

- I. Clasificación temática: Oncología**
- II. Título: MARCADORES TUMORALES DE LAS NEOPLASIAS MALIGNAS EN VETERINARIA**
- III. Apellido y nombre del autor: Hermo, Guillermo A.**
- IV. Med. Veterinario – Profesional independiente.**

**Selecciones Veterinarias. Vol. 12-Nº 3. 274-281. 2004.**

### **Resumen**

Los marcadores tumorales en suero actualmente disponibles en medicina veterinaria pueden ser utilizados para monitorizar la terapéutica cuando se ha demostrado que el tumor de un paciente produce un marcador. Los marcadores tumorales, tanto los presentes en los tejidos como los circulantes en sangre, son de gran ayuda en la valoración de distintos aspectos de la biología tumoral. Estos marcadores permiten al oncólogo clínico diagnosticar, caracterizar, tratar y seguir la evolución del cáncer. Para realizar la detección en la población general es preciso disponer de marcadores con una mayor especificidad y sensibilidad. Se espera que, mediante un aumento de los conocimientos sobre el proceso de carcinogenesis en diferentes modelos animales, se identifiquen marcadores tumorales para la detección precoz y el seguimiento de tumores de uso en clínica veterinaria. El objetivo de la presente actualización informar acerca de los estudios complementarios en marcadores tumorales de aplicación en clínica veterinaria en caninos y felinos que están siendo utilizados en algunos países y que comienzan algunos a ser utilizados ya en nuestro país.

### **Summary**

Serum tumor markers available in veterinary medicine can be used to monitor therapeutics in patients with tumors producing these markers. Either serum and tissue tumors markers are of importance to evaluate different aspects of tumoral biology. These markers permit the oncologist to diagnose, characterize, treat and follow up the neoplastic disease. For this purpose it is necessary to have markers with good specificity and sensibility. It is expected that through the improvement in the knowledge of the carcinogenesis process in different animal models, tumor markers will be identified to permit early detection and follow up of cancer in veterinary medicine. The objective of the article was to review the studies of tumor markers carried out in veterinary medicine of foreign countries. Some tumor markers have also begun to be used in our country.

## Introducción

Aunque los regímenes terapéuticos han mejorado el pronóstico de algunos procesos malignos específicos, muchos de ellos progresan sin ser interrumpidos por las modalidades terapéuticas que se disponen en la actualidad. En casi todos los procesos malignos, la mejor oportunidad, y a menudo la única, de curación está en la detección precoz de la enfermedad y la extirpación quirúrgica del tumor primario.

El término marcador tumoral, se refiere a ciertas moléculas, sintetizadas y liberadas por las células cancerosas que permiten detectar la presencia de células tumorales así como determinar su origen y prever el pronóstico del paciente. Estos marcadores pueden identificarse y cuantificarse a nivel tisular –por ejemplo en una biopsia– o en distintos fluidos fisiológicos, como suero, plasma, orina o saliva, o patológicos, tales como derrames pleural, pericárdico, ascitis, citoplasma, membrana celular, etc (12).

Los parámetros utilizados de rutina no serían suficientes – por sí solos – para predecir el curso de la enfermedad tumoral. Gracias a los últimos avances en biología celular y molecular los eventos cruciales de la carcinogénesis, progresión tumoral y metástasis están siendo analizados a nivel molecular. En algunos tumores estos adelantos ya están siendo incorporados a la práctica clínica. Recientemente se ha observado que, en determinados tumores, anomalías de varios genes están correlacionados con el pronóstico de cada paciente. Nos acercamos al momento en el cual el diagnóstico clínico deberá realizarse a nivel molecular. Esto será posible combinando la histopatológica convencional con las técnicas modernas de biología celular y molecular. Esta nueva información llevará a una reevaluación de los sistemas de clasificación de tumores, que no estarán basados en la apariencia morfológica o en el origen de las células, sino por la caracterización de sus genes asociados con estadios particulares de cada tumor.

¿Qué es un Marcador Tumoral?. Es una sustancia que reúne las siguientes características: a) lo produce una célula maligna o el tejido huésped en respuesta a la presencia de la célula tumoral, b) difiere cualitativamente (es específico de tumor) o cuantitativamente (está asociado al tumor), c) se debe encontrar dentro o adherido a la célula tumoral, en la circulación sanguínea o en otros fluidos del organismo (26).

El primer marcador de tumor fue descrito a mediados del siglo pasado por Sir Bence Jones, quien reportó la presencia de una proteína en la orina de pacientes con mieloma. Esta proteína, luego bautizada con el nombre de su descubridor, correspondía a la cadena liviana de la Ig G, elaborada y excretada en exceso por las células neoplásicas. Desde aquel descubrimiento hasta la actualidad, el número de marcadores tumorales disponibles se ha incrementado de manera notable, tanto en neoplasias hemáticas como sólidas.

Los marcadores moleculares pueden aplicarse en la detección, identificación, control y terapéutica de los procesos malignos. El laboratorio clínico veterinario se ocupa de las tres primeras aplicaciones, esto es, confirmar la presencia de un proceso maligno sospechado clínicamente, identificar y establecer la subcategoría del proceso maligno con respecto a su pronóstico o a la terapéutica óptima, y controlar el curso de la enfermedad en pacientes en que se ha identificado el tumor.

Desafortunadamente los antígenos asociados a tumores utilizados en la actualidad en medicina veterinaria, carecen de sensibilidad y especificidad para ser usados como prueba de escrutinio en población abierta, en virtud de que pueden ser sintetizados tanto por el tejido normal como por tejido neoplásico; sin embargo, la alta correlación entre el estadio clínico del tumor y su concentración plasmática los clasifica como marcadores tumorales (36). En la clínica veterinaria la determinación de marcadores tumorales, se utiliza como auxiliar en el diagnóstico o la confirmación del resultado histopatológico, para vigilar la respuesta al tratamiento instituido, como factor pronóstico del padecimiento y para seguimiento del curso de la enfermedad.

## **Marcadores de la agresión y la respuesta del huésped**

La presencia de un proceso maligno avanzado puede ser indicada por pruebas de lesión del órgano donde se localiza el tumor o la metástasis. Anormalidades corrientes de laboratorio que se ven en pacientes con cáncer incluyen hiperbilirrubinemias en tumores hepáticos, aumento de la fosfatasa alcalina en suero en animales con metástasis óseas y aumentos de la fosfatasa alcalina, lactato-deshidrogenasa y gamma-glutamyltransferasa en pacientes con metástasis hepáticas. Las proteínas sericas asociadas a las fases aguda y crónica de la inflamación pueden estar elevadas en sangre en pacientes con cáncer. Estas incluyen la beta 2- microglobulina y la alfa 2- macroglobulina, la haptoglobina, la proteína C reactiva y la ferritina (37).

Todos estos marcadores son de fácil acceso y los mas comúnmente utilizados. Se pueden realizar en cualquier laboratorio veterinario.

## **Marcadores moleculares de renovación celular**

Los marcadores de la renovación celular son sustancias producidas por todas las células o la mayoría de ellas. Los niveles en suero de estas sustancias se elevan secundariamente a un aumento del crecimiento y destrucción celular. Los marcadores de una renovación celular aumentada han encontrado cierta utilidad clínica en la estimación de la masa tumoral y en la monitorización terapéutica en pacientes con enfermedad diseminada. Como hallazgo incidental puede sugerir un diagnóstico de cáncer avanzado cuando se puede excluir otras causas de aumento.

La elevación de lactato-deshidrogenasa (LDH) fue observada por primera vez en asociación con procesos malignos por Otto Warburg. Este descubrió un aumento del metabolismo anaerobio y propuso que las alteraciones intrínsecas de las enzimas metabólicas de los tumores creaban este efecto(37).

## **Marcadores de diferenciación**

Los marcadores de diferenciación son sustancias normalmente producidas por el tejido del cual deriva el tumor. Como son producidos por células normales, la mayoría no son muy prometedores para ser utilizados en la detección precoz de los cánceres. Su papel mas importante esta en la identificación del tumor primario en pacientes con pruebas clínicas de cáncer metastático.

Si el marcador es liberado por las células pueden medirse sus niveles en suero u otros líquidos del cuerpo, mediante inmunoanálisis como el radioinmunoanálisis (RIA) o el análisis de inmunoabsorción enzimática (ELISA).

Catecolaminas: Los feocromocitomas funcionales elaboran noradrenalina, adrenalina o, con menor asiduidad, dopamina, produciendo a menudo síntomas de excesiva estimulación autonómica (40). La hiperproducción de catecolaminas por un feocromocitoma puede ser episódica o continua dependiendo del patrón secretor de la neoplasia.

La producción de catecolaminas pueden valorarse por medición directa de la adrenalina y la noradrenalina en suero u orina, o por sus metabolitos, metanefrinas y ácido vanilmandélico (VMA) en orina (37).

## **Antígenos oncofetales**

Los antígenos oncofetales son productos de genes que se expresan en las fases iniciales de la diferenciación celular. Algunos muestran especificidad del tipo de tejido. Si se segregan, pueden detectarse en el suero por varios métodos inmunológicos. En los tejidos se detectan por métodos inmunohistoquímicos. Se detectan en los tejidos fetales y dejan de producirse durante el proceso de diferenciación, aunque pueden continuar expresados en algunos tejidos de los adultos, particularmente en células regenerativas. Pueden estar expresados en altos niveles en tejidos lesionados, donde existen procesos de cicatrización y regeneración. Esto suele dar dificultades para el diagnóstico diferencial en pacientes que se sospecha la presencia de procesos malignos. Como marcadores séricos carecen de la especificidad necesaria para explorar la población general.

La  $\alpha$ -fetoproteína (AFP) fue descubierta por G. I. Avelev (1963) y ahora está bien establecido su uso clínico. Es una proteína sérica fetal importante, producida por el endodermo del hígado y saco vitelino, y se encuentra solo en niveles bajos en el adulto sano. Un estudio realizado por Lechowski y col. encontró que las concentraciones en suero de AFP estaban aumentadas en perros con linfoma multicéntrico antes y mientras recibían quimioterapia. Después de la quimioterapia se producía un descenso de las concentraciones de AFP en suero, en las fases de inducción y mantenimiento del tratamiento. Las determinaciones de AFP en suero podrían ser utilizadas como un indicador adicional en la evaluación de los estadios de los perros con linfoma, y valorar la extensión de las neoplasias infiltradas en el hígado (8, 22).

El antígeno carcinoembrionario (CEA) es una glucoproteína descrita por primera vez en 1965 por Gold y Freedman, en asociación con carcinoma colorrectal, y producida por las células epiteliales del epitelio secretor de moco, en el feto. Se observan niveles séricos elevados en diversos tumores, así como en varios trastornos benignos que incluyen enfermedad intestinal inflamatoria, cirrosis, pancreatitis y neumonía (24). Según un estudio realizado por Hassig y col. el límite máximo para procesos benignos sería de 1,65 ng/dl para caninos y 2,81 ng/dl para felinos (15).

En medicina humana el CEA es un importante marcador en el cáncer de mama, encontrándose valores elevados en alrededor del 70 % de mujeres con metástasis. Una vez establecido el diagnóstico, las elevaciones séricas de este marcador correlacionan con el curso de la enfermedad. Las elevaciones de CEA en cáncer de mama presentan una estrecha relación con la extensión de la neoplasia y los sitios de metástasis. Suelen medirse en el prequirúrgico y posquirúrgico tardío para comparar dichos valores con la efectividad de la cirugía. En primera instancia las elevaciones deben ser consideradas como sugestivas pero no diagnósticas de cáncer.

Por inmunohistoquímica se ha detectado CEA en varios tumores caninos, como ser adenocarcinomas testiculares, carcinomas hepáticos, tumores del plexo coroideo, etc (8, 33, 35).

## **Virus oncogénicos**

Algunos virus han sido implicados en la formación de tumores en animales. La presencia de productos o partículas víricas puede asociarse a un aumento de riesgo de desarrollo de tumores, o puede predecir el curso clínico específico. Este es el caso del virus de leucemia felina (FeLV), productor de linfomas, leucemias, enfermedades mielosupresoras, etc.. En la membrana de las células malignas se encuentra antígeno de membrana celular de oncornavirus felino (FOCMA), pero no existen en todas las otras células del cuerpo. Incluso en las infectadas por FeLV. Los gatos con títulos de anticuerpos altos a FOCMA son resistentes a la leucemia y los linfomas sin importar que los resultados de la prueba para FeLV sean positivos o negativos. En presencia de complemento, el anticuerpo a FOCMA lisa células tumorales y participa de la vigilancia inmunológica contra la formación de tumores(14). La importancia de la detección de anticuerpos a FOCMA radica en que es más probable que permanezcan sanos.

## **Telomerasa**

Un ensayo sencillo de proteína que ha resultado prometedor tanto para la detección como para el seguimiento del cáncer utiliza una telomerasa, una enzima que opera cuando aparece el cáncer. La enzima afecta a los telómeros.

Cuando los telómeros se acortan hasta cierta longitud, transmiten instrucciones a la célula para su autodestrucción; suministran así un mecanismo para que el cuerpo se desembarace de las células envejecidas. En la mayoría de las células normales falta la telomerasa, pero en el cáncer es activa y bloquea el acortamiento de los telómeros. En consecuencia, las células cancerosas no mueren. La telomerasa es una ribonucleoproteína constituido por una subunidad de RNA que contiene los dominios complementarios para la secuencia de repetición telomérica TTAGGG y un componente proteico catalítico. El componente proteico actúa como una transcriptasa y puede catalizar la adición de repeticiones teloméricas sobre el final de los cromosomas usando la subunidad de RNA como templado(10, 29, 30).

La actividad de la telomerasa es esencial durante la embriogénesis, pero es reprimida después de la diferenciación tisular, de tal modo que la telomerasa está ausente luego del nacimiento en la mayoría de los tejidos(42). Algunos tipos celulares como células germinales, linfocitos activados y células pluripotenciales continúan con la expresión de telomerasas a un nivel reducido(3, 7, 16).

Puesto que la enzima raras veces está presente en las células normales, puede servir de marcador que revele la presencia precoz de células cancerosas. El escrutinio de la telomerasa tiene el potencial de suministrar una estrategia general para la detección de cáncer en los fluidos y tejidos (6).

Además de la detección precoz, los clínicos deben determinar el grado de facilidad de diseminación o crecimiento de un tumor. Esta evaluación se convierte en un componente crítico para establecer el tratamiento adicional que va a recibir el paciente después de la cirugía, la radiación o la quimioterapia.

La actividad telomerasa ha sido usado como marcador de neoplasias malignas en felinos (4) y posiblemente lo sea también en neoplasias caninas(2).

El desarrollo de la tecnología ha permitido que a partir de 1994 la valoración de la actividad telomerasa en una amplia variedad de tejidos. La detección de actividad telomerasa se realiza usando un ensayo llamado Telomere Repeat Amplification Protocol (TRAP)(27). La universal expresión de telomerasa en células tumorales ha hecho de esta enzima uno de los mayores marcadores tumorales. La técnica de TRAP es capaz de detectar actividad no solo en biopsias de tumores sólidos sino también en muestras obtenida mediante las técnicas convencionales de citología (punción-aspiración por aguja fina, lavado bronquial, etc.)

## **Metaloproteinasas**

Las células tumorales deben cruzar la membrana basal para entrar y salir de un capilar desde el tumor primario para formar un foco metastático. Las metaloproteinasas de matrix (MMP), una familia de proteasas dependientes de zinc, participan en varios pasos de la progresión tumoral, incluyendo invasión, metástasis y angiogénesis (17). Estas enzimas forman parte de una familia de más de 10 endopeptidasas que son expresadas en niveles bajos en los tejidos adultos normales, pero cuya expresión se eleva rápidamente en procesos de remodelación tisular normales y patológicos tales como el desarrollo embrionario, la reparación tisular, la inflamación y durante la diseminación tumoral. Este grupo de enzimas incluye a la colagenasa intersticial (MMP-1), la colagenasa de neutrofilos (MMP-8), dos clases de colagenasa tipo 4 (MMP-2 y MMP-9), tres estromelisin, la matrisilina, una metaloelastasa macrofágica y la recientemente descrita metaloproteinasas de membrana (MT-MMP)(13) Varios trabajos reportan la elevada expresión de estas enzimas en tumores mamarios caninos y se correlaciona directamente con el grado de malignidad(18, 32, 43).

Los factores de crecimiento que promueven el crecimiento tumoral también inducen la producción de diversas MMPs.

Mediciones de MMP-9 en plasma o suero han sido reportados para ser usados en una etapa temprana de la diseminación tumoral (44). Recientemente, actividades MMP-2 y MMP-9 han sido reportadas en tejidos neoplásicos caninos mediante enzimografía (21). La mayoría de los adenocarcinomas mamarios caninos muestran una intensidad 10 veces mayor en cuanto a actividad enzimática que los tejidos controles y en el suero de pacientes con adenocarcinoma mamarios esos niveles son 20 veces mayores que los controles (vease tabla 1 y fig. 1).

La primer barrera que las células epiteliales malignas deben pasar en la transición patológica, de carcinoma in situ a carcinoma invasivo, es atravesar la membrana basal. La MMP-9 es una enzima crítica para este primer paso. Mediciones de MMP-9 mediante enzimografía en suero de animales con tumores de glándula mamarias servirían para una detección temprana de la diseminación tumoral.

Los niveles de actividad de MMP-2 también fueron correlacionados con tumores malignos e invasivos en tumores mamarios caninos y humanos (11, 20).

Tabla 1 – Asociación entre el diagnóstico morfológico y la expresión de actividad MMP-9 en tejidos mamarios caninos(18).

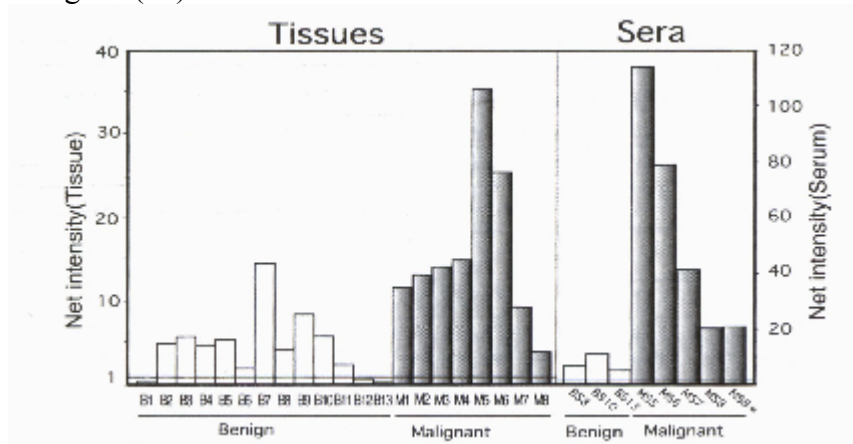
Nº	Nombre	Diagnostico morfológico	Intensidad neta
1		Normal-b	0,55
2		Normal-b	0,76
3		Normal-b	1,58
4		Normal-b	1,45
5		Normal	0,66
6a		Normal	1,12
7	B1	Tumor mixto (benigno)	0,45
8	B2	Hiperplasia y papiloma intraductal	5,02
9	B3	Tumor mixto (benigno)	5,83
10	B4	Tumor mixto (benigno)	4,84
11	B5	Tumor mixto (benigno)	5,54
12	B6	Tumor mamario benigno	2,02
13	B7	Tumor mixto (benigno) y metaplasia-b	14,79
14	B8	Tumor mixto (benigno)	4,28
15	B9	Tumor mixto (benigno)	8,59
16	B10	Tumor mixto (benigno)-b	5,88
17	B11	Tumor mixto (benigno)	2,49
18	B12	Tumor mixto (benigno)	0,71
19	B13	Adenoma papilar intraductal-b	0,43
20	M1	Adenocarcinoma mamario	11,85
21	M2	Tumor mixto (maligno)	13,26
22	M3	Carcinoma bien diferenciado	14,37
23	M4	Adenocarcinoma medular	15,19
24	M5	Adenocarcinoma mamario-b	35,80
25	M6	Adenocarcinoma mamario-b	25,88
26	M7	Adenocarcinoma mamario-b	9,43
27	M8	Adenocarcinoma mamario-b	4,04

Intensidad neta de las respectivas bandas por enzimografía fueron analizadas por Kodac EDAS y fueron mostradas como intensidad neta.

a: esta muestra fue preparada a partir de tejido mamario normal de un canino que había tenido un adenocarcinoma mamario.

b: muestras de suero que fueron medidas por enzimografía.

Figura 1. Intensidad comparada de metaloproteinasas en tejidos y suero de perras con tumores benignos y malignos.(43)



## Receptores hormonales

Los receptores de estrógeno (ER) y progesterona (PR) se localizan dentro de las células y pueden ser estudiados directamente en tejidos neoplásicos mamario. Estos receptores corresponden a estructuras polipepticas que se unen al ligando hormonal para cambiar su conformación formar un dímero y luego unirse a secuencias específicas del DNA modificando la expresión de genes que afectan la proliferación celular. Estos receptores pueden cuantificarse usando hormonas marcadas o por inmunocitoquímica en cortes de tumores incluidos en parafina. La presencia o ausencia de ER permite identificar aquellos pacientes que podrían beneficiarse con la terapia adyuvante endocrina. La cuantificación de estos receptores también indica el pronostico, tal lo demuestra el estudio de Sartin y col., donde el tiempo de supervivencia es mayor en pacientes con tumores de mama que contienen solamente ER o combinación con PR, intermedio en pacientes con tumores solo con PR y una corta sobrevivida en pacientes con tumor sin ER ni PR(38).

Aproximadamente el 80% de los tumores mamarios caninos expresan ER, PR o ambos(9).

La expresión de ER fue mas alta en tumores de mama de perras enteras, en hembras jóvenes y en perras con ciclo estral regular. La expresión de ER fue significativamente mas alta en tumores mamarios de perras cuya historia clínica previa indico haber tenido pseudogestaciones. La inmunoexpresion de ER decreció significativamente con respecto al tamaño del tumor y presencia de ulceras en piel. Los tumores malignos tenían una expresión mas baja de ER con respecto a los tumores benignos. Bajos niveles de ER en tumores malignos primarios fueron asociados con ocurrencias de metástasis(31). Un estudio realizado por Cappelletti y col. Indicaría que los niveles de ER podrían ser modulados mediante el uso de tamoxifeno y etretinato, solos o en combinación. Sin embargo futuros estudios son necesarios para definir un tratamiento optimo(5), debido a que en la perra los antiestrogenos tienen un efecto estrogenico sobre el aparato genital que limita su aplicación (19).

La proteína hsp27 (proteína inducida por stress/shock térmico), al igual que el PR, proteína S2 y catepsina D, es otra proteína asociada al RE cuya síntesis estaría regulada o mediada por los estrógenos. La presencia de hsp27 reflejaría la existencia de una vía del RE funcionalmente activa.(23, 25). Teniendo en cuenta que la hsp27 se expresa en tejidos hormonosensibles y en tumores derivados de estos, una serie de estudios clínicos investigo su posible utilidad de hormonodependencia. Además de estudiar la utilidad de la hsp27 como factor predictivo de respuesta a la hormonoterapia, diferentes grupos investigan su posible valor pronostico.



## **Determinación del índice de proliferación celular**

La población celular de los tumores se divide, desde el punto de vista cinético, en dos tipos: aquella que se está multiplicando (células en división) y aquella que no se multiplica (células quiescentes). La fracción de crecimiento es definida por la enumeración de las células en multiplicación sobre el total de las células. Un evento crucial en las células en multiplicación es la síntesis de DNA (fase S) la cual está precedida y sucedida por dos períodos de duración variable (fases G1 y G2) (Fig. 1). La mitosis (fase M) representa la porción más corta del ciclo de división y continúa a la fase G2. Desde mucho tiempo atrás se sabe que aquellos tumores con alto número de mitosis poseen mayor agresividad. Debido al gran interés en cuantificar las células en división, existen diferentes métodos para evaluar el índice de proliferación de los tumores (Tabla 1-2). La enumeración del número de mitosis por medio de las técnicas histomorfológicas de rutina, es el procedimiento más difundido. Sin embargo, como la duración de la fase M es la más corta de todas las fases que integran el ciclo de división celular, para alcanzar un alto grado de precisión es necesario contar el número de figuras mitóticas por 1000 células tumorales. Otra dificultad de este procedimiento es la de identificar las figuras mitóticas condensadas que, generalmente, son el resultado de la demora entre la extirpación de la muestra y el comienzo de la fijación. Por su fácil realización y bajo costo este procedimiento seguirá siendo de importancia.

*Incorporación de nucleótidos modificados.* Otro método de amplia difusión es la incorporación de timidina tritiada en la célula en división y su posterior revelado por medio de autorradiografía. Este índice permite conocer el porcentaje de células que están sintetizando DNA y ha demostrado ser de valor pronostico muy importante (28, 39, 41).

*Citometria de flujo.* Esta técnica enumera, con ayuda de colorantes fluorescentes específicos para el DNA, el porcentaje de células que están en la fase S y el contenido (la haploidía) de DNA del tumor. Para realizar esta técnica se puede usar tejido fresco, congelado o incluido en parafina ( con un corte de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  de espesor ). Una ventaja significativa de este análisis es que permite evaluar objetivamente un alto número de núcleos en corto tiempo; sin embargo, el alto costo del equipamiento y la dificultad en la interpretación de los resultados limitan su uso masivo.

*Anticuerpos monoclonales contra antígenos relacionados con el ciclo de división celular.* Desde mucho tiempo atrás se sabe que aquellos tumores con alto numero de mitosis poseen mayor agresividad. Para alcanzar una precisa evaluación de las células en división se han desarrollado diferentes métodos para cuantificar el índice de proliferación de los tumores. El desarrollo de estos anticuerpos ha permitido una fácil y rápida evaluación de las células en proliferación. El anticuerpo que hasta el momento es más conocido es el MIB-1, que reconoce un antígeno nuclear, el Ki-67, presente en células que están en el final de la fase G1 y en las fases S-G2 y M del ciclo de división celular, pero no marca las células quiescentes (fase G0); En términos generales, los epitopos de antígenos expresados por células en proliferación e identificados por los anticuerpos monoclonales son muy lábiles, puesto que no resisten el procesado de rutina y su inclusión en parafina.

Ki-67 y PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) fueron medidos y utilizados como marcador pronostico en mastocitomas cutáneos en caninos (1)

La contrapartida de estudiar células en multiplicación es evaluar, por medio de inmunohisto-química con un anticuerpo monoclonal específico, la presencia de una proteína (denominada estatina) que está presente en células quiescentes (fases G0/G1 inicial) y que desaparece cuando la célula entra en las otras fases del ciclo de división. La expresión de estatina tendrá importancia como marcador de la eficacia citotóxica y antiproliferativa de drogas anti-cáncer.

Tabla 1- Factores pronostico mamario: Medidas de proliferación

	G0	G1	S	G2	M
IM					+
Timidina			+	+	+
Fase-S			+		
Ki67/ Mib1		±	+	+	+
PCNA		±	±	+	±

Tabla 2 - Factores pronostico mamario: medidas de proliferación. Cosideraciones técnicas

Metodo	Marcador	Ventajas	Desventajas
Citometria	Fase S	Especifico	Rápido caro. No distingue células No es reproducible.
IHC cong.	Ki67	Mide S-G2-M Es sensible	Dificil de evaluar
IHC fijado	aumenta MIB1	Mide S-G2-M Facil realización	Variables interreactivos. No hay standardización para su evaluación

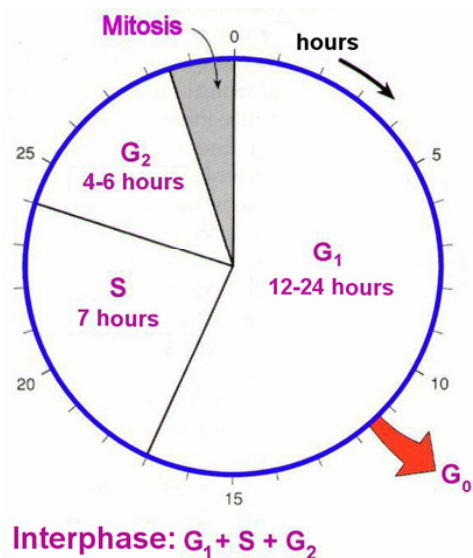


Fig.1- Representación esquemática del ciclo de división celular de una célula eucariota normal. La INTERFASE se inicia con la fase G1 que se caracteriza por una aumentada velocidad de los procesos de biosíntesis. Continúa la fase S que se inicia con la síntesis de DNA y finaliza cuando éste se duplicó. A partir de aquí, y hasta el inicio de la DIVISIÓN nuclear o mitosis se extiende la fase G2. Luego de completarse la DIVISIÓN nuclear y citoplasmática (fase M), las células hijas pueden seguir dos caminos diferentes: a) conformar un grupo de células quiescente (fase G0) que ante un estímulo apropiado ingresan en el ciclo de división y b) continúan en el ciclo de división.

## Conclusiones

Los marcadores moleculares parecen ser una herramienta muy útil en la clínica diaria, tanto para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento del paciente. Algunos kits son solo accesibles a través de laboratorios especializados o algunos laboratorios de humana. Muchos de ellos son ampliamente usados a diario mientras que otros comienzan lentamente a conocerse en el ámbito veterinario. El mayor inconveniente de algunos es el alto costo para su realización. Hoy, todavía no tienen una aplicación extensiva pero, sin duda, se irán imponiendo a medida que muestren su valor y se hagan accesibles en los laboratorios que orienten al médico clínico en sus decisiones.

## Agradecimientos

Al Dr. Enrique H. Luque y a la Dra. Cristina Gobello por su inestimable ayuda en la corrección y sugerencias realizadas en esta revisión.

## Bibliografía

- 1- Abadie JJ, Amardeilh MA, Delverdier ME. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1;215(11):1629-1634. 1999.
- 2-Argyle DJ, Nasir L. Telomerase: a potential diagnostic and therapeutic tool in canine oncology. : *Vet Pathol.*40(1):1-7. 2003.
- 3-Broccoli D, Young JW, De Lange T: Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:9082-9086. 1995.
- 4-Cadile CD, Kitchell BE, Biller BJ, Hetler ER, Balkin RG. Telomerase activity as a marker for malignancy in feline tissues. *Am J Vet Res.* 62(10):1578-1581. 2001.
- 5-Cappelletti V, Granata G, Miodini P, Coradini D, Di Fronzo G, Cairoli F, Colombo G, Nava A, Scanziani E. Modulation of receptor levels in canine breast tumors by administration of tamoxifen and etretinate either alone or in combination. *Anticancer Res.* 8(6):1297-1301. 1998.
- 6-Chadedeneau C, Hay K, Hirte HW, Gallinger S, Bacchetti S. Telomerase activity associated with acquisition of malignancy in human colorectal cancer. *Cancer Res* 55(12): 2533-2536. 1995.
- 7-Counter CM, Gupta J, Harley CB, Leber B, Bacchetti S: Telomerase activity in normal leukocytes and in hematological malignancies. *Blood* 85:(9) 2315-2320, 1995.
- 8-De las Mulas Martín J, Gomez-Villamandos JC, Perez J, Mozos E, Estrado M, Mendez A. Immunohistochemical evaluation of canine primary liver carcinomas: distribution of alpha-fetoprotein, carcinoembryonic antigen, keratins and vimentin. *Res Vet Sci.* 59(2):124-127. 1995.
- 9-Donnay I, Raus J, Devleeschouwer N, Wouters-Ballman P, Leclercq G, Verstegen J. Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. *Am J Vet Res.* 56(9):1188-1194. 1995.
- 10-Dunham MAM, Neumann AAM, Fasching CL, Reddel RR: Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nature Genet* 26:447-450, 2000.
- 11-Fang KC, Raymond WW, Blount JL, Caughey GH. Dog mast cell alpha-chymase activates progelatinase b by cleaving the Phe88-Gln89 and Phe91-Glu92 bonds of the catalytic domain. *J Biol. Chem.* 272 . 25628-25635. 1997.

- 12-Fritsche HA, Trujillo JM, Hortobagyi CN. Tumor markers in the clinical laboratory. *Cancer Bull* 37:54-58. 1985.
- 13-Gomez D, Alonso D. *Introducción a la Oncología Molecular*. Universidad Nacional de Quilmes. 1ed. 1998.
- 14-Greene, Craig E. *Enfermedades Infecciosas en Perros y Gatos*. Segunda ed. 78-92. 1998.
- 15-Hassig M, Casal M, Von Beust B, Nussbaumer M, Rusch P. CEA test in domestic animals. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 133(7):311-3. 1991.
- 16-Hiyama K, Hirai Y, Kyoizumi S, Akiyamam M, Hiyama E, Piatyszek MA, Shay JW, Ishioka S, Yamakido M: Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol* 155:3711-3715, 1995.
- 17-Himmelstein BP, Canete-Soler R, Bernhard EJ, Dilks DW, Muschel RJ. Metalloproteinases in tumor progression: the contribution of MMP-9. *Invasion Metastasis* 14. 246-258. 1994-1995.
- 18-Hirayama K, Yokota H, Onai R, Kobayashi T, Kumata T, Kihara K, Okamoto M, Sako T, Nakade T, Izumisawa Y, Taniyama H. Detection of matrix metalloproteinases in canine mammary tumours: analysis by immunohistochemistry and zymography. *J Comp Pathol.* 127(4):249-256. 2002.
- 19- Hoffmann B, Schuler G. Receptors blockers-general aspects with respect to their use in domestic animal reproduction. *Anim Reprod Sci* 60-61:295-312. 2000.
- 20-Iwata H, Kobayashi S, Iwase H, Masaoka A, Fujimoto N, Okada Y. Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human breast carcinomas. *Jpn. J. Cancer Res.* 87. 602-611. 1996.
- 21-Lana SE, Ogilvie GK, Hansen RA, Powers BE, Dernell WS, Withrow SJ. Identification of matrix metalloproteinases in canine neoplastic tissue. *Am J. Vet. Res.* 16. 111-114. 2000.
- 22-Lechowski R, Jagielski D, Hoffmann-Jagielska M, Zmudzka M, Winnicka A. Alpha-fetoprotein in canine multicentric lymphoma. *Vet Res Commun.* 26(4):285-96. 2002.
- 23-Levin E, Levin R. Modulación de receptores esteroideos. Clave en el tratamiento de cáncer de mama. *Fundación Oncológica Encuentro.* 2003.
- 24-Luque EH, Muñoz de Toro. Carcinoma de mama en el varón. Factores pronósticos y/o predictivos relacionados con su comportamiento biológico. *Medicina.* 58:95-106. 1998.
- 25-Luque EH, Muñoz de Toro de Luque M, Romero Acuña L, Langhi M, Romero Acuña J. Marcadores moleculares para predecir el pronóstico del cáncer de mama. *Medicina. Bs. As.* 53: 1551-160. 1993.
- 26-Loewenstein MS, Zamcheck N. Carcinoembryonic antigen (CEA) levels in benign gastrointestinal disease states. *Cancer.* 42(3 Suppl):1412-1418. 1978.
- 27-Matthews P, Jones CJ: Clinical implications of telomerase detection. *Histopathology* 38:(6) 485-498, 2001.
- 28-Meyer JS, Province M. Proliferative index of breast carcinoma by thymidine labeling: Prognosis power independent of stage, estrogen and progesterone receptors. *Breast Cancer Res Treat* 12: 191,1998.
- 29-Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, Ziaugra L, Beijersbergen RL, Davidoff MJ, Liu Q, Bacchetti S, Haber DA, Weinberg RA: hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90:(4) 785-795, 1997.
- 30-Morin GB: The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59:521-529, 1989.
- 31-Nieto A, Pena L, Perez-Alenza MD, Sanchez MA, Flores JM, Castano M. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet Pathol.* 37(3):239-247. 2000.
- 32-Papparella S, Restucci B, Paciello O, Maiolino P. Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and the activator membrane type 1 (MT1-MMP) in canine mammary carcinomas. *J Comp Pathol.* 126(4):271-276. 2002.
- 33-Radi ZA, Miller DL, Hines ME 2nd. Rete testis mucinous adenocarcinoma in a dog. *Vet Pathol.* 41(1):75-78. 2004.

- 34-Ranuncolo SM, Cerchietti L. Marcadores tumorales. Revista Ciencia Hoy Volumen 13 - N° 73. 38-47. 2003.
- 35-Ribas JL, Mena H, Braund KG, Sesterhenn IA, Toivio-Kinnucan M. A histologic and immunocytochemical study of choroid plexus tumors of the dog. Vet Pathol. 26(1):55-64. 1989.
- 36-Rivera Hidalgo,PR. Utilidad clinica de los marcadores tumorales. Revista Mexicana de Patologia Clinica, Vol 44, Num. 4. 245-256. 1997.
- 37-Rooney MT, Henry JB. Marcadores moleculares de neoplasias malignas. Diagnostico y trataminto Clinico. Ed. Cientifica y tecnica, 9na ed. Barcelona . 293-315. 1993.
- 38-Sartin EA, Barnes S, Kwapien RP, Wolfe LG. Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs. Am J Vet Res. 53(11):2196-2200. 1992.
- 39-Silvestrini R, Daidone MG, Valagussa P et al: Cell kinetics as a pronostic indicator in node-negative breast cancer. Eur J Cancer Clin Oncol 25:1165,1989.
- 40-Tilley LP, Smith FWK.La consulta veterinaria en 5 minutos- canina y felina. Intermedica.. 650-651. 1998.
- 41-Tubiana M, Pejovic MJ, Koscielny S et al: Growth rate, kinetics of tumor cell proliferation and lonf-term outcome in humana breast cancer. Int J Cancer 44:17. 1989.
- 42-Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW: Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. Dev Genet 18:173-179. 1996.
- 43-Yokota H, Kumata T, Taketaba S, Kobayashi T, Moue H, Taniyama H, Hirayama K, Kagawa Y, Itoh N, Fujita O, Nakade T, Yuasa A. High expression of 92 kDa type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) in canine mammary adenocarcinoma. Biochim Biophys Acta. 7;1568(1):7-12. 2001.
- 44-Zucker S, Lysik RM, Zarrabi MH, Moll U. 92,000 type 4 collagenase is increased in plasma of patients with colon cancer and breast cancer. Cancer Res. 53. 140-146. 1993.