



Clinoncovet

Revista clínica
de oncología
veterinaria

17

Expresión de catepsina D en cáncer mamario canino
y su asociación a otros factores de mal pronóstico

Síndrome de vena cava craneal asociado a linfoma
multicéntrico

El tumor venéreo transmisible dentro de la
clasificación de neoplasias en caninos



Multimédica
ediciones
veterinarias

n **17**

Clinoncovet

Revista clínica
de oncología
veterinaria

Índice

Expresión de catepsina D en cáncer mamario canino y su asociación a otros factores de mal pronóstico 2

Marcela Edth Pereira, María de las Mercedes Fianza, Joaquín Artese, Sebastián González

Síndrome de vena cava craneal asociado a linfoma multicéntrico 10

M^a del Carmen V. Rastrilla Calleja

El tumor venéreo transmisible dentro de la clasificación de neoplasias en caninos 15

Beatriz Patiño-Quiroz, Nicolás Baldrich-Romero, Cindy Fuentes-Villamil, Alba Espinosa-Nuñez

Coordinador científico: Ricardo Ruano Barneda y Josep Pastor Milán.



**Multimédis
ediciones
veterinarias**

Expresión de catepsina D en cáncer mamario canino y su asociación a otros factores de mal pronóstico

Marcela Edth Pereira, María de las Mercedes Fidanza, Joaquín Artese, Sebastián González

Hospital Escuela Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. Chorroarín 280. CABA, República Argentina.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue investigar la expresión de Catepsina D y su relación con otros factores de mal pronóstico en cáncer mamario canino. Se trabajó con cortes histopatológicos de tejido neoplásico mamario maligno para evaluar por inmunohistoquímica la expresión de Catepsina D, el estado de los receptores para estrógenos (RE) y progesterona (RP), la sobreexpresión del proto-oncogén Herb2-Neu, el estado del p53 y la expresión del antígeno Ki67. El 43,48 % presentaron expresión positiva para Catepsina D con una mediana de supervivencia de 280 días significativamente menor ($p = 0,025$) al grupo con expresión negativa con una supervivencia de 990 días. En el 70 % de los pacientes con expresión positiva para Catepsina D se observó compromiso ganglionar y metástasis, una correlación positiva entre los resultados obtenidos de evaluar la expresión de Catepsina D, la expresión del gen mutante p53, la marcación de Ki67 y la sobreexpresión de Herb2-Neu ($p \leq 0.0001$) y una correlación negativa con los resultados obtenidos de la marcación de receptores hormonales ($p = 0.001$). Esta patología requiere de la permanente búsqueda de marcadores que contribuyan a predecir su comportamiento biológico y su evolución clínica y que permitan evaluar posibles estrategias terapéuticas.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es un padecimiento heterogéneo que requiere de la permanente búsqueda de marcadores que contribuyan a predecir el comportamiento biológico del tumor, a reconocer pacientes con alto riesgo de recurrencia y muerte, y a evaluar posibles alternativas terapéuticas. La modalidad terapéutica más conveniente en cada caso se basa en el estudio de factores pronósticos, variables que relacionadas con el paciente, el tumor o el tratamiento, influyen de forma independiente sobre la evolución de la enfermedad y en la supervivencia total, en el tiempo libre de recaída y en la respuesta al tratamiento¹.

Tanto en Medicina Humana como en Medicina Veterinaria cobran importancia pronóstica la evaluación del estado de los receptores para estrógenos (RE) y progesterona (RP), la sobreexpresión del proto-oncogén Herb2-Neu, el estado del p53, y la expresión del antígeno Ki67^{2,3,4,5}. Mientras que la presencia de receptores hormonales (RE-RP) se asocia a mayor supervivencia y menores posibilidades de recidivas, la sobre-expresión del proto-oncogén Herb2-Neu se asocia a incrementos en las tasas de proliferación, comportamientos más agresivos, independencia hormonal y, en algunos estudios, aumento de la resistencia a la quimioterapia. Estos marcadores y su correlación han sido evidenciados en los adenocarcinomas simples y sus variantes, los carcinomas mixtos malignos y los carcinomas inflamatorios^{2,6}. La mutación del gen p53 y la expresión

de altos porcentajes de Ki67 se asocian a tumores mamarios con altos grados histológicos, elevados índices de proliferación y receptores hormonales negativos con corta sobrevida global y libre de enfermedad^{2,3,4,5,7,8}.

Por otro lado la Catepsina D es sobreexpresada y secretada por algunos tumores de mama. Es una proteasa lisosomal dependiente de estrógenos que se sintetiza en tejidos normales. Su precursor proteico (pro-catepsina D) tiene actividad mitogénica y en un ambiente ácido ocasiona proteólisis de membranas basales, por lo que se ha postulado que esta enzima favorecería la invasión y el desarrollo de metástasis. La Catepsina D está localizada en los lisosomas y fagolisosomas de las células de tumores mamarios y en macrófagos que se pueden encontrar en estos tejidos, como parte del infiltrado inflamatorio^{4,7,9,10}. Se ha observado que la Catepsina D se expresa menos en el carcinoma *in situ* que en el invasor y que por lo tanto estaría relacionada con el carácter invasivo del cáncer y con una mayor tendencia a producir metástasis. Niveles altos de esta enzima se encuentran en un tercio de los carcinomas mamarios en donde su sobreexpresión está asociada con un alto riesgo de recidiva y baja sobrevida, principalmente por su relación con el compromiso ganglionar^{4,7,9,10}. Por otro lado la existencia de sitios de unión de ADN de p53 en la secuencia promotora del gen que codifica la catepsina D deja en evidencia la relación directa entre la expresión de p53 y catepsina D^{4,5,7}. El gen p53 es importante en el control del ciclo celular y la apoptosis. Es un gen supresor que se encuentra en el cromosoma 17 y codifica una proteína nuclear de 53 Kd. La función del p53 en estado normal es la de regulación del ciclo celular ante un daño del ADN, por lo que se le ha denominado guardián del genoma. Cuando el ADN se daña, el p53 se acumula en el núcleo, y es capaz de detener el ciclo celular en G1 antes que se duplique el ADN e iniciar su reparación. La p53 va a inducir la síntesis de proteínas inhibitoras de los complejos ciclina-CDKs, bloqueando el ciclo celular. Si se repara la lesión el ciclo continúa, de lo contrario se induce la apoptosis de la célula. La alteración de la proteína p53 produce inestabilidad genómica. Las células son incapaces de evitar la prolifera-

ción o activar la apoptosis de manera que acumulan mutaciones que conducen a la carcinogénesis. Las mutaciones del P53 se encuentran en aproximadamente la mitad de los tumores humanos malignos. Son fundamentalmente mutaciones por sustitución, en las que se cambia un aminoácido. En Medicina Humana el p53 aparece mutado en el 40 % de los carcinomas de mama mientras que en Medicina Veterinaria entre el 15 y el 30 % de los tumores mamarios caninos presentan el gen mutado como signo de mal pronóstico relacionado con diseminación y metástasis^{4,5}.

La incorporación de marcadores tumorales a los estudios realizados de rutina permitirá identificar pacientes de alto riesgo que sólo tendrán posibilidades de supervivencia a expensas de terapéuticas muy agresivas, que generalmente van acompañadas por una gran morbi-mortalidad, y por otro lado evitará sobretratamientos en pacientes de bajo o moderado riesgo y dará lugar a la investigación de nuevos tratamientos en pacientes con características comparables.

El objetivo del presente trabajo fue investigar la expresión de Catepsina D y su relación con otros factores de mal pronóstico en cáncer mamario canino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se trabajó con 23 pacientes caninos con tumores de mama malignos confirmados por histopatología, provenientes del Servicio de Oncología General de la Facultad de Ciencias Veterinarias-UBA.

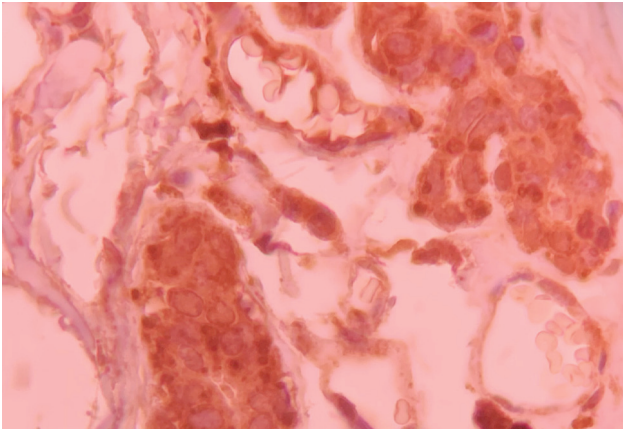
Histopatología

Las muestras de tejido mamario fueron fijadas en formalina bufferada al 10 % y procesadas por el método histológico convencional, que consiste en la deshidratación en alcoholes ascendentes y su inclusión en parafina. Posteriormente los cortes de 5 µm, se tiñeron con hematoxilina-eosina.

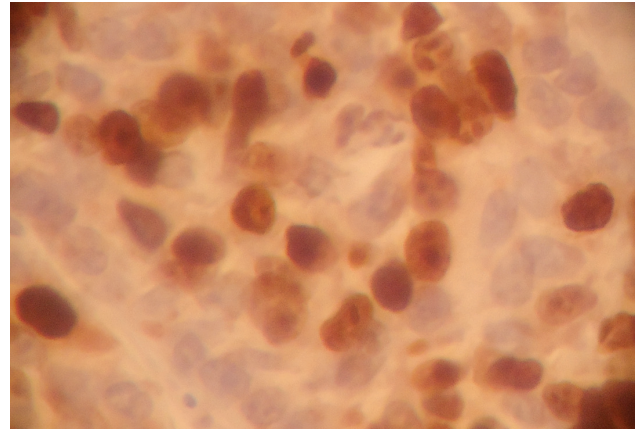
Inmunohistoquímica

Anticuerpos monoclonales utilizados

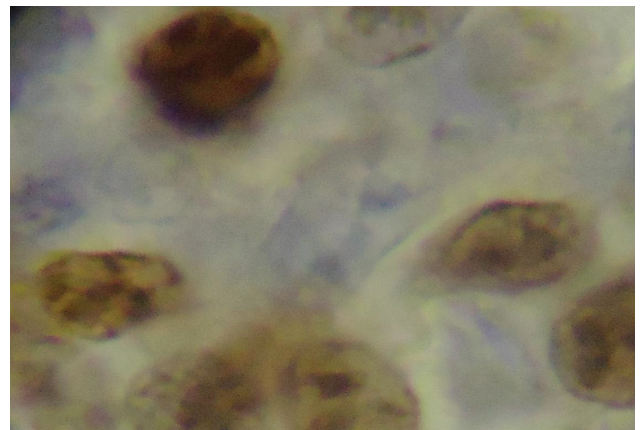
- Anticuerpo monoclonal de ratón an-



F.1



F.2



F.3

FIGURA 1. Catepsina D.

FIGURA 2. Ki67.

FIGURA 3. Herb2Neu.

- ti-p53 (clon EP9, Cell Marque, Rockling, CA, USA).
- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-catepsina D (clon D-5, Santa Cruz, Biotechnology, CA, USA).
- Anticuerpo monoclonal de conejo anti-Receptor de estrógeno (RE clon SP1, Cell Marque, Rockling, CA, USA.)
- Anticuerpo monoclonal de conejo anti-receptor de progesterona (RP clon Y85, Cell Marque, Rockling, CA, USA.).
- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-Herb2-Neu (c-erbB-2) (clon CB-11).
- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-Ki67 (clon SP6, Cell Marque, Rockling, CA, USA.).

Procesamiento de las muestras

Para la detección de p53, receptores hormonales, Herb2-Neu y Ki67 las secciones de tejido fueron desparafinadas y rehidra-

tadas. Para la recuperación antigénica se utilizó la técnica recuperación de epitopes inducida por calor (HIER) utilizando el reactivo Trilogy de Cell Marque lo que permitió el desparafinado, rehidratación y recuperación antigénica en forma simultánea. Luego los portaobjetos se lavaron con agua destilada y se incubaron con el anticuerpo primario (dilución 1:100) durante 1 hora a temperatura ambiente, y se lavaron con Tris-solución salina bufferada (TBS). El anticuerpo secundario (Cell Marque, Rockling, CA, USA) se aplicó durante 10 minutos y lavados nuevamente con TBS. El color fue desarrollado a los 5 minutos de incubación con el cromógeno. Por último, las muestras fueron deshidratadas y cubiertas con un portaobjetos. Para la detección de Catepsina D las secciones de tejido fueron desparafinadas y rehidratadas. Se realizó tratamiento térmico para la recuperación antigénica utilizando tampón de citrato de sodio 10 mM a pH 6.0 y

Tabla 1. Interpretación: patrón de tinción para Catepsina D, p53 y receptores hormonales.

Rango	Reporte	Interpretación
0	Negativo	Baja positividad: menos del 10%
1	Positivo	Alta positividad: más del 10%

Tabla 2. Interpretación: patrón de Tinción para Herb2-Neu.

Rango	Reporte	Interpretación
0	Negativo	No se observa tinción o la tinción en membrana es en menos del 30% de las células tumorales
1	Negativo	Tinción levemente perceptible en más del 30% de células. Se tiñe parte de la membrana celular
2	Positivo	Tinción leve/moderada de la membrana completa en más del 30% de las células tumorales
3	Positivo	Tinción intensa en la membrana completa en más del 30% de las células tumorales.

Tabla 3. Interpretación: patrón de Tinción para Ki67

Rango	Reporte	Interpretación
1	Negativo	Baja positividad: entre el 11 y el 39%
2	Positivo	Alta positividad: entre el 40 y el 65%

a 95 °C durante 5 minutos. Posteriormente se lavaron con agua desionizada. Luego se incubaron con el anticuerpo primario (dilución 1:100) durante 1 hora a temperatura ambiente, y se lavaron con Tris-solución salina bufferada (TBS). El anticuerpo secundario (Santa Cruz, Biotechnology, CA, USA) se aplicó durante 10 minutos y lavados nuevamente con TBS. El color fue desarrollado a los 5 minutos de incubación con el cromógeno. Por último, las muestras fueron deshidratadas y cubiertas con un portaobjetos.

Evaluación de la inmunomarcación

Las muestras fueron evaluadas simultáneamente por dos observadores, primero a bajo aumento (x40) y luego a gran aumento (x100) para el recuento. Se evaluaron 3000 células tumorales y se calculó el porcentaje de células con expresión positiva para Catepsina D, p53, receptores hormonales, Herb2-Neu y Ki67 sobre el total

de células tumorales evaluadas (Figuras 1, 2 y 3). Los resultados se interpretaron según las Tablas 1, 2 y 3.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de la situación con medidas de posición y con el estudio de las frecuencias de distribución. Para evaluar sobrevida global se empleó el método estadístico de análisis de supervivencia de Kaplan Meier. La comparación entre ellos se realizó mediante el test de Logrank y Cox-Mantel, considerándose significativos los p menores o iguales a 0.05. Se analizó la correlación entre los resultados obtenidos de la marcación de Ki67, Herb2-Neu, receptores hormonales, p53 y de Catepsina D utilizando el coeficiente de correlación de Spearman, considerándose significativos los p menores o iguales a 0.05.

RESULTADOS

Del total (n = 23) de muestras histopatológicas pertenecientes a pacientes con tumores mamarios malignos el 43,48 % (n = 10/23) presentaron expresión positiva para Catepsina D y el 56,52% (n = 13/23) presentaron expresión negativa. El grupo de pacientes con expresión positiva para Catepsina D presentó diferencias significativas con relación al grupo con expresión negativa, con una mediana de supervivencia de 280 y 990 respectivamente (p = 0.025) (Figura 4). Al relacionar presencia o ausencia de compromiso ganglionar y metástasis con la expresión de Catepsina D se observó que el 70 % de pacientes del grupo con expresión positiva para Catepsina D (n = 7/10) presentaron compromiso ganglionar y metástasis, mientras que solo el 15,38 % de pacientes del grupo con expresión negativa para Catepsina D (n = 2/13) presentaron compromiso ganglionar y metástasis. De la evaluación de los demás factores en estudio se observó expresión positiva en 18/23 (78,3 %) para p53, en 12/23 (52,2 %) para Ki67, en 5/23 (21,7 %) para ER, RP o ambos y en 12/23 (52,2 %) para Herb2-Neu. En el grupo con expresión positiva para Catepsina D con compromiso ganglionar y metástasis (n = 7/10) se observó una correlación positiva entre los resultados obtenidos de evaluar la expresión de Catepsina D, la expresión del gen mutante p53, la marcación de Ki67 y la sobreexpresión de Herb2-Neu (p ≤ 0.0001) y una correlación negativa con los resultados obtenidos de la marcación de receptores hormonales (p = 0.001).

CONCLUSIONES

En concordancia con la bibliografía consultada, la expresión de catepsina D se asoció a corta sobrevida global, alta capacidad invasiva del tumor dada por su actividad proteolítica y promotora del crecimiento que asociada a la expresión de p53, favoreció el compromiso ganglionar y la posibilidad de metástasis^{4,5}. En los casos con expresión positiva para Catepsina D se observó una correlación positiva entre la expresión del gen mutante p53 y la marcación del Ki67, ya que el gen p53 se considera un regulador negativo del crecimen-

to celular y el antígeno Ki67 identifica las células proliferantes^{4,5,7,8}. Cuanto mayor es la presencia del antígeno Ki67, más agresivo es el tumor, con mayor invasión vascular y posibilidad de metástasis mientras que la pérdida de la función supresora del gen p53 activa el crecimiento celular aumentando el riesgo de progresión de la neoplasia^{4,5,7,8}. La expresión de Catepsina D, del gen mutante p53 y del antígeno Ki67 se correlacionaron en forma positiva con la sobreexpresión del Herb2-Neu lo cual también implica un mal pronóstico, por su asociación a altos niveles de proliferación celular^{2,3,4,5}. También acorde a lo reportado en Medicina Humana y Veterinaria, se observó una correlación negativa entre la expresión de receptores hormonales y la expresión de p53, Herb2-Neu y Ki67 en relación al grupo de pacientes con tumores malignos^{2,3,4,6}. No obstante se requiere de más estudios que involucren un mayor número de pacientes y que validen dichos hallazgos.

Bibliografía

1. Kaszak I.; Ruszczak A.; Kanafa S.; Kacprzak K.; Król M.; Jurka P. (2018). Current biomarkers of canine mammary tumors. *Acta Vet. Scand.*, 29;60(1):66. doi: 10.1186/s13028-018-0417-1.
2. Andrea G.K.; Marko H.; Branka A.; et. al. (2011): Histopathological evaluation and immunohistochemical study of estrogen receptor , HER-2 and Ki-67 in canine neoplastic mammary lesions. *Veternarski arhiv.*, 81(6),709-722.
3. Carvalho MI.; Pires I.; Prada J.; Lobo L.; Queiroga FL. (2016): Ki-67 and PCNA Expression in Canine Mammary Tumors and Adjacent Nonneoplastic Mammary Glands: Prognostic Impact by a Multivariate Survival Analysis. *Vet. Pathol.*,53(6):1138-1146.
4. Guerra E. et. al. (2016). P53, cathepsin D, Bcl-2 are joint prognostic indicators of breast cancer metastatic spreading. 18;16:649. doi: 10.1186/s12885-016-2713-3.
5. Klopffleisch R.; Gruber, AD. (2009). Differential expression of cell cycle regulators p21, p27 and p53 in metastasizing canine mammary adenocarcinomas versus normal mammary glands. *Res Vet Sci.* Aug; 87(1):91-6.
6. Kabir FML.; DeInnocentes P.; Agarwal P.; Mill CP.; Riese Nd DJ.; Bird RC. (2017). Estrogen receptor- , progesterone receptor, and c-erbB/HER-family receptor mRNA detection and phenotype analysis in spontaneous canine models of breast cancer. *Send to J. Vet. Sci.* 30;18(2):149-158. doi: 10.4142/jvs.2017.18.2.149.
7. Huang L.; Liu Z.; Chen S.; Liu Y.; Shao Z. (2013). A prognostic model for triple-negative breast cancer patients based on node

status, cathepsin-D and Ki-67 index. *PLOS One*. 10;8(12):e83081. doi: 10.1371/journal.pone.0083081.

8. Kadthur S. et. al. (2011). Prognostic Value of Ki 67 Proliferation Antigen in Canine Malignant Mammary Gland Tumours. *Braz J Vet. Pathol.*, 4(1),36-40.
 9. Dian D.; Heublein S.; Wiest I.; Barthell L.; Friese K.; Jeschke U. Significance of the tumor protease cathepsin D for the biology of breast cancer. (2014). *Histol Histopathol*, 29(4):433-8.
 10. Dian D.; Vrekoussis T.; Shabani N.; Mylonas I.; Kuhn C.; Schindlbeck C.; Navrozoglou I.; Friese K.; Makrigiannakis A.; Jeschke U. (2012). Expression of cathepsin-D in primary breast cancer and corresponding local recurrence or metastasis: an immunohistochemical study. *Anticancer Res. Mar*;32(3):901-905.
-