósea en el sexo masculino se caracteriza por ser más alta y estrecha que la femenina. También es más robusta y presenta las inserciones musculares más marcadas, la escotadura ciática es más estrecha y profunda y no presenta surco preauricular (fig. 1). Con respecto a aquellos caracteres que pueden ser mensurados, un ángulo subpúbico mayor a 90° es característico del sexo femenino, y el índice isquiopúbico (longitud del

isquion/longitud del pubis) y el ángulo de la escotadura isquiática son menores en el hombre. Todas estas características poseen una comprobada aplicación diagnóstica para el estudio de restos esqueléticos de individuos adultos que atravesaron el despegue puberal y que, se estima, desarrollaron los caracteres sexuales secundarios con éxito.

La determinación del sexo es un problema de difícil solución cuando se trata de individuos que no desarrollaron los caracteres sexuales secundarios (5). Se ha propuesto que los rasgos diagnósticos para la determinación del sexo en adultos también pueden ser aplicados en otros grupos etarios, pero no está claro si los resultados pueden ser interpretados con la misma confianza (6).

La secreción de testosterona por los testículos fetales, que comienza en la semana 10 y alcanza un pico en la semana 15, es determinante para la diferenciación del sexo masculino (7). De no existir esta secreción, las hormonas maternas circulantes determinarían el desarrollo del sexo femenino (8). Podemos considerar entonces, que las hormonas sexuales masculinas tienen un efecto muy temprano en el desarrollo, por lo tanto, existe manifestación de dimorfismo sexual desde etapas tempranas de la vida prenatal que podría expresarse en diferencias morfológicas en el esqueleto (9, 10, 11, 12).

El hueso ilíaco es el que ha recibido mayor atención en el intento por estimar el sexo en individuos en desarrollo, esto se debe a que la escotadura ciática ha sido considerada como el mejor indicador del sexo. Para la determinación del sexo a partir del hueso ilíaco se ha sugerido tanto la utilización de rasgos cualitativos como métricos. Los trabajos de Boucher (13) y Schutkowski (14) que buscaron diferencias sexuales en individuos inmaduros tienen sus secuelas aún en la investigación

actual (15, 16, 17, 18, 19).

Al analizar las muestras utilizadas para el estudio de la determinación del sexo, debemos considerar que es importante que estas muestras cuenten con una asignación de sexo real establecida. Las colecciones contemporáneas documentadas con mayor número de individuos dentro del rango etario de interés de este trabajo son la colección del Museo del Instituto de Medicina Forense de Szeged, Hungría (20), y la del Instituto Smithsonian, Washington, Estados Unidos (7). Sin embargo, las colecciones arqueológicas que han sido utilizadas para profundizar estas investigaciones generalmente cuentan con un número muy pequeño de individuos y utilizan amplios rangos de edad en los análisis (14, 17, 18, 19, 21).

Por último, es interesante considerar que la búsqueda de un patrón de diferenciación sexual a lo largo de toda la ontogenia no ha dado resultados consistentes. En cambio, los trabajos que consideraron lapsos pequeños del desarrollo o adultos donde la morfología permanece estable, han permitido obtener mejores conclusiones. El estudio longitudinal de Coleman (22), demuestra que las diferencias sexuales que se observan en adultos, se desarrollan a partir de variaciones en los rangos y direcciones del crecimiento en áreas locales del complejo pélvico. En este mismo sentido, González (23) demuestra que las diferencias dimórficas no son solamente la consecuencia de una mayor extensión en el período de crecimiento de los individuos de sexo masculino y que existe una divergencia en las trayectorias ontogenéticas seguidas por cada uno de los sexos.

Este artículo se propone analizar una serie de rasgos métricos en el hueso ilíaco en el período comprendido entre las 25 y 45 semanas de gestación. Este es el primer

trabajo regional que tiene como base una muestra contemporánea documentada en la que se destaca la particularidad de contar con un la información de sexo real. El objetivo último del análisis es conocer si la muestra presenta diferencias sexuales que puedan ser utilizadas en el terreno arqueológico y forense para la determinación del sexo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este trabajo se utilizó una muestra de individuos pertenecientes a la Colección Osteológica Prof. Dr. Rómulo Lambre (24). Se decidió trabajar con 62 casos (29 ♀ y 33 ♂) con edades estimadas en el período comprendido entre 25 y 45 semanas de gestación. Se agrupó la muestra en 2 conjuntos de edad uno entre 25 y 35 semanas y el otro entre 35 y 45 semanas (tabla 1).

Sexo	♀	♂	
Edad			Total
25 a 34,9 semanas	16	20	36
35 a 45 semanas	13	13	26
Total	29	33	62

Tabla 1. Composición de la muestra por sexo y grupos de edad.

La Colección está integrada por restos esqueléticos cedidos por el Cementerio Municipal La Plata y para cada uno de los individuos que componen la muestra se cuenta con información documental de sexo. El rango de edades analizado en este trabajo fue estimado a partir de la longitud de fémur.

Dado que la longitud total de fémur presenta datos perdidos debido a que algunos elementos esqueléticos estaban ausentes o deteriorados, se realizó la imputación de valores perdidos a través del método de imputación múltiple (IM) (25) que permite reemplazar los datos perdidos por valores simulados. Para la

elección del algoritmo a utilizar para las imputaciones se aplicó el diseño propuesto por Béguelin (26) y se seleccionó la estimación EM con matriz de correlación con el programa Systat 9.0, por presentar los datos más cercanos a los reales.

Luego se utilizó la ecuación de Sherwood *et al.* (27) para estimar la edad (en semanas de gestación desde el último período menstrual normal), a partir de la longitud total del fémur. Se seleccionó esta la ecuación de estimación de edad porque está desarrollada para su aplicación en restos óseos arqueológicos y forenses de entre 15 y 42 semanas de gestación.

Con el objeto de comprobar la existencia de diferencias dimórficas en el hueso ilíaco se realizó el relevamiento morfométrico con un calibre digital Mitutoyo (precisión 0.01 mm). Se seleccionaron las variables absolutas longitud y ancho, según las definiciones de Fazekas y Kósa (20) (tabla 2). Se tomaron fotografías del hueso ilíaco en vista ventral, en este caso se seleccionó el hueso izquierdo y si éste no se encontraba o estaba deteriorado se tomó el derecho. La captura de estas imágenes fue estandarizada por el uso de una cámara Lumix de Panasonic con zoom óptico 6x a 15 cm de distancia sobre fondo negro con una escala milimetrada. Sobre la imagen digital se relevó el área de la escotadura ciática mayor mediante la utilización del programa Image Pro-Plus 7 (fig 3; tabla 3).

Mediciones: Ilion

Longitud: distancia medida entre las espinas superiores anterior y
Ancho: distancia medida entre el punto medio de la curvatura de y el límite del ilion que forma la unión acetabular.

Tabla 2. Rasgos métricos de hueso ilíaco relevados con calibre digital

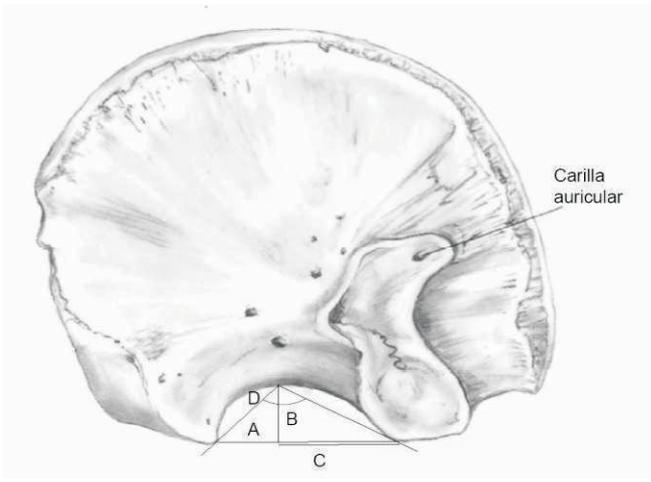


Figura 3. Ilion derecho en vista ventral con las medidas relevadas sobre imágenes digitales. A: amplitud; B: profundidad; C: distancia; D: ángulo.

Mediciones: Escotadura ciática mayor del ilion

- Amplitud:* distancia entre el extremo anterior y posterior de la escotadura ciática.
- Profundidad:* la mayor profundidad de la escotadura medida de manera perpendicular a la recta trazada en la medición de la amplitud.
- Distancia:* ubicación de la mayor profundidad (midiendo sobre la misma recta de la amplitud) la distancia desde la carilla auricular hacia el punto donde intersecta con la mayor profundidad de la escotadura.
- Ángulo:* tomando el punto de la mayor profundidad sobre el borde de la escotadura como vértice se trazaron las tangentes sobre los bordes anterior y posterior de la escotadura describiendo la apertura del ángulo.

Tabla 3. Rasgos métricos de escotadura ciática mayor relevados sobre imágenes fotográficas.

A partir de la combinación de las medidas amplitud y profundidad se calculó el *índice de la escotadura* trabajado por otros autores (13, 16, 20) y se estimaron nuevos combinando la información aportada por las variables relevadas (tabla 4).

Índices

- Índice de la escotadura:* amplitud / profundidad
- Índice d/p:* distancia / profundidad
- Índice d/a:* distancia / amplitud
- Índice d/ancho:* distancia / ancho iliaco

Tabla 4. Índices.

Se analizó la correlación de las variables con la edad. Se realizó el test de t para muestras independientes por sexo analizando las diferentes variables para el total de la muestra. Luego, bajo el supuesto de que los cambios que ocurren con el crecimiento impiden encontrar relaciones lineales que permitan la discriminación por sexos durante todo el período de desarrollo, se analizaron las variables por grupos de edad.

RESULTADOS

Se observó que las variables longitud y ancho del ilion, así como las medidas lineales tomadas sobre la escotadura (amplitud, profundidad y distancia), el ángulo y el índice distancia/amplitud tienen una significativa correlación con la edad (fig. 4).

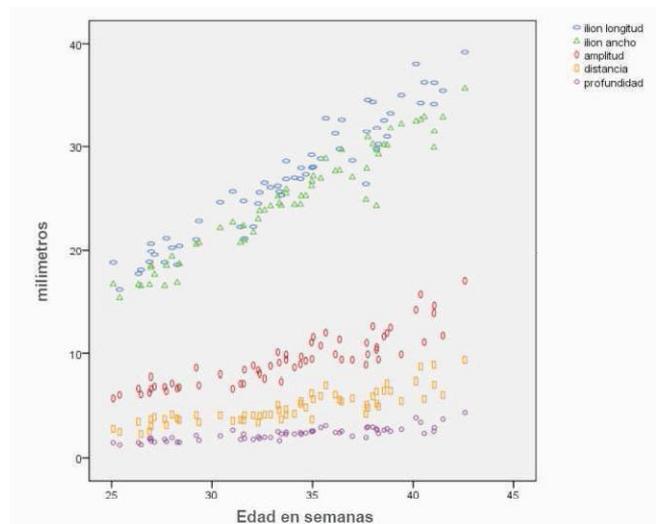


Figura 4. Diagrama de dispersión. Ilustra la relación de las variables lineales (longitud y ancho del ilion y amplitud, profundidad y distancia de la escotadura mayor, relevadas en milímetros) con la edad.

Se probó la normalidad de las variables por el test de Kolmogorov-Smirnov y se realizó el test de t para muestras independientes por sexo analizando toda la muestra y solo se encontraron diferencias significativas para el índice distancia/profundidad (t: 2,14; p: 0,03). Es interesante observar que las diferencias en el ángulo de

la escotadura (t: 1,75; p: 0,08) y el índice de la escotadura (amplitud/profundidad) (t: 1,70; p: 0,09) fueron las otras dos variables cercanas al límite de significación en la diferenciación por sexo. El resto de los índices y medidas lineales relevadas sobre ilion y escotadura ciática mayor no presentaron diferencias.

Se realizó nuevamente el test de t para muestras independientes por sexo analizando la muestra por grupos de edad. No se encontraron diferencias significativas para ninguna de las variables en el primer grupo (25 a 35,9 semanas). Sin embargo, el grupo con edades comprendidas entre las 35 y 45 semanas presentó diferencias significativas para cinco de las diez variables analizadas (tabla 5).

Test de t Igualdad de medias			
	t	df	Sig. (2-colas)
Ilion longitud	-2,257	24	0,033
Profundidad	-2,391	24	0,025
Ángulo	2,16	24	0,041
Amplitud/profundidad	2,867	24	0,008
Distancia/profundidad	2,412	24	0,024

En todos los casos se probó la homogeneidad de varianzas por el test de Levene.

Tabla 5. Variables que presentaron diferencias significativas por sexo en el grupo con edades entre 35 y 45 semanas.

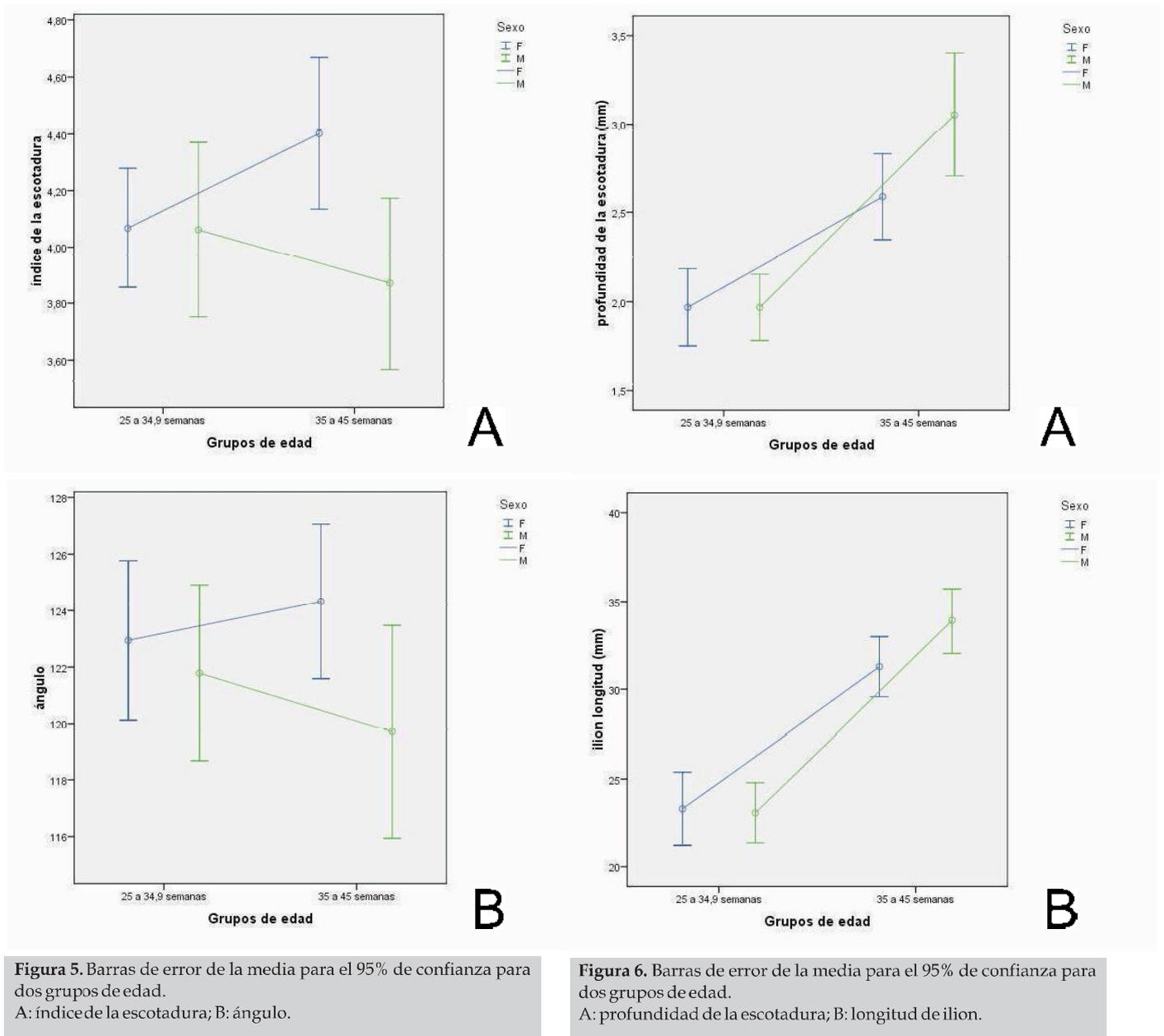
Conociendo las variables que presentan diferencias significativas, se tomaron los límites del 95% de la dispersión por sexo para cada una de las mismas y se construyó una tabla comparativa (tabla 6). Esta tabla nos permite diferenciar los individuos masculinos y los femeninos para este grupo de edad, así como encontrar un rango de valores para ambos sexos se encuentran superpuestos. La tabla fue ordenada de manera que pudieran observarse las diferencias por sexo, ubicando en los extremos los valores para +/-2 desvíos estándar para cada sexo.

	ángulo	longitud de ilion (mm)	profundidad de la escotadura (mm)	índice de la escotadura	índice distancia/profundidad
♀	133,37	25,7	1,79	5,29	3,15
indeterminado	132,19	27,69	1,89	4,87	2,68
	115,28	36,82	3,39	3,52	1,64
♂	107,23	40,02	4,21	2,87	1,46

Tabla 6. Comparación por sexo.

Esta tabla resume los valores obtenidos en la muestra para las variables que presentaron diferencias significativas por sexo en el grupo de 35 a 45 semanas y permite una aproximación para estimar el sexo para un ilion de sexo no conocido. El rango de valores incluido en la fila "indeterminado" representa los valores superpuestos para ambos sexos para cada variable. En cursiva los valores para 2 s.d. para masculinos y en negrita los femeninos. En las filas ♀ y ♂ encontramos los valores de 2 s.d. para cada uno de los sexos que no presentan superposición con el sexo opuesto. Ej: en el caso de observar una escotadura con un ángulo de 110°. La tabla informa que solo el 2,5% de la población de sexo femenino en este grupo de edad presenta un ángulo de la escotadura inferior a 115,28°, por lo que podemos suponer que se trata de un ilion cuyo sexo probable es masculino.

Por último se graficaron las variables que presentaron diferencias significativas en barras de 95% de confianza para la media, discriminando ambos grupos de edad y sexos, con el objetivo de observar como se manifestaban las diferencias. Se observó que desde el primer grupo de edad hacia el segundo (en el que se manifiestan las diferencias significativas por sexo), el ángulo y el índice de la escotadura toman caminos divergentes (figs 5 a y b).



También se observó que hay un aumento significativo en la profundidad de la escotadura en el sexo masculino, lo que se manifiesta en las diferencias encontradas en el segundo grupo. La misma tendencia se observó en la longitud del ilion (fig. 6 a y b).

Por último, el índice distancia/profundidad muestra un aumento más pronunciado en el sexo femenino. Ésta acentuación de la distancia a la mayor profundidad de la escotadura sobre la profundidad de la misma, muestra una mayor estabilidad en la relación entre distancia y profundidad en el sexo masculino y mayores modificaciones en el femenino, aunque no llega a describir una tendencia divergente entre los sexos (fig. 7).

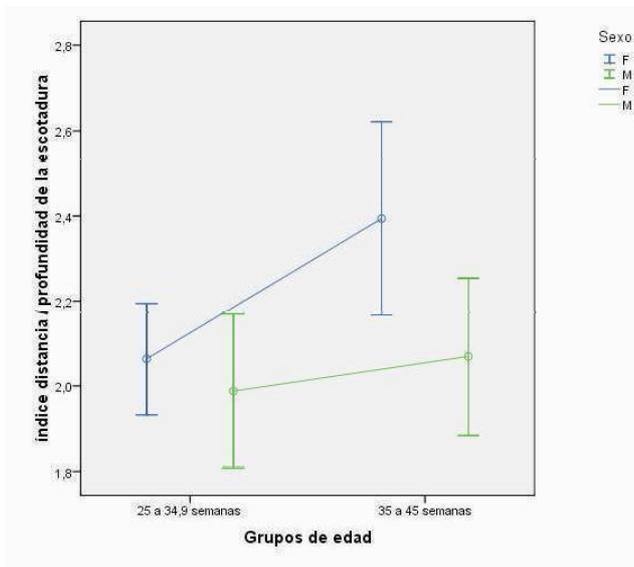


Figura 5. Barras de error de la media para el 95% de confianza para dos grupos de edad. Índice distancia/profundidad.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El centro de osificación del ilion aparece alrededor de fines del segundo y principios del tercer mes de desarrollo, en el pericondrio del techo del acetábulo, donde se constituirá la escotadura mayor y continuará la osificación en forma radiada. Para el nacimiento, el ilion ya ha desarrollado las principales características del hueso adulto. Sin embargo, el dimorfismo sexual no se manifiesta de igual manera. Han sido descritas diferencias sexuales en la pelvis fetal y juvenil, pero estas no han sido suficientes para permitir una discriminación confiable (28).

En los últimos años, se han publicado una serie de trabajos de investigación sobre dimorfismo sexual en subadultos que retoman trabajos pilares como los de Boucher (13) y Schutkowski (14) pero con nuevas metodologías de análisis, sin embargo estos nuevos estudios arrojan resultados contradictorios.

Vlak y colaboradores (18) señalan que la morfología de la escotadura mayor muestra solo un nivel marginal

de dimorfismo sexual y que, a pesar de que algunas de las diferencias fueron estadísticamente significativas, el solapamiento de las distribuciones para los sexos femenino y masculino para las medidas ajustadas por la edad, imposibilitan su uso como indicadores confiables de sexo en juveniles en todas las poblaciones. Por otra parte, mediante el análisis de Eigen-shape para recolectar datos de forma de la escotadura, Wilson y colaboradores (19) computaron funciones discriminantes basadas en el sexo conocido y alcanzaron hasta el 100% de identificaciones correctas para masculinos mediante el uso de la forma de la escotadura.

En el presente trabajo, al analizar la muestra completa encontramos diferencias significativas por sexo en el índice distancia/profundidad de la escotadura. Las comparaciones por grupo de edad nos permiten observar un cambio en la morfología, desde formas indiferenciadas en el grupo de 25 a 34,9 semanas, hacia diferencias significativas entre las 35 y 45 semanas. Esto coincide con lo observado por Hromada (1939) (28) quien identificó al tercer trimestre como la fase en la que ocurren las mayores transformaciones dimórficas en el hueso ilíaco.

El dimorfismo sexual entre las 35 y las 45 semanas postgestacionales se manifiesta en la forma general del ilion y particularmente en la escotadura mayor. En el sexo masculino disminuye la amplitud de la escotadura en relación a la profundidad de la misma, dando como resultado un menor *índice de la escotadura*, en cambio, en el sexo femenino se observa la tendencia contraria. Éstos resultados coinciden con los de Fazekas y Kósa (20) y Schutkowski (16), quienes observaron que las variables amplitud y profundidad de la escotadura son los rasgos más diagnósticos de sexo en ilion para un grupo de edad semejante al considerado en este trabajo.

También en el sexo masculino, acompañando las variaciones que ocurren en amplitud y profundidad, el ángulo de la escotadura disminuye. Esto coincide con los resultados de Vlak y colaboradores (18) quienes encontraron que en el grupo de 0 a 1 año las diferencias significativas entre sexos se encontraban en el ángulo y la profundidad de la escotadura. Los resultados del presente trabajo también concuerdan con los de Wilson y colaboradores (19) quienes encontraron que el ángulo permite altas proporciones de asignación de sexo correcta en una muestra de individuos de entre 0 y 8 años.

Conociendo que la *profundidad* y la *amplitud* de la escotadura se modifican de manera diferencial según el sexo, la distancia a la mayor profundidad ofrece otra manera de contemplar las variaciones dimórficas en la escotadura mayor. La variable *distancia* analizada en este trabajo, está inspirada en la propuesta de Holcomb y Konigsberg (15), quienes plantearon que las variaciones dimórficas están relacionadas con cambios en la ubicación de la mayor profundidad de la escotadura.

La variable *distancia* no presentó diferencias significativas por sexo y tampoco se encontraron evidencias de una relocalización diferencial de la mayor profundidad. Sin embargo, la *distancia* es mayor en el sexo femenino en todo el período de edad analizado y el índice *distancia /profundidad*, es el único caso en el que encontramos diferencias significativas tanto para la muestra completa como para el grupo de 35 a 45 semanas. Estos resultados nos indican que existen diferencias debidas al sexo, siendo la relación *distancia/profundidad* más estable para el sexo masculino en los diferentes grupos de edad.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten

afirmar que existen diferencias significativas entre los sexos en el ilion fetal y perinatal, y que esas diferencias se hacen manifiestas y estadísticamente significativas alrededor de la semana 35 de gestación. A partir de los mismos, también se confirma que durante el proceso de crecimiento se modifica la constitución del esqueleto y que en el hueso ilíaco en particular, desde formas sexualmente indiferenciadas se desarrollan diferencias en la estructura que pueden permitir su uso para contribuir a la determinación del sexo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo pudo realizarse gracias a la colaboración de los integrantes del proyecto "Análisis macro y microscópico de restos óseos humanos. Aportes a la investigación antropológica y forense" (FCM-UNLP). Agradezco especialmente a la Dra. Paula González por el apoyo, por la lectura y los valiosos comentarios realizados sobre el manuscrito.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. White TD. (2000). Human osteology. Academic Press, California.
2. Guimarey LM. (2004). Crecimiento y desarrollo físico. En: Tratado de Pediatría (3ra edición). Morano J (ed). Editorial Atlante, Buenos Aires, pp. 121-138.
3. Brothwell DR. (1981). Desenterrando huesos. Fondo de Cultura Económica, Madrid.
4. Leakey R. (2000). El origen de la humanidad. Debate, Madrid.
5. Ferembach D, Schwidetzky I, Stloukal M. (1977/79). Raccomandazioni per la determinazione dell'età e del sesso sullo scheletro. *Rivista di Antropologia Pubblicazione dell' Instituto Italiano di Antropologia Vol LX Roma*; 60: 5-51.
6. Saunders S. (2008). Juvenile skeletons and growth related studies. En: Biological Anthropology of the Human Skeleton (2da edición). Katzemberg MA, Saunders S (eds). John Wiley & Sons, Inc, New Jersey, pp. 117-147.
7. Weaver DS. (1980). Sex differences in the ilia of a known sex and age sample of fetal and infant skeletons. *American Journal of Physical Anthropology*; 52: 191-195.
8. Moore KL, Persaud TVN. (2004). Embriología Clínica (7ma edición). Elsevier, Madrid.
9. Black TK. (1978). Sexual dimorphism in the tooth-crown diameters of the deciduous teeth. *American Journal of Physical Anthropology*; 48: 77-82.
10. Garn SM, Burdi AR, Babler WJ. (1974). Male advancement in prenatal hand development. *American Journal of Physical Anthropology*; 41: 353-360.
11. Moss ML, Moss-Salentijn L. (1977). Analysis of developmental processes possibly related to human dental sexual dimorphism in permanent and deciduous canines. *American Journal of Physical Anthropology*; 45: 407-414.
12. Reynolds EL. (1945). The bony pelvic girdle in early infancy. *American Journal of Physical Anthropology*; 4: 321-354.
13. Boucher B. (1957). Sex differences in the foetal pelvis. *American Journal of Physical Anthropology*; 15: 581-600.
14. Schutkowski H. (1993). Sex determination of infant and juvenile skeletons: i. morphognostic features. *American Journal of Physical Anthropology*; 90: 199-205.
15. Holcomb SM, Konigsberg L. (1995). Statistical study of sexual dimorphism in the human fetal sciatic notch. *American Journal of Physical Anthropology*; 97: 113-125.
16. Schutkowski H. (1987). Sex determination of fetal and neonate skeletons by means of discriminant analysis. *International Journal of Anthropology*; 4: 347-352.
17. Cardoso HF, Saunders S. (2008). Two arch criteria of the ilium for sex determination of immature skeletal remains: a test of their accuracy and an assessment of intra- and inter-observer error. *Forensic Science International*; 178: 24-29.
18. Vlak D, Roksandic M, Schillaci MA. (2008). Greater sciatic notch as a sex indicator in juveniles. *American Journal of Physical Anthropology*; 137: 309-315.
19. Wilson LA, MacLeod N, Humphrey LT. (2008). Morphometric criteria for sexing juvenile human skeletons using the ilium. *Journal of Forensic Sciences*; 53: 269-278.
20. Fazekas IG, Kósa F. (1978). Forensic foetal osteology. Akademiai Kiadó Publishers, Budapest.
21. Sutter RC. (2003). Nonmetric subadult skeletal sexing traits: I. A blind test of the accuracy of eight previously proposed methods using prehistoric known-sex mummies from northern Chile. *Journal of Forensic Sciences*; 48: 1-9.
22. Coleman WH. (1969). Sex differences in the growth of the human bony pelvis. *American Journal of Physical Anthropology*; 31: 125-152.
23. González PN. (2008). Morfometría geométrica aplicada al análisis del dimorfismo sexual en restos óseos humanos de individuos adultos y subadultos [Tesis Doctoral]. La Plata: Universidad Nacional de La Plata. pp. 199.
24. Salceda S, Desántolo B, García Mancuso R, Plischuk M, Prat G, Inda A. (2009). Integración y conservación de la Colección osteológica "Profesor Doctor Rómulo Lambre": avances y problemáticas. *Revista Argentina de Antropología Biológica*; 11: 133-141.
25. Rubin D. (1978). Multiple imputation for nonresponse in surveys. John Wiley, New York.
26. Béguelin M. (2009). Variación geográfica en la morfología del esqueleto postcraneal de las poblaciones humanas de Pampa y Patagonia durante el Holoceno Tardío: Una aproximación morfométrica [Tesis Doctoral]. La Plata: Universidad Nacional de La Plata. pp. 79.
27. Sherwood RJ, Meindl RS, Robinson HB, May RL. (2000). Fetal age: methods of estimation and effects of pathology. *American Journal of Physical Anthropology*; 113: 305-315.
28. Scheuer L, Black S. (2000). Developmental Juvenile Osteology. Academic Press, Londres.

**INVASIÓN VASCULAR, EXPRESIÓN DEL RECEPTOR 2 DEL FACTOR DE
CRECIMIENTO DE ENDOTELIOS VASCULARES (VEGFR-2) Y DENSIDAD DE
MICROVASOS EN CARCINOMAS MAMARIOS DE PERRAS. VALOR PRONÓSTICO**

**VESSEL INVASION, VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR-2 (VEGFR-2)
EXPRESSION AND MICROVESSEL DENSITY IN CANINE MAMMARY CARCINOMAS. PROGNOSTIC
VALUE**

Mónica Elizabeth DIESSLER¹, María Cecilia CASTELLANO², Enrique Leo PORTIANSKY³, Sarah Lilian BURNS⁴, Julio Roberto IDIART⁵.

1-Cátedra de Histología y Embriología, Departamento de Ciencias Básicas; 2-Cátedra de Clínica de Pequeños Animales, Departamento de Ciencias Clínicas; 3-Cátedra de Patología General Veterinaria; 5-Cátedra de Patología Especial, Departamento de Ciencias Preclínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias. 4-Laboratorio de Sistemas Ecológicos y Ambientales, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. UNLP. CC 296, La Plata (B 1900 AVW). Argentina.

Autor responsable:

Mónica DIESSLER. Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP. CC 296, La Plata (B 1900 AVW). Argentina.

Tel: 0221-423 6663 x414

e-mail: diessler@fcv.unlp.edu.ar

RESUMEN. Se estudiaron 136 carcinomas mamarios de perras y sus linfonodos satélites por métodos histológicos e histoquímicos con el propósito de evaluar la presencia de émbolos carcinomatosos y la actividad angiogénica del tumor, esta última a través de la identificación de VEGFR-2 (receptor para el factor de crecimiento de endotelios vasculares-2), y del recuento de microvasos. Se estableció la relación entre la presencia de émbolos y la angiogénesis y su repercusión en el estado del linfonodo, factor pronóstico de supervivencia de valor ya demostrado en la especie. Se hallaron diferencias significativas entre las neoplasias con y sin émbolos tumorales con respecto a su capacidad de originar metástasis en los linfonodos. La magnitud de la angiogénesis fue mayor en neoplasias en las que se habían evidenciado émbolos carcinomatosos y/o metástasis.

Palabras claves: caninos, carcinomas mamarios, invasión vascular, angiogénesis, pronóstico.

ABSTRACT. One hundred and thirty six canine mammary carcinomas and their satellite lymph nodes were histological and histochemically studied. The aim of the present work was to assess the presence of carcinomatous emboli and the tumour angiogenic activity, the latter through the identification of VEGFR-2 (vascular endothelial growth factor receptor -2) and the counting of microvessels. The relation between the presence of emboli and angiogenesis and its impact on the status of the lymph nodes was established. Significant differences were found between tumours with and without emboli and their ability to cause metastasis in the lymph nodes. The extent of angiogenesis was higher in tumours that had demonstrated carcinomatous emboli and / or metastasis.

Key words: canine, mammary carcinomas, vascular invasion, angiogenesis, prognosis.

INTRODUCCIÓN

Los tumores mamarios son las neoplasias espontáneas más comunes en caninos y constituyen más del 50% del total en las perras (1). Entre 40% y 74% de las neoplasias mamarias son malignas (1, 2). El promedio de edad de las pacientes en el momento del diagnóstico oscila entre nueve y diez años y son raras en perras menores de cinco años (1). Son más frecuentes en las razas pequeñas, si bien en estas razas la proporción de neoplasias malignas es menor (3). La mayor parte de las pacientes portadoras son hembras enteras u ovariectomizadas luego del segundo celo. Las mamas abdominales caudales e inguinales, de mayor desarrollo en cada ciclo, son las más propensas a desarrollar neoplasias, las que generalmente son nodulares y pueden ser únicas o múltiples (1).

El estado de los linfonodos (LN) satélites, junto con el tamaño del tumor, son los marcadores pronósticos más relevantes relacionados con la supervivencia, tanto en humanos como en caninos (1, 4, 5).

La diseminación de los carcinomas ocurre principalmente por vía linfática (4). Aunque el drenaje linfático del tejido mamario canino es complejo, se considera al LN axilar como regional para las mamas torácicas y abdominales craneales, y a los LN inguinal superficial (mamario) e ilíaco medio como regionales para las abdominales caudales e inguinales.

Las metástasis encontradas en los LN derivan (progenie expandida) de las células del tumor primario, luego de un proceso de selección natural. Estas neoformaciones secundarias constituyen, por lo tanto, una fuente de células capaces de metastatizar hacia los pulmones, hígado, riñones, entre otros órganos distantes. La insuficiencia de estos órganos, particularmente de los pulmones (cuyo parénquima se

comprime y/o es reemplazado en distinto grado por las metástasis) causa la mayor parte de las muertes por cáncer y constituye la principal indicación para la eutanasia de las pacientes (4). La mayor parte de las metástasis son diagnosticadas en menos de un año luego del diagnóstico del tumor primario (1).

Otras características de las neoplasias, tales como la invasión de sus vasos por émbolos carcinomatosos y la magnitud de la angiogénesis, podrían ser de utilidad para el pronóstico.

Si bien es relativamente frecuente el hallazgo de émbolos neoplásicos (EN) en vasos peritumorales, su influencia en el desarrollo de metástasis en los LN es motivo de controversia (1, 6, 7). Además, las células tumorales deben evadir la destrucción tumoral inmunomediada, por lo que la mayoría de las mismas tiene poca supervivencia en el torrente sanguíneo (8).

La frecuencia informada de EN en carcinomas mamarios en caninos varía entre 1,6-4:10 (3, 9, 10). No existe consenso con respecto a la relación entre la invasión a los vasos y el pronóstico en esta especie (2), aunque algunos autores observaron correlación entre el hallazgo de EN y la disminución de las probabilidades de supervivencia a 18 y 24 meses (3, 10).

La angiogénesis juega un rol central en las neoplasias mamarias, tanto en el crecimiento tumoral como en el desarrollo de metástasis a distancia (11, 12, 13). Para constituir un marcador de valor, este proceso debe estimarse de manera cuantificable y ser reproducible en casos clínicos. Es posible establecer la densidad de microvasos (DMV) de la masa tumoral, considerándolos como producto del fenómeno de angiogénesis, así como medir la expresión de algunos de los factores involucrados en las vías de señalización (factores de crecimiento -GF-, receptores, etc.) (12). El

crecimiento y la progresión tumoral dependen del abastecimiento sanguíneo, ya que ambos procesos están limitados por el acceso a O₂, nutrientes y GF provenientes de la circulación. La red vascular posibilita, asimismo, la eliminación de desechos (8, 14). Por otro lado, esos nuevos vasos aumentan la oportunidad de las células neoplásicas de llegar a la circulación general y alcanzar sitios distantes. Si bien el término “angiogénesis” se usó para describir el crecimiento de brotes vasculares a partir de vénulas poscapilares preexistentes (proceso prácticamente ausente en el organismo adulto en estado de salud), se utiliza en la actualidad de manera más amplia para denotar el crecimiento y remodelación de la red vascular primitiva en una más compleja. La adquisición de la capacidad angiogénica puede ser una expresión de la progresión desde la transformación neoplásica de la población en cuestión hasta su crecimiento y el desarrollo de metástasis (14). Entre los factores proangiogénicos, la familia del factor de crecimiento de endotelios vasculares (VEGF) y sus receptores (VEGFR) es la mejor caracterizada y constituye el foco de la investigación básica y de desarrollo de la industria farmacéutica en el campo de la oncología. Se trata de una familia de glicoproteínas: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y los factores de crecimiento placentarios 1 y 2 (PlGF 1 y 2), consideradas claves en la vasculogénesis y la angiogénesis, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. VEGF se une a sus receptores, de tipo tirosinquinasa, en las células endoteliales y otras células (15, 16, 17, 18). Su síntesis se incrementa fundamentalmente por la hipoxia, acidosis e hipoglucemia. Diversos autores describieron los siguientes receptores para los GF: VEGFR1 o Flt-1 (*fms like tyrosin kinase*), VEGFR2 o KDR (*kinase-insert domain*

containing receptor) o su homólogo murino Flk-1 (*fetal liver kinase*), VEGFR3 (Flt-4) y VEGFR4 (15, 16). Los diferentes receptores se unen a uno o más ligandos, desencadenándose respuestas disímiles (14, 15, 16).

Flk-1 se expresa en endotelios sanguíneos y regula la mayoría de los efectos del VEGF en proliferación, aumento de permeabilidad, invasión, migración y supervivencia celular (9). La ausencia de islotes y vasos sanguíneos en embriones carentes de VEGFR-2 (VEGFR-2^{-/-}) indica que el patrón de señalización que lo involucra es requerido tempranamente en el desarrollo del linaje endotelial (15). Asimismo, se encontró correlación entre la expresión del VEGF y la de su receptor VEGFR-2 (17, 19).

También fue descripta la presencia de Flt-1 y Flk-1 y sus co-receptores (neuropilinas) en las células de tumores, tales como carcinomas pulmonares (excepto el de células pequeñas), próstáticos, mamarios y melanomas y en los vasos adyacentes a los mismos, lo que sugiere que el VEGF podría desempeñar roles adicionales a través de tales receptores mediante comunicación autocrina (9, 17, 18, 19).

La angiogénesis y su relación con el comportamiento biológico de las neoplasias todavía están poco comprendidas en oncología veterinaria. En caninos no se encontró asociación entre la mayor cantidad de vasos y la invasión a los mismos (9). En coincidencia con lo que ocurre en humanos, la sobreexpresión del sistema VEGF/VEGFR está asociada a la progresión en neoplasias mamarias en caninos (12, 16, 19, 20, 21).

La investigación de los desórdenes propios de la carcinogénesis y de la progresión del tumor en los caninos puede aportar conocimientos acerca de la patogenia y de los patrones de comportamiento de las

neoplasias en esta especie, de particular utilidad para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento. El objetivo de este trabajo fue establecer la existencia y magnitud de la asociación entre la angiogénesis tumoral y la invasión vascular con el desarrollo de metástasis en los LN.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente estudio se analizaron 136 casos de carcinomas mamarios invasivos. Los carcinomas *in situ* fueron excluidos del análisis. El proceso de angiogénesis se estudió mediante inmunohistoquímica (IHQ), midiendo la expresión del VEGFR2 y la DMV. La presencia de EN en las neoplasias y de metástasis en los LN, así como la clasificación histológica de los tumores, se determinó mediante observación de cortes coloreados con hematoxilina-eosina (HE).

Para las técnicas de IHQ se utilizaron cortes de los órganos, montados sobre portaobjetos con cargas positivas (Superfrost plus® A100018, Deltalab). En los casos de neoplasias múltiples, sólo se procesaron mediante IHQ aquellas cuyo tipo y grado histológicos habían sido diagnosticadas como menos diferenciadas. Los cortes fueron procesados mediante la técnica de inmunoperoxidasa con el sistema de detección estreptavidina-biotina con peroxidasa de rábano picante (LSAB2 System, K0673. DAKOCytomation, Carpintería, USA). Para la recuperación antigénica los cortes desparafinados fueron sumergidos en tampón de citrato y calentados en horno de microondas durante dos ciclos de 5 minutos cada uno. Para inhibir las uniones inespecíficas del anticuerpo con el tejido, los cortes fueron cubiertos con leche descremada en polvo comercial, al 4% en solución de tampón de fosfato (PBS), durante 20 minutos. El inmunoprecipitado fue puesto de manifiesto mediante tratamiento con 3,3'-

diaminobencidina (DAB) incluida en el LSAB2 System. En todos los casos, el control negativo de la técnica lo constituyó un corte procesado simultáneamente con aquellos en estudio según el mismo protocolo, a excepción de la incubación con el anticuerpo primario. La reacción positiva se evidenció mediante la coloración parduzca de las zonas conteniendo la proteína buscada. Para estimar la expresión del VEGFR2, el anticuerpo utilizado fue el Flk-1-A/3-: sc-6251 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA), concentración: 1/100. Un corte histológico de tejido corneal fue utilizado como control negativo de la reacción.

Para la cuantificación de la inmunomarcación, se capturaron las imágenes correspondientes a 20 campos de cada uno de los 136 casos, utilizando un objetivo de 40X, mediante una cámara digital (DP71, Olympus, Japón), montada sobre un microscopio (Olympus BX50) y conectada a una computadora. Las imágenes fueron almacenadas con una resolución de 640x480 pixeles, color real (RGB) y formato TIFF, con una relación de 0,32 $\mu\text{m}/\text{pixel}$. Mediante un programa de análisis de imágenes (ImagePro Plus, v6.3, Media Cybernetics) se determinaron los parámetros correspondientes al área y la densidad óptica de marcación de cada imagen analizada (valores mínimos, máximos, promedio, sumatoria, desvío estándar). De la multiplicación de los valores del área y de la densidad óptica se obtuvieron los datos de la densidad óptica integrada (DOI), la densidad óptica integrada/ mm^2 (DOI/ mm^2) y la densidad óptica integrada / máxima intensidad de marcación (DOI/IM). La DOI fue el parámetro utilizado para el análisis comparativo de los datos.

Para estimar la DMV, se inmunomarcaron células endoteliales con el anticuerpo anti-vWf, clon F8/86, M 0616 (Dakocytomation), concentración 1/50. Se realizó

el recuento manual de estructuras marcadas en 20 campos (objetivo 40X), ya fueran microvasos con luz, células, grupos celulares o estructuras en cordón. Los primeros 20 cortes procesados fueron analizados por dos observadores para establecer el criterio de selección de las imágenes a clasificar como “positivas” o “negativas”. El resto de los casos fue analizado por un solo observador. Los resultados se expresaron como: elementos positivos por campo de 40 X. Mediante este dato y el de la superficie del campo de observación (0,075 mm²) se calculó el número de elementos por mm², el que fue utilizado para el análisis de los resultados.

Los datos numéricos obtenidos fueron exportados a una planilla de cálculo (SPSS 10.0.1, USA o Microsoft[®] Excel 2002, USA) para su estudio estadístico. Para la comparación de medias se utilizó la prueba de t (previo análisis de la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene, SPSS). Para la comparación de variables cualitativas se utilizó la prueba de χ^2 (Microsoft[®] Excel 2002). Para transformar datos cuantitativos en cualitativos, los primeros se agruparon en categorías en función de la mediana (DMV baja/alta). Para determinar la asociación entre variables cuantitativas se obtuvieron coeficientes de correlación de Pearson y Spearman (SPSS). Como análisis multivariado se llevó a cabo el procedimiento de regresión logística múltiple por pasos para seleccionar las variables de valor pronóstico del estado del LN. En todos los análisis, el valor de $P \leq 0,05$ fue considerado como significativo para establecer las diferencias entre poblaciones.

RESULTADOS

Los resultados relacionados con la invasión vascular en forma de EN carcinomatosos, el

compromiso del LN y la angiogénesis de cada tumor se presentan en las tablas 1 a 4. En 40 de los 136 casos estudiados se observaron émbolos neoplásicos (Fig. 1). De estos, 4 no presentaban metástasis en los LN. En 74 casos, se observaron metástasis en el LN (Fig. 2). De estos, la mitad presentaron EN. El *odds ratio* para la

CASO	ARFA	D	DOI	DOI/mm ²	DOI/AIM	DMV/campo	DMV/mm ²
1	4358,2	152,5	11939	1.52E+08	65,8	1,89	25,3
2	1050,6	154,2	162491	1.54E+08	15,6	8,9	118,7
3	38,2	155,3	5939	1.55E+08	0,6	8	106,7
4	53,3	153,5	8176	1.53E+08	0,8	5,4	72
5	117,6	153,4	18030	1.53E+08	1,8	18,2	242,7
6	592,7	155,6	92237	1.56E+08	8,8	4,6	61,3
7	603,6	154,5	93338	1.55E+08	9	1,9	25,3
8	160,3	154,7	24808	1.55E+08	2,4	11	146,7
9	638,9	156,9	99192	1.57E+08	9,5	4	53,3
10	51,8	155,3	8056	1.55E+08	0,8	3,7	49,3
11	3409,4	156,7	8309	1.57E+08	50	2	26,7
12	12,3	157	1932	1.57E+08	0,2	5	66,7
13	969,8	154	149293	1.54E+08	14,5	2,5	33,3
14	1407,8	158,2	222547	1.58E+08	20,5	2,9	38,7
15	75,5	156,3	11795	1.56E+08	1,1	4	53,3
16	2,8	153,4	400	1.53E+08	0	2,4	32
17	284	154	48704	1.54E+08	4,2	1,7	22,7
18	433,7	154,6	66984	1.55E+08	6,5	8,5	113,3
19	30,3	156,5	4747	1.56E+08	0,4	4,3	57,3
20	6,9	157,8	1089	1.58E+08	0,1	5,8	77,3
21	856,6	155,3	133042	1.55E+08	12,7	14	186,7
22	1	156,1	154	1.56E+08	0	6,2	82,7
23	368,4	157	58020	1.57E+08	5,4	10,4	138,7
24	7,9	156,1	1227	1.56E+08	0,1	7	93,3
25	92,3	156	14395	1.56E+08	1,4	7,9	97,3
26	61,8	155,3	9611	1.55E+08	0,9	5,3	70,7
27	59,6	155,9	9285	1.56E+08	0,9	5,4	72
28	60	155,2	9312	1.55E+08	0,9	1,1	14,7
29	99,2	156	15488	1.56E+08	1,5	8,8	117,3
30	86,7	157	13617	1.57E+08	1,3	6,2	82,7
31	3745,2	156,5	10696	1.56E+08	55,6	1,7	22,7
32	48,5	155,8	7572	1.56E+08	0,7	2,5	33,3
33	38,6	156,2	6034	1.56E+08	0,6	1	13,3
34	428,9	156,3	67040	1.56E+08	6,3	9,3	124
35	155,2	156,1	24287	1.56E+08	2,3	4	53,3
36	50	156,4	7821	1.56E+08	0,7	1	13,3
37	107	155,2	16627	1.55E+08	1,6	4	53,3
38	502,5	155,9	78276	1.56E+08	7,4	7,1	94,7
39	380	155,9	59370	1.56E+08	5,6	4	53,3
40	527,5	156,2	82429	1.56E+08	7,8	2,6	34,7
41	58,1	155,4	9059	1.55E+08	0,9	4	53,3
42	975,7	149,1	146344	1.49E+08	20	9	120
43	105,3	154,4	16243	1.54E+08	1,6	2,2	29,3
44	438,6	155	68106	1.55E+08	6,5	4,5	60
45	203	155,1	31484	1.55E+08	3	2	26,7
46	136,5	154,9	21157	1.55E+08	2	4,4	58,7
47	657,6	156,2	102801	1.56E+08	9,7	4	53,3
48	644,9	155	99994	1.55E+08	9,6	12	160
49	258,5	156,2	40432	1.56E+08	3,8	4,3	57,3
50	285,6	155	44279	1.55E+08	4,2	5,2	69,3
51	227,1	154,6	35068	1.55E+08	3,4	0,2	2,7
52	530,3	156,6	82998	1.57E+08	7,8	4,9	65,3
53	198,5	155,9	30945	1.56E+08	2,9	5,3	70,7
54	172,3	154,9	26659	1.55E+08	2,6	2,8	37,3
55	125,1	155,6	19420	1.56E+08	1,9	4,1	54,7
56	2441,3	155,5	379809	1.56E+08	36,1	6,39	85,3
57	762,8	155,7	118841	1.56E+08	11,3	4,2	56
58	976,2	156,3	152662	1.56E+08	14,4	3	40
Promedio	537,45	155,45	53200,17	1.55E+08	8,07	5,14	68,53
Total casos	58						

Tabla 1. Expresión del VEGFR-2 y de la DMV en las neoplasias sin EN (EN-) y LN negativos (LN-). VEGFR-2: receptor 2 del factor de crecimiento de endotelios vasculares; DMV: densidad de microvasos; EN: émbolos neoplásicos; LN: linfonódulo; D: densidad; DOI: densidad óptica integrada; AIM: área inmunomarcada.

CASO	ARFA	D	DOI	DOI/mm ²	DOI/AIMDMV/campo	DMV/mm ²	
59	160,1	149,7	29940	1.50E+08	2,5	4,7	62,7
60	763,6	156,2	119254	1.56E+08	11,2	14	186,7
61	3216,3	153,2	492600	1.53E+08	48,3	11,1	148
62	190	153,8	29253	1.54E+08	2,8	17,7	236
63	1531,1	154,4	236507	1.54E+08	22,8	7,8	104
64	831,9	154,3	128369	1.54E+08	12,4	13,2	176
65	3162,5	156,2	493323	1.56E+08	46,6	5,9	78,7
66	2675,8	155,2	415403	1.55E+08	39,6	4,2	56
67	2921,5	155,6	455335	1.56E+08	43,1	7	93,3
68	182,5	153,7	28061	1.54E+08	2,7	9	120
69	3634,3	154,4	561383	1.54E+08	54,1	7,1	94,7
70	368,4	157	58020	1.57E+08	5,4	9,1	121,3
71	842,1	155,9	131326	1.56E+08	12,4	3,3	44
72	5948,9	156,2	929148	1.56E+08	87,6	11	146,7
73	889,8	155,1	138068	1.55E+08	13,2	6,5	86,7
74	5328,2	153,8	830835	1.56E+08	78,6	7	93,3
75	4666	156,6	731958	1.57E+08	68,4	11,8	157,3
76	3134,1	156,7	491452	1.57E+08	46	6	80
77	2898,9	153,7	445426	1.54E+08	43,4	6	80
78	1302	155,8	202939	1.56E+08	19,2	7,9	105,3
79	5708,5	156,6	894398	1.57E+08	83,8	4	53,3
80	4342,1	156	676883	1.56E+08	64,1	6	80
81	944,4	156	147327	1.56E+08	13,9	2,1	28
82	761,3	156	118761	1.56E+08	11,2	5	66,7
83	1973,5	157,1	310520	1.57E+08	28,8	2	26,7
84	1230	155,8	191471	1.56E+08	18,2	3,9	52
85	1175	156,7	184075	1.57E+08	17,3	8	106,7
86	4098,7	155,4	636503	1.55E+08	60,7	1	13,3
87	4724,3	156,7	739931	1.57E+08	69,4	3,3	44
88	4381,4	156	684156	1.56E+08	64,5	10,9	145,3
89	2932	155,7	456438	1.56E+08	43,3	14,1	188
90	2676,6	156,1	417850	1.56E+08	39,4	5,1	68
91	2164,6	155,2	335877	1.55E+08	32,1	3,9	52
92	382,5	153,8	95738	1.55E+08	4,6	0,9	12
93	3510,8	155,3	545654	1.55E+08	52	4	53,3
94	3508,1	155,7	545849	1.55E+08	51,9	11	146,7
95	226,4	154,6	35088	1.55E+08	3,4	0,3	4
96	2194,9	156	342177	1.56E+08	32,4	5,2	69,3
Promedio	2410,06	155,57	376349,89	1.58E+08	35,56	6,87	91,38
Total casos	38						

Tabla 2. Expresión del VEGFR-2 y DMV en las neoplasias sin EN (EN-) y LN positivos (LN+).

VEGFR-2: receptor 2 del factor de crecimiento de endotelios vasculares; DMV: densidad de microvasos; EN: émbolos neoplásicos; LN: linfonódulo; D: densidad; DOI: densidad óptica integrada; AIM: área inmunomarcada.

CASO	ARFA	D	DOI	DOI/mm ²	DOI/AIMDMV/campo	DMV/mm ²	
97	470,2	153,5	72136	1.54E+08	7	6,5	86,7
98	313,9	154,1	48320	1.54E+08	4,7	4,1	54,7
99	236,9	155,5	36853	1.55E+08	3,5	5	66,7
100	2116	155,2	328734	1.55E+08	31,3	4,7	62,7
Promedio	784,25	154,58	121510,75	1.55E+08	11,63	5,08	67,7
Total casos	4						

Tabla 3. Expresión del VEGFR-2 y DMV en las neoplasias con EN (EN+) y LN negativos LN(-).

VEGFR-2: receptor 2 del factor de crecimiento de endotelios vasculares; DMV: densidad de microvasos; EN: émbolos neoplásicos; LN: linfonódulo; D: densidad; DOI: densidad óptica integrada; AIM: área inmunomarcada.

CASO	ARFA	D	DOI	DOI/mm ²	DOI/AIMDMV/campo	DMV/mm ²	
101	3020,9	155,2	468780	1.55E+08	44,8	11	146,7
102	927,2	155,2	143896	1.55E+08	13,7	4	53,3
103	132,3	154,2	20463	1.54E+08	2	11,5	153,3
104	2113,4	155,7	328784	1.56E+08	31,2	17,1	228
105	527,2	154,8	81640	1.55E+08	7,8	4,5	60
106	2781,7	156,7	435739	1.57E+08	40,8	15	200
107	775,4	155,8	120829	1.56E+08	11,4	5	66,7
108	4168,8	154,5	643343	1.55E+08	62,1	6,2	82,7
109	5434,6	156,9	859079	1.57E+08	79,8	7	93,3
110	6459,3	156,6	1011093	1.57E+08	94,9	8,8	117,3
111	3866,4	154	595951	1.54E+08	57,7	5	66,7
112	2410,5	155,2	373808	1.55E+08	35,8	7	93,3
113	1137,9	155,3	176643	1.55E+08	16,9	3	40
114	3656,8	153,9	562741	1.54E+08	54,7	1,4	18,7
115	4340,4	155,5	675213	1.56E+08	64,2	7	93,3
116	6865,2	155,8	1069427	1.56E+08	101,4	9	120
117	277,3	161,5	44975	1.61E+08	3,9	5,2	69,3
118	5128,8	156	799216	1.56E+08	75,7	5,2	69,3
119	2163,9	156,3	337676	1.56E+08	31,9	5	66,7
120	3108,4	155,9	483633	1.56E+08	46	7,6	101,3
121	917,2	155,9	142970	1.56E+08	13,5	9,3	124
122	5833,1	156,6	912311	1.57E+08	85,8	10	133,3
123	2584,4	156,4	404472	1.56E+08	38	7,5	100
124	4680,5	156	729946	1.56E+08	69	18	240
125	3499,5	156,3	546982	1.56E+08	51,5	5,2	69,3
126	2904,7	155,7	452051	1.56E+08	42,9	9	120
127	5430,7	155,9	846389	1.56E+08	80,1	8,2	109,3
128	5098	155,9	795041	1.56E+08	75,2	9,9	132
129	4619,7	156,5	723148	1.56E+08	67,9	1,7	22,7
130	2786	156,3	436267	1.56E+08	40,9	2,1	28
131	195,3	154,1	30077	1.54E+08	2,9	0,5	6,7
132	5875,3	155,6	914166	1.56E+08	86,9	9	120
133	5364,3	155,2	832365	1.55E+08	79,5	11,8	157,3
134	1676,8	156,1	261693	1.56E+08	24,7	18	240
135	3121,5	155,5	485170	1.56E+08	46,2	6,4	85,3
136	3728,3	156,5	584255	1.56E+08	54,7	14,2	189,3
Promedio	3266,99	155,82	506948,11	1.56E+08	48,23	7,95	106,03
Total casos	36						

Tabla 4. Expresión del VEGFR-2 y DMV en las neoplasias con EN (EN+) y LN positivos (LN+).

VEGFR-2: receptor 2 del factor de crecimiento de endotelios vasculares; DMV: densidad de microvasos; EN: émbolos neoplásicos; LN: linfonódulo; D: densidad; DOI: densidad óptica integrada; AIM: área inmunomarcada.

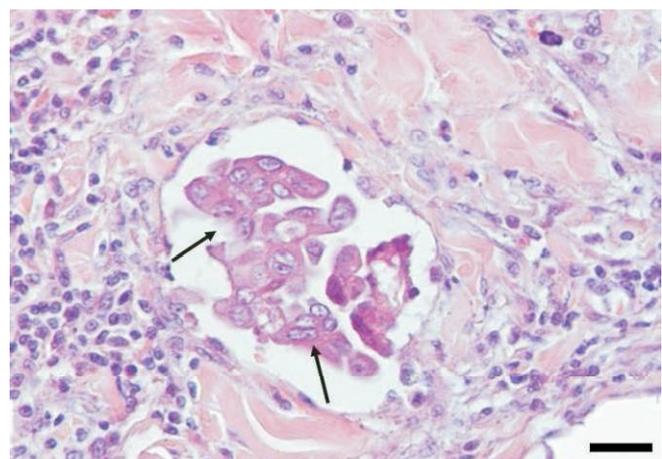


Figura 1. Émbolo neoplásico. En la sección transversal de un vaso linfático mamario de una hembra canina se observa un émbolo neoplásico (flechas) formado por un cúmulo de células morfológicamente similares a las observadas en el tumor primario. Tinción H-E. Objetivo 40x. Barra = 50 µm.

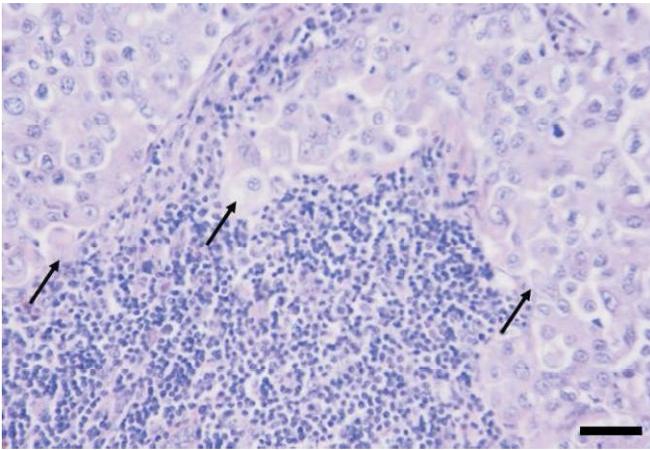


Figura 2. Células tumorales metastásicas. En el linfonódulo inguinal superficial de una hembra canina con carcinoma de mama, pudieron observarse células metastásicas (flechas) con características morfológicas similares a las células del tumor primario. Tinción H-E. Objetivo 40x. Barra = 50 μ m.

probabilidad de hallar un LN+ a partir de una neoplasia con EN frente a una sin EN fue de 9:1. De acuerdo a la prueba del χ^2 la diferencia encontrada entre los grupos que presentaron LN con y sin EN fue altamente significativa ($P < 0,0001$).

Para la identificación de VEGFR2 se observó marcación parda positiva, tanto en células carcinomatosas como en células endoteliales, en todos los casos procesados (Fig. 3).

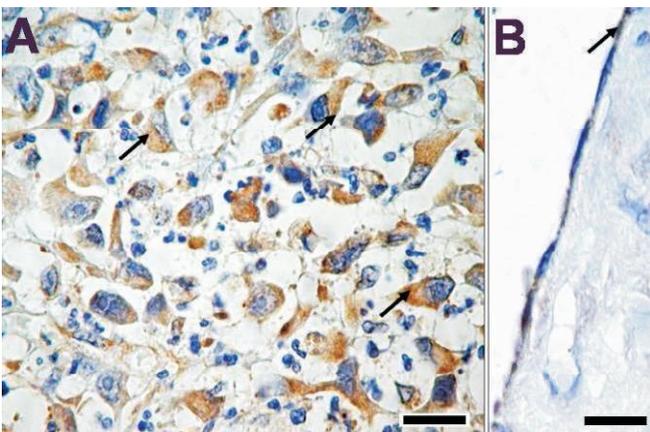


Figura 3. IHQ para la detección de VEGFR2. A. En un corte de un carcinoma mamario simple anaplásico de una hembra canina se observaron células tumorales parduzcas, lo que indica una reacción positiva al anticuerpo anti-*Flk-1*, ampliamente distribuida en la membrana celular y el citoplasma (flechas). Objetivo 40x. Barra = 50 μ m. B. La misma reacción pudo ser observada en células endoteliales. Objetivo 100x. Barra = 20 μ m.

Cuando se utilizaron técnicas para la identificación de DMV, la marcación fue positiva tanto en microvasos como en células y en grupos celulares, algunos cordones (Fig. 4).

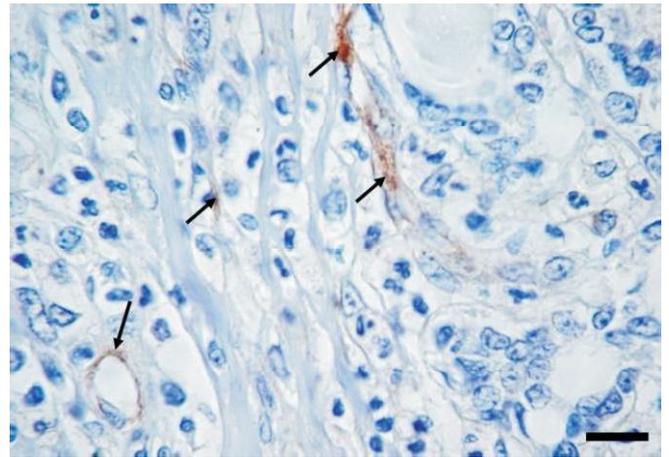


Figura 4. IHQ para la detección de células endoteliales. En un corte de un carcinoma mamario tubular simple de una hembra canina se observaron células parduzcas (reacción positiva) correspondiente a células endoteliales (flechas), cuando el tejido fue incubado con el anticuerpo anti-vWF-1. Esta reacción permitió la posterior determinación de la DMV. Objetivo 40x. Barra = 50 μ m.

En los tumores estudiados se puso en evidencia la significativa asociación entre la expresión del VEGFR-2 y la DMV ($P < 0,015$) (Tablas 1 a 4). En las neoplasias que originaron EN se encontró mayor número de vasos y expresión del VEGFR-2 significativamente más alta que en aquellas en las que no se observó invasión vascular ($P = 0,0001$ para DMV y 0,014 para VEGFR-2). Cuando los estimadores de angiogénesis se consideraron como variables cualitativas (DOI de VEGFR-2 baja/alta, DMV baja/alta, en relación a la mediana) la diferencias significativas se mantuvieron entre EN/VEGFR2 pero no entre EN/DMV.

Tanto la expresión del VEGFR-2 como la DMV (considerada por unidad de superficie) se asociaron estrechamente con la probabilidad de desarrollo de metástasis en el LN ($P < 0,0009$).

Mediante análisis multivariado (regresión logística múltiple por pasos) sólo la presencia de EN y la expresión del VEGFR-2 fueron seleccionadas para la predicción del estado del LN, observando diferencias altamente significativas ($P= 0,007$ y $P< 0,001$, respectivamente). Las variables, valor de la estimación, límites del intervalo de confianza y valores de P se muestran en la Tabla 5.

variable seleccionada	estimación	limite menor (intervalo de confianza, 95 %)	limite mayor (intervalo de confianza, 95 %)	p
EN	0.938	0.252	1.624	0.007
DOI	0.0001	0.000001	0.001	<0.001

Tabla 5. Análisis de regresión logística múltiple por pasos. La presencia de EN y la expresión del VEGFR-2 fueron seleccionadas para la predicción del estado del LN.

DISCUSIÓN

Tanto la frecuencia de neoplasias con EN como la de aquellas con metástasis en los LN se encontraron dentro del rango informado por otros autores (3, 9, 10). Con respecto a la controversial relación entre ambas variables, en este estudio las diferencias encontradas en el hallazgo de metástasis en el LN entre neoplasias con o sin EN fueron de muy alta significación..

En concordancia con otros trabajos, se puso de manifiesto la presencia del VEGFR-2, tanto en células endoteliales como en células carcinomatosas, lo que sugiere la existencia de comunicación auto y paracrina entre las células mencionadas durante los procesos mediados por VEGFR-2 (9, 18, 19, 21).

Se considera que la vía de señalización iniciada por el VEGF y sus receptores es protagónica durante la angiogénesis. Sin embargo, los resultados referidos a la asociación entre la expresión del VEGF y la DMV en tejidos mamarios en caninos son contradictorios (9). Según los resultados obtenidos en este trabajo, la expresión del VEGFR-2 y la de DMV se encuentran

relacionadas. No se hallaron datos publicados con los que contrastar esta observación.

De acuerdo con los análisis realizados en neoplasias de humanos, la mayor DMV estaría relacionada con el hallazgo de EN (7, 13). En las muestras analizadas en este trabajo, tanto la expresión del VEGFR-2 como la DMV fueron proporcionales al número de casos con émbolos, en contraposición a lo informado previamente para los caninos por Millanta y colaboradores (9). Las diferencias pueden atribuirse al número de muestras estudiadas (sólo 29 tumores) y la probabilidad de que las diferencias de hallazgo de EN entre tumores de baja o alta DMV se debieran al azar fue de 0,08.

Es posible especular con una relación causal directa entre la magnitud de la angiogénesis y la presencia de EN, no sólo porque el aumento en el número de vasos podría significar un lecho vascular más amplio para ser invadido, sino, además, porque debido a las características histológicas de los vasos neoformados (lámina basal fragmentada o ausente, células endoteliales con fenestraciones, espacios intercelulares, ausencia de pericitos) éstos son muy permeables, de manera que la activa intravasación de células tumorales es ayudada por estas características estructurales (12). Sin embargo, el hecho de clasificar un caso particular como de DMV baja o alta no permitiría realizar ninguna especulación con respecto a una posible embolización no detectada en los cortes en estudio y, por lo tanto, no tendría mayor utilidad que la realización de mayor número de cortes.

Con respecto a la vía VEGF/VEGFR, el receptor VEGFR-2, cuya expresión se analizó en el presente

del GF en proliferación, invasión, migración y supervivencia de células endoteliales y carcinomatosas, actividades que propenden al desarrollo de metástasis. Según Nakopoulou (19), no se ha establecido relación entre la expresión del VEGFR-2 y el hallazgo de metástasis o el tiempo de supervivencia. En el presente trabajo, la mayor expresión del VEGFR-2 se asoció fuertemente con mayores probabilidades de desarrollo de metástasis en el LN.

La magnitud de la vascularización tumoral se ha relacionado en numerosos estudios de medicina humana con factores de reconocido valor pronóstico, como el hallazgo de metástasis en el LN e incluso el tiempo de supervivencia global (11, 13). De los resultados aquí presentados se infiere una asociación estrecha entre la cantidad de vasos, expresada en cantidad de vasos por unidad de superficie, y la contingencia de su invasión y establecimiento de metástasis en los LN de las perras afectadas.

La supervivencia de las perras portadoras de éstas neoplasias puede estimarse asertivamente mediante el hallazgo de metástasis en los LN satélites. Sin embargo, ante la eventualidad de la remisión de la neoformación primaria como única muestra se vuelve imperioso el estudio, caracterización y ponderación de parámetros propios de la masa tumoral. En ese contexto, la asociación evidenciada entre el hallazgo de EN, la angiogénesis y el estado del LN adquieren relevancia en el momento de emitir el pronóstico y tomar decisiones terapéuticas en las perras con carcinomas mamarios.

La determinación de la magnitud de la angiogénesis medida por la expresión del VEGFR-2 y la DMV, aunque no estandarizada en los laboratorios de patología veterinaria, constituye una valiosa herramienta para estimar la progresión de la ión

enfermedad. La evaluación de la invasión vascular y su inclusión rutinaria en los informes anatomopatológicos, de probada factibilidad, se vuelven necesarias en virtud del aporte que pueden constituir para los médicos veterinarios actuantes en los casos clínicos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la asistencia técnica de las Hts. C Aralda y L Díaz.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sorenmo K. (2003). Canine mammary gland tumors. *Vet Clin Small Anim*; 33: 573-596.
2. Misdorp W, Else RW, Hellmén E, Lipscomb TP. (1999). Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. 2º serie. Vol VII. Washington: AFIP. USA.
3. Itoh T, Uchida K, Ishikawa K, Kushima K, Kushima E, Tamada H *et al.* (2005). Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: differences between small-breed dogs and others. *J Vet Med Sci*; 67 (3): 345-347.
4. Sleeman JP. (2000). The lymph node as a bridgehead in the metastatic dissemination of tumors. *Recent Results Cancer Res*; 157: 55-81.
5. Greene FL, Page DL, Fleming ID (eds.) Fritz A, Balch CM. (2002). AJCC Cancer Staging Handbook. Parte VII. 6º edición. New York: Springer Verlag. USA.
6. Westened PJ, Meurs CJC, Damhuis RAM. (2005). Tumor size and vascular invasion predict distant metastasis in stage I breast cancer. Grade distinguishes early and late metastasis. *J Clin Pathol*; 58: 196-201.
7. Kato T, Kameoka S, Kimura T, Nishikawa T, Kobayashi M. (2003). The combination of angiogenesis and blood vessel invasion as a prognostic indicator in primary breast cancer. *Br J Cancer*; 88:1900-1908.
8. Cullen JM, Page R, Misdorp W. (2002). An overview of cancer pathogenesis, diagnosis and management. En: Meuten DJ. Tumors in Domestic Animals. 4º ed. Ames: Iowa State University Press, pp. 3-36.
9. Millanta F, Silvestri G, Vaselli C, Citi S, Pisani G, Lorenzi D *et al.* (2006). The role of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk-1/KDR in promoting tumour angiogenesis in feline and canine mammary carcinomas: A preliminary study of autocrine and paracrine loops. *Res Vet Sci*; 81: 350-357.
10. Chang S, Chang C, Chang T, Wong M. (2005). Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (8-2002). *JAVMA*; 227 (10): 1625-1629.
11. Sharma S, Sharma MC, Sarkar C. (2005). Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprognostic perspective and significance of neoangiogenesis. *Histopathol*; 46: 481-489.
12. Guinebretière JM. (2005). Angiogenesis and breast neoplasms. The pathologist point of view. *Gynécolog Obstét Fertil*; 33: 140-146.
13. Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY. (2004). Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Res*; 64: 2941-2955.
14. Auguste P, Lemiere S, Larrieu-Lahargue F, Bikfalvi A. (2005). Molecular mechanisms of tumor vascularization. *Crit Rev Oncol Hematol*; 54: 53-61.
15. Parikh AA, Ellis LM. (2004). The vascular endothelial growth factor family and its receptors. *Hematol Oncol Clin N Am*; 18: 951-971.
16. Hicklin DJ, Ellis LM. (2005). Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*; 23 (5): 1011-1027.
17. Schoeffner DJ, Matheny SL, Akahane T, Factor V, Berry A, Merlino G *et al.* (2005). VEGF contributes to mammary tumor growth in transgenic mice through paracrine and autocrine mechanisms. *Lab Invest*; 85: 608-623.
18. Nakopoulou L, Stefanaki K, Panayotopoulou E, Giannopoulou I, Athanassiadou P, Gakiopoulou-Givalou H *et al.* (2002). Expression of the vascular endothelial growth factor receptor-2/Flk-1 in breast carcinomas: correlation with proliferation. *Hum Pathology*; 33 (9): 863-869.
19. Restucci B, Borzacchiello G, Maiolino P, Martano M, Paciello O, Papparella S. (2004). Expression of vascular endothelial growth factor receptor Flk-1 in canine mammary tumours. *J Comp Path*; 130: 99-104.
20. Uva P, Aurisicchio L, Watters J, Loboda A, Kulkarni A, Castle J, Palombo F, Viti V, Mesiti G, Zappulli V, Marconato L, Abramo F, Ciliberto G, Lahm A, La Monica N, de Rinaldis E. (2009). Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BMC Genomics*; 10: 135-155.
21. Restucci B, Papparella S, Maiolino P, De Vico G. (2002). Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. *Vet Pathol*; 39 (4): 488-493.