

Caracterización inmunohistoquímica de los tumores hepáticos en el perro

ANTONIO ESPINOSA
DE LOS MONTEROS Y ZAYAS

RESUMEN

La expresión inmunohistoquímica de las proteínas oncofetales alfa-fetoproteína (AFP) y antígeno carcinoembrionario (ACE) y de las proteínas de los filamentos intermedios de queratinas y vimentina ha sido analizada en 18 carcinomas hepáticos caninos. Salvo los carcinomas hepatocelulares y un carcinoma pobremente diferenciado, todos los tumores fueron AFP-negativos y solamente los colan-giocarcinomas y los carcinomas mixtos (hepatocelulares y colangiocelulares) mostraron reacción con el anticuerpo anti-ACE. Todos los tipos histológicos de los tumores expresaron queratinas de alto y bajo peso molecular, mientras que la expresión conjunta de vimentina y queratina se observó en tres tumores (un carcinoma hepatocelular moderadamente diferenciado, un carcinoma mixto y un carcinoma pobremente diferenciado). Estos hallazgos demuestran la posibilidad del uso de métodos inmunohis

ABSTRACT

Immunohistochemical evaluation of canine primary liver carcinomas

The immunohistochemical expression of the oncofetal proteins alpha-fetoprotein (AFP) and carcinoembryonic antigen (CEA), and the intermediate filament proteins keratin and vimentin was analysed in 18 canine liver carcinomas. All the tumours other than hepatocellular carcinomas, with the exception of one poorly differentiated carcinoma, were AFP negative, and only cholangiocarcinomas and mixed (hepatocellular and cholangiocellular) carcinomas were CEA positive. All the histological types of tumours expressed high and low molecular weight keratins, and keratin and vimentin were both expressed in three tumours (one moderately differentiated hepatocellular carcinoma, one mixed carcinoma and one poorly differentiated carcinoma). The findings demonstrated the use of immunohistochemical staining methods for analysing the expression of some tumour markers

INTRODUCCIÓN

Los carcinomas primarios de hígado son neoplasias infrecuentes en los animales domésticos (Ponomarkov y Mackey, 1976; Patnaik y cols., 1981; Trigo y cols., 1982; Postorino, 1989). Su incidencia es mayor en el perro, donde constituyen del 0,6 al 1,3 por ciento de todas las neoplasias (Postorino, 1989). Histológicamente, los carcinomas primarios de hígado caninos pueden tener su origen en los hepatocitos (hepatocelular), en el epitelio biliar (colangiocelular) o en ambos conjuntamente (hepatocolangiocelular) (Ponomarkov y Mackey, 1976; Patnaik y cols., 1981; Trigo y cols., 1982). La mayoría de estos tumores pueden ser diagnosticados histológicamente, si bien pueden presentarse dificultades cuando varios patrones histológicos coinciden en un mismo tumor (Patnaik y cols., 1981).

En este estudio investigamos si pueden ser demostrados al-

gunos marcadores tumorales, que habitualmente se emplean en el diagnóstico patológico humano, en muestras de tumores hepáticos caninos procesadas rutinariamente y utilizando métodos inmunohistoquímicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

En nuestro estudio hemos empleado 18 tumores, de los cuales 16 fueron fijados rutinariamente en líquido de Bouin y los otros 2 restantes en formol al 10%. En todos los casos la inclusión fue en parafina. Los anticuerpos empleados, su origen, sus diluciones y los tejidos utilizados como controles positivos se muestran en la Tabla 1.

La técnica inmunohistoquímica empleada fue la del complejo avidina-biotina peroxidasa según la describieron Martín de

las Mulas y cols. (1994). Para el estudio con los anticuerpos monoclonales anti-queratinas RCK-102 y NCL-5D3, los cortes histológicos fueron sometidos a pretratamientos enzimáticos con 0,1 % de pronasa (Protease E, Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los controles negativos se realizaron sustituyendo los anticuerpos específicos por tampón fosfato o suero no-inmune de conejo, en el caso de los anticuerpos policlonales, o por líquido ascítico de ratón, en el caso de los anticuerpos monoclonales.

RESULTADOS

Los tipos histológicos de los tumores (Ponomarkov y Mackey, 1976) y los resultados inmunohistoquímicos se muestran en la Tabla 2.

La especificidad de la inmunorreacción en los tejidos uti-

TABLA 1

Anticuerpos utilizados como controles positivos

Especificidad	Anticuerpos	Origen	Dilución	Controles positivos
AFP	Conejo; AP	AFP humana (1)	1:200	Hepatocitos perros jóvenes
ACE	Conejo; AP	ACE humano (2)	Pre-diluido	ADC colon humano Colon Canino
Queratina	Conejo; AP	Queratina hepidérmica humana (3)	1:800	Piel canina
Queratinas (5+8) (58 y 52'2 kD)	RCK-102 Ratón; AM	LCCP humana (3)	1:20	Piel canina
Queratinas (8+8+19) (52'2, 45 y 40 kD)	NCL-5D3 Ratón; AM	LCCM humana (3)	1:20	Piel canina
Vimentina	Conejo; AP	Cristalino ternero	1:180	Piel canina

AFP: Alfa-fetoproteína; ACE: Antígeno carcinoembrionario; AP: Anticuerpo policlonal; AM: Anticuerpo monoclonal; kD: kilodalton; LCCP: Línea celular de cáncer de pulmón; LCCM: Línea celular de cáncer de mama; (1): Dakopatts; (2): Merck; (3): Eurodiagnostics BV.

lizados como controles positivos (Tabla 1) con sus respectivos anticuerpos fue confirmada por la ausencia de reacción en esos mismos tejidos cuando el anticuerpo específico no era aplicado (controles negativos).

Las células alfa-fetoproteína (AFP)-positivas estaban presentes en tres de los carcinomas hepatocelulares y en uno de los carcinomas pobremente diferenciados. La inmunorreacción fue siempre de tipo focal y granular en el citoplasma de un número pequeño de células tumorales. Los controles positivos (hepatocitos procedentes de tejido hepático de un perro de dos días de edad) mostraron una reacción similar mientras que los hepatocitos de animales adultos fueron negativos.

Las células antígeno carcinoembrionario (ACE)-positivas estaban presentes en todos los colangiocarcinomas y en la porción colangiocelular de los carcinomas de patrón mixto. La inmunorreacción se observaba

a nivel intracitoplasmático en las células acinares tumorales y en la luz de los acinos. Los controles positivos utilizados (células epiteliales procedentes de muestras de colon de perro y el epitelio biliar procedente de hígados no neoplásicos) reaccionaron con este anticuerpo.

Con dos de los anticuerpos anti-queratinas empleados, el policlonal anti-queratina y el monoclonal anti-queratina RCK-102, se observaron células positivas en todos los tumores hepáticos en sus diferentes tipos histológicos, si bien hubo un mayor número de células inmunorreactivas con el anticuerpo RCK-102. En los carcinomas hepatocelulares bien diferenciados, la inmunorreacción se mostró a modo de halo citoplasmático periférico similar al observado en los hepatocitos normales. En el resto de tipos tumorales la inmunorreacción fue difusa e intracitoplasmática. En los hígados caninos no tumorales, el anticuerpo anti-queratina RCK-102 reaccionó

tanto con los hepatocitos (sólo en los tejidos fijados con líquido de Bouin) como con las células epiteliales biliares (independientemente del fijador utilizado). Estas últimas células también reaccionaron con el anticuerpo policlonal anti-queratina.

En los carcinomas hepatocelulares no se observó reacción con el anticuerpo monoclonal anti-queratina NCL-5D3 y fue muy escasa en el resto de tumores pertenecientes a otros tipos histológicos. La inmunorreactividad con el anticuerpo NCL-5D3 en los hepatocitos normales y en las células epiteliales biliares fue similar a la observada en esos mismos elementos celulares con el anticuerpo RCK-102 si bien con una menor intensidad.

Tanto las queratinas como la vimentina fueron observadas en uno de los carcinomas hepatocelulares moderadamente diferenciado, en la porción hepatocelular del carcinoma de

TABLA 2

Tipos histológicos de los tumores y los resultados inmunohistoquímicos

Tipo histológico del tumor	Número	AFP	ACE	Ker	RCK	NLC	Vim
Carcinoma hepatocelular							
Bien diferenciada	6	1	0	0	5	0	0
Moderadamente diferenciada	3	0	0	3	2	0	1
Pobremente diferenciada	2	2	0	0	0	0	0
Colangiocarcinoma							
Moderadamente diferenciada	2	0	2	2	2	1	0
Carcinoma	3	0	3	3	3	3	1
Carcinoma pobremente diferenciada	2	1	0	1	1	1	1
Totales	18	4	5	9	13	5	3

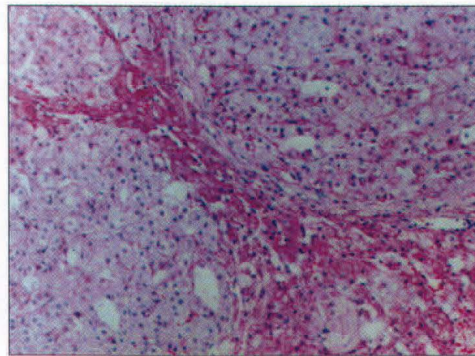
AFP: Alfa-fetoproteína; ACE: Antígeno carcinoembrionario; Ker: Queratina; RCK: RCK-102; NCL: NCL-5D3; Vim: Vimentina.

patrón mixto y en el carcinoma pobremente diferenciado que había mostrado inmunorreacción con el anticuerpo anti-AFP.

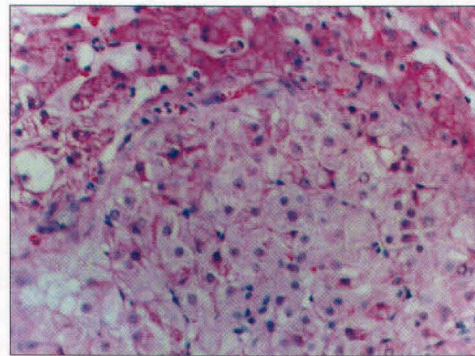
DISCUSIÓN

L número de trabajos sobre la evaluación inmunohistoquímica de los tumores en la especie canina ha ido incrementándose en los últimos años, pero los carcinomas de origen hepático no habían sido sometidos a este tipo de estudio. Nuestros resultados han demostrado la posibilidad del uso de los métodos inmunohistoquímicos para la demostración de la expresión de ciertos marcadores tumorales en muestras de carcinomas hepáticos caninos procesadas rutinariamente. Además, algunos de los marcadores tumorales utilizados se expresaron en tipos histológicos específicos de los tumores hepáticos. Por ejemplo, la AFP fue demostrada exclusivamente en los carcinomas hepatocelulares, mientras que el ACE se observó en los colangiocarcinomas y en los carcinomas de patrón mixto. En contraste, las proteínas de las queratinas de alto y bajo peso molecular no tuvieron un patrón definido en su expresión.

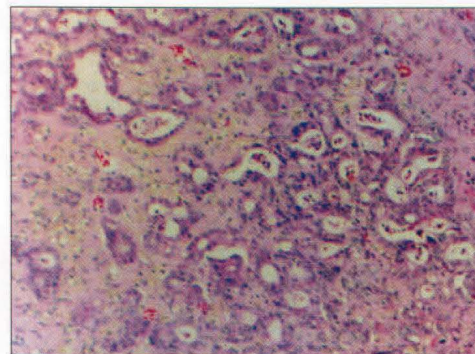
La alfa-fetoproteína, también llamada antígeno oncofetal, se expresa normalmente en tejidos fetales (hígado), estando ausente en los tejidos adultos, si bien tiene tendencia a ser re-expresada en neoplasias de tejidos adultos correspondientes al lugar de su producción fetal, princi-



Carcinoma hepatocelular. HE. X10.



Carcinoma hepatocelular. HE. X20.



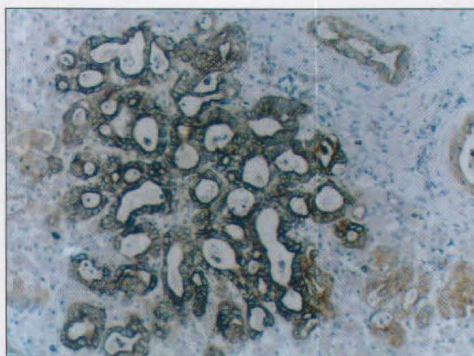
Colangiocarcinoma. HE. X20.

palmente en hígado (Taylor, 1986). Mediante técnicas de inmunoperoxidasa, del 30 al 70 %, según los distintos autores, de los carcinomas hepatocelulares del hombre se han mostrado positivos a la AFP (Thung y cols., 1979; Kojiro y cols., 1981; Taylor, 1986), aunque también ha sido detectada en carcinomas hepatocolangiulares humanos (Goodman y cols., 1985; Ferrández-Izquierdo y Llombart-Bosch, 1987) exclusivamente en áreas de diferenciación hepatocelular. En el hombre, la AFP es un marcador de diferenciación hepatocelular muy específico pero no sensible, lo cual fue corroborado en nuestro estudio en los carcinomas hepatocelulares caninos, donde sólo tres de los once tumores analizados fueron inmunorreactivos (uno bien diferenciado y dos pobremente diferenciados). No se observó relación entre el grado de diferenciación y la expresión de AFP, como ha sido reseñada por otros autores (Brumm y cols., 1989), y las células tumorales de un carcinoma pobremente diferenciado reaccionaron con el anticuerpo anti-AFP. Además de afectar al hígado, este tumor invadía páncreas y su origen primario no pudo ser determinado histológicamente. En los seres humanos, la AFP ha sido observada también en carcinomas pancreáticos metastatizando a hígado (Hurlimann y Gardiol, 1991).

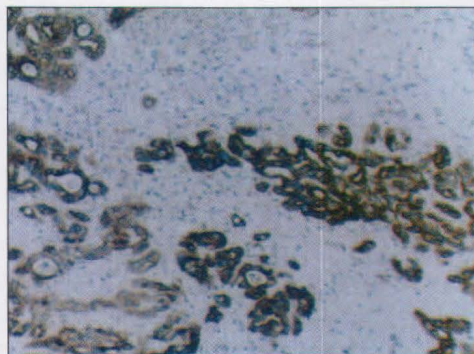
La AFP ha sido detectada serológicamente en perros con tumores hepáticos, mediante el uso de kits específicos para la determinación de AFP en el hombre (Lowseth y cols., 1991), a pesar del hecho de que el análisis electroforético

no reveló ninguna reacción cruzada entre el anticuerpo anti-AFP comercial de la casa Dakopatts y la AFP sérica canina (Hau y cols., 1990). No está claro si esta ausencia de reacción cruzada es también aplicable a los métodos inmunohistoquímicos, ya que un elevado grado de reactividad cruzada de los anticuerpos desarrollados frente a antígenos humanos se ha observado en tejidos de perros de la raza Beagle mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas (Smith, 1990). Además, algunos estudios previos han mostrado que la AFP canina es muy parecida a la molécula de la AFP humana (Nishi y cols., 1973).

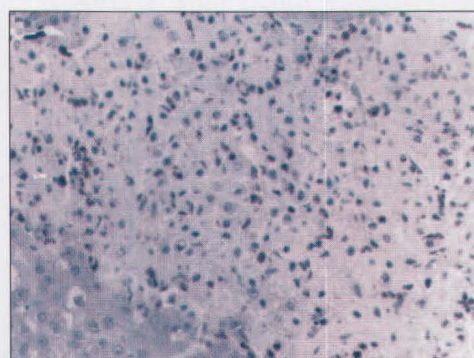
Además de los carcinomas que metastatizan a hígado (normalmente procedentes del tracto gastrointestinal), más del 70 % de los carcinomas hepatocelulares humanos y más del 40 % de los carcinomas colangiocelulares muestran una fuerte inmunorreacción frente a anticuerpos anti-ACE (Goodman y cols., 1985; Ma y cols., 1993). La reactividad frente al ACE en los carcinomas hepatocelulares tienen un patrón de tinción de claros canalículos biliares (Goodman y cols., 1985; Ma y cols., 1993) debido al hecho de que muchos anticuerpos policlonales frente al ACE muestran reacción cruzada con la glicoproteína I del epitelio biliar (Svenberg y cols., 1979), aunque la tinción intra-citoplasmática, la más característica en los carcinomas colangiocelulares, también ha sido descrita (Goodman y cols., 1985). De acuerdo con los resultados presentes, los carcinomas hepatocelulares del perro tienen un inmunofenotipo diferente con respecto al ACE, ya que nin-



Reacción epitelial con el anticuerpo anti-queratina en un colangiocarcinoma. X10.



Reacción epitelial con el anticuerpo anti-NCL en un colangiocarcinoma. X10.



Carcinoma hepatocelular, inmunoreacción con el anticuerpo anti-NCL. X10.

guno de ellos expresaron dicho antígeno. Por el contrario, en el perro parece ser que este anticuerpo es capaz de reconocer la diferenciación colangiocelular, reconocimiento que sólo puede ser llevado a cabo en los tumores humanos mediante el uso de anticuerpos mono-clonales frente al ACE (Brumm y cols., 1989; Hurlimann y Gardiol, 1991). Estudios inmunohistoquímicos previos desarrollados en el perro, utilizando diversos anticuerpos policlonales anti-ACE, han proporcionado diversos resultados. Así, se ha observado un elevado grado de reactividad cruzada entre anticuerpos anti-ACE humanos y tejidos de perros beagles (Smith, 1990), pero no se han visto reacciones cruzadas entre tejidos normales y otros anticuerpos anti-ACE (Ferrer y cols., 1990; Rabanal y cols., 1992). El anticuerpo anti-ACE utilizado en nuestro estudio mostró reacción con tejidos caninos normales, por ejemplo, el epitelio biliar y las células epiteliales del colon en perros adultos. Estas discrepancias con respecto a la reactividad de los tejidos con anticuerpos anti-ACE es bien conocida en el hombre y puede ser atribuida a las diferencias entre la especificidad y sensibilidad de las técnicas, los reactivos y anticuerpos empleados.

El inmunofenotipo de las queratinas en los tumores hepáticos del perro es similar a la descrita para estos mismos tumores en el hombre, ya que todos los tipos histológicos expresan queratinas de alto y bajo peso molecular (Van Eyken y cols., 1988; Hurlimann y Gardiol, 1991). Los hepatocitos humanos expresan las queratinas de bajo peso

molecular 8 y 18, mientras que el epitelio de los conductos biliares normalmente expresan las queratinas 7 y 19 (Van Eyken y cols., 1988). Sin embargo, los carcinomas hepatocelulares no siempre mantienen la expresión de las queratinas que normalmente muestran las células normales, ya que suelen expresar queratinas de alto peso molecular, particularmente la 7 y 19 (Van Eyken y cols., 1988; Hurlimann y Gardiol, 1991). Los hepatocitos caninos fijados en líquido de Bouin reaccionaron con los anticuerpos que reconocen la queratina 8 (RCK-102) y las queratinas

8 y 18 (NCL-5D3), mostrando así un inmunofenotipo similar a los hepatocitos humanos. La ausencia de reacción con ambos anticuerpos monoclonales mostrada por los hepatocitos y los tumores hepáticos fijados con formol, que también ha sido observada por Hurlimann y Gardiol (1991), puede ser atribuida al enmascaramiento de los determinantes antigénicos por este fijador, junto con la presencia de pequeñas cantidades de antígeno, ya que las células de los conductos biliares, los colangiocarcinomas y los carcinomas mixtos mostraron una intensa inmunorreacción.

La expresión conjunta de las proteínas de los filamentos intermedios de vimentina y queratina ha sido descrita en los tumores hepáticos primarios del hombre (Brumm y cols., 1989; Hurlimann y Gardiol, 1991) y atribuida a su indiferenciación, ya que todos ellos eran tumores pobremente diferenciados (Brumm y cols., 1989). En el presente estudio, ambas proteínas de filamentos intermedios se expresaron en un carcinoma moderadamente diferenciado, en un carcinoma mixto y en un carcinoma pobremente diferenciado.

BIBLIOGRAFÍA

- Brumm, C.; Schulze, C.; Charrels, K.; Morohoshi, T. & Klöppel, G. (1989): "The significance of alpha-fetoprotein and other tumour markers in differential immunocytochemistry of primary liver tumours". *Histopathology*, 14: 503-513.
- Ferrández-Izquierdo, A. & Lombart-Bosch, A. (1987): "Immunohistochemical characterization of 130 cases of primary hepatic carcinomas". *Pathology Research and Practice*, 182: 783-791.
- Ferrer, L.; Rabanal, R.; Fondevila, D. & Prats, N. (1990): "Immunocytochemical demonstration of intermediate filament proteins, S-100 protein and CEA in apocrine sweat glands and apocrine derived lesions in dogs". *Journal of Veterinary Medicine A*, 37: 569-576.
- Goodman, Z. D.; Ishak, K. G.; Laangloss, J. M.; Sesterhenn, I. A. & Rabin, L. (1985): "Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma. A histologic and immunohistochemical study". *Cancer*, 55: 124-135.
- Hau, J.; Nilsson, M.; Skovgaard-Jensen, H.-J.; De Souza, A.; Eriksen, E. & Wandall, L. T. (1990): "Analysis of animal serum proteins using antisera against human analogous proteins. A study of immunological cross reaction between human and animal serum proteins". *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Sciences*, 17: 3-7.
- Hurlimann, J. & Gardiol, D. (1991): "Immunohistochemistry in the differential diagnosis of liver carcinomas". *American Journal of Surgical Pathology*, 15: 280-288.
- Kojiro, M.; Kawaro, Y.; Isomura, T. & Nakashima, T. (1981): "Distribution of albumin and/or alpha-fetoprotein positive cells in hepatocellular carcinoma". *Laboratory Investigation* 44, 221-226.
- Lowseth, L. A.; Gillett, N. A.; Chang, I.-Y.; Muggenburg, B. A. & BOECKER, B. B. (1991): "Detection of alpha-fetoprotein in dogs with hepatic tumors". *Journal of American Veterinary Medical Association*, 199: 735-741.
- Ma, C. K.; Zarbo, R. J.; Frierson, H. F. & Lee, M. W. (1993): "Comparative immunohistochemical study of primary and metastatic carcinomas of the liver". *American Journal of Pathology*, 99: 551-557.
- Martín de las Mulas, J.; Espinosa de los Monteros, A.; Carrasco, L.; Sierra, M. A. & Vos, J. H. (1994): "Immunohistochemical distribution of vimentin, desmin, glial fibrillary acidic protein and neurofilament proteins in feline tissues". *Journal of Veterinary Medicine A*, 41: 1-15.
- Nishi, S.; Watabe, H. & Hiral, H. (1973): "Species cross-reaction of alpha-fetoprotein and break-down of the tolerance to alpha-fetoprotein by immunization with heterologous alpha-fetoprotein". *Tumour Research*, 8: 17-22.
- Patnaik, A. K.; Hurvitz, A. I.; Lieberman, P. H. & Johnson, G. F. (1981): "Canine hepatocellular carcinoma". *Veterinary Pathology*, 18: 427-438.
- Ponomarev, V. & Mackey, L. J. (1976): "Tumours of the liver and biliary systems".

Bulletin of the World Health Organization, 53: 187-194.

- **Postorino, N. C.** (1989): "Hepatic tumors". In *Clinical Veterinary Oncology*. Eds S. J. Withrow and E. G. MacEwen. Philadelphia, J. B. Lippincott, pp. 196-200.
- **Rabanal, R.; Fondevila, D.; Vargas, A.; Ramis, A. & Badiola, J.** (1992): "Immunocytochemical detection of amylase, carboxypeptidase A, carcinoembryonic antigen and alpha-1-antitrypsin in carcinomas of the exocrine pancreas of the dog". *Research in Veterinary Science*, 52: 217-223.
- **Smith, R. A.** (1990): "Evaluation of cross-species reactivity of antibodies to human antigens in animal models using immunoperoxidase techniques". *Journal of Histochemistry*, 13: 255-269.
- **Svenberg, T.; Hammarström, S. & Hedin, A.** (1979): "Purification and properties of biliary glycoprotein I (BGPI). Immunochemical relationship to carcinoembryonic antigen". *Molecular Immunology*, 16: 245-252.
- **Taylor, C. L.** (1986): "Immunomicroscopy: a diagnostic tool for the surgical pathologist". In *Major Problems in Surgical Pathology*. Vol 19. Ed J. L. Bennington. London, W. B. Saunders Company, pp. 253-259.
- **Thung, S. N.; Gerber, M. A.; Sarno, E. & Popper, H.** (1979): "Distribution of five antigens in hepatocellular carcinoma". *Laboratory Investigation*, 41: 101-105.
- **Trigo, F. J.; Thompson, H.; Breeze, R. G. & Nash, A. S.** (1982): "The pathology of liver tumours in the dog". *Journal of Comparative Pathology*, 92: 21-37.
- **Van Eyken, P.; Sciot, R.; Paterson, A.; Callea, F.; Kew, M. C. & DESMET, V. J.** (1988): "Cytokeratin expression in hepatocellular carcinoma: An immunohistochemical study". *Human Pathology*, 19: 562-568.

BIOGRAFÍA

Antonio Espinosa de los Monteros y Zayas

Nació en Córdoba en 1966. Licenciado en Veterinaria por la Universidad de Córdoba. En 1991 se incorpora a la U.L.P.G.C. como becario de investigación para pasar en 1993 a Profesor Asociado del Departamento de Morfología. En mayo de 1994 se doctoró en Veterinaria consiguiendo el Premio Extraordinario de Doctorado en el Área de Ciencias de la Salud. Ha participado en varios proyectos de investigación dentro del Área de Anatomía Patológica Veterinaria. Ha publicado casi una veintena de artículos

en prestigiosas revistas internacionales. En los últimos años se especializó en Oncología Veterinaria, colaborando con la Facultad de Veterinaria de Córdoba y Utrecht (Holanda), donde ha realizado varias estancias.

Dirección:

Departamento de Morfología
Facultad de Veterinaria.
C/. Francisco Inglott Ariles, 12 A
35016 - Las Palmas de Gran Canaria.

Este trabajo ha sido patrocinado por:

UNIÓN ELÉCTRICA DE CANARIAS (UNELCO)