



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable

**Evaluación histopatológica y asociación clínica de
mastocitomas caninos**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta

MVZ Alma Lorena Pérez Gómez

Dirigida por

MSPAS Alejandro Enríquez Vázquez

MSPAS Alejandro Enríquez Vázquez

Presidente

Dra. Xóchitl Zambrano Estrada

Secretario

Dra. Eurídice Padilla Gómez

Vocal

MSPAS Paola Jazmín Aranda Vargas

Suplente

MSPAS Orlando Federico Chávez Moreno

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Agosto 2020

México

AGRADECIMIENTOS

Al programa de Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable de la Universidad Autónoma de Querétaro, profesores y administrativos que lo conforman, por su apoyo y por la beca otorgada.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada (926464).

A mis profesores y miembros del comité, por su apoyo y enseñanzas.

A la técnico Raquel Cervantes, por su gran ayuda.

A mi madre y abuela, por ser siempre un pilar importante en mi vida y darme su apoyo incondicional.

A mi esposo e hijo, por ser mi motivación y razón de seguir adelante y por su amor que siempre me impulsa.

A mis compañeros de maestría, por siempre mostrar unión y apoyo.

A los médicos veterinarios que remitieron sus muestras y aportaron información de sus pacientes para el desarrollo de este proyecto.

RESUMEN

El propósito de este trabajo fue evaluar los grados histopatológicos de mastocitomas caninos utilizando los sistemas de clasificación de Patnaik y Kiupel, y asociarlo con información clínica referente a edad, sexo y raza de los perros, así como, localización, cantidad, tamaño y aspecto de los tumores. Se analizaron 37 muestras de 36 perros domésticos. Las razas más frecuentes fueron Bóxer, Pug y mestizos, el grupo de edad más frecuente, de 6 a 9 años y, los miembros locomotores, el tronco y el escroto, las localizaciones más frecuentes. Por el esquema de Patnaik se obtuvieron 16% grado I, 60% grado II y 24% grado III, mientras que por el de Kiupel se obtuvieron 13.5% subcutáneos y 86.5% cutáneos. De estos últimos, el 62% se clasificó como bajo grado y el 38% como alto grado. Se encontró asociación estadística con la prueba de Chi cuadrada de los tumores grado III (Patnaik) con localización en pezón ($p=0.00$) y presentación única ($p=0.03$), así como de los tumores alto grado (Kiupel) con edad mayor a 6 años ($p=0.03$), raza mestizo ($p=0.01$), ubicación en pezón ($p=0.01$) y presentación única ($p=0.00$). Se obtuvo el seguimiento clínico de 30 pacientes y se encontró asociación estadística de las recurrencias con tumores grado III ($p=.012$) y alto grado ($p=.001$). Se realizó el conteo mitótico y se encontró asociación estadística ($p=0.000$) de tipo lineal proporcional entre tumores grado III y alto grado con este marcador. Este es el primer reporte de mastocitomas caninos en Querétaro, por lo que sirve como base para investigaciones posteriores. Muchos resultados coinciden con lo observado en investigaciones a nivel mundial, sin embargo, la asociación estadística entre tumores de alta malignidad con la localización en pezón, la presentación única y la raza mestizo no se han observado anteriormente. Adicionalmente se recomienda el uso complementario de los sistemas de clasificación y la utilización del conteo mitótico por parte de los patólogos con el fin de proporcionar información íntegra y clara para la toma de decisiones de clínicos y propietarios.

Palabras clave: Mastocitoma canino, grados histopatológicos, conteo mitótico.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the histological degrees of the mast cell tumors using the Patnaik and Kiupel grading systems and to associate them with clinical information regarding age, sex and breed of the dogs, as well as the location, quantity, size and appearance of tumors. We analyzed 37 samples from 36 domestic dogs. The most frequent breeds were Boxer, Pug and crossbreeds, the most frequent age group, of 6 to 9 years and limbs, trunk and scrotum, the most frequent locations. By Patnaik's scheme, 16% were grade I, 60% grade II and 24% grade III; while by Kiupel's scheme, 13.5% were subcutaneous and 86.5% cutaneous. Of the latter 62% were classified as low grade and 38% as high grade. Statistical association was found for grade III tumors (Patnaik) with nipple location ($p=0.00$) and single presentation ($p=0.03$), as well as for high grade tumors (Kiupel) with age over 6 years ($p=0.03$), mixed breed ($p=0.01$), nipple location ($p=0.01$) and single presentation ($p=0.00$). Follow-up of 30 patients was obtained and a statistical association was found between their recurrences with grade III ($p=.012$) and high grade ($p=.001$) tumors. Mitotic counting was performed, and a linear proportional statistical association ($p=0.000$) between grades III and high was found with this marker. This work is the first report of canine mast cell tumors in Queretaro, so it serves as a basis for further research. Many of the results match with that observed in worldwide research, however, the statistical association between high-malignancy tumors with location in the nipple, single presentation and mixed breed dogs have not been described previously. Additionally, the complementary use of the grading systems and the use of mitotic count by pathologists are promoted in order to provide complete and clear information for the decision-making of clinicians and owners.

Key words: Mast cell tumor, histopathologic grades, mitotic count.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
RESUMEN	ii
ABSTRACT	iii
ÍNDICE.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Mastocitos.....	2
2.2 Mastocitomas en perros	3
2.3 Diagnóstico de mastocitomas caninos	7
2.3.1 Características citológicas	8
2.3.2 Clasificación histológica según Patnaik	9
2.3.3 Clasificación histológica según Kiupel	11
2.3.4 Uso complementario de ambas clasificaciones.....	16
2.4 Pronóstico.....	17
2.4.1 Estadificación	17
2.4.2 Evaluación de márgenes	21
2.4.3 Marcadores de proliferación celular y KIT	24
III. JUSTIFICACIÓN.....	30
IV. HIPÓTESIS.....	30
V. OBJETIVOS.....	31
5.1 General	31
5.2 Específicos	31
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
6.1 Obtención de muestras	32
6.2 Inclusión en parafina y corte	32

6.3	Tinción con Hematoxilina y Eosina.....	32
6.4	Histopatología y conteo mitótico.....	33
6.5	Estudios estadísticos	33
6.6	Desecho de residuos	33
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
7.1	Descripción de la población	34
7.2	Clasificación histopatológica	37
7.3	Relación clínico-patológica.....	39
7.4	Recurrencias.....	44
7.5	Conteo mitótico	46
7.6	Propuesta de reporte histopatológico.....	47
VIII.	CONCLUSIONES	50
IX.	REFERENCIAS	51

Dirección General de Bibliotecas UAG

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Criterios morfológicos para clasificación de mastocitomas según Patnaik	9
2	Criterios para estadificación en mastocitomas caninos	18
3	Criterios citológicos para la determinación de la metástasis de mastocitomas caninos a nódulos linfáticos regionales	19
4	Sistema de clasificación histopatológica para la evaluación de metástasis a nódulos linfáticos en mastocitomas caninos	20
5	Frecuencias de las características de los pacientes	34
6	Frecuencias de las características de los tumores	36
7	Frecuencia de grados histopatológicos por el esquema de Patnaik, en relación a las características de los pacientes y los tumores	40
8	Frecuencia de grados histopatológicos por el esquema de Kiupel, en relación a las características de los pacientes y los tumores	41
9	Significancias de las características de los pacientes y las masas tumorales grados II y III por el esquema de Patnaik	43
10	Significancias de las características de los pacientes y las masas tumorales de bajo y alto grado por el esquema de Kiupel	43
11	Información sobre recurrencias según el esquema de clasificación de Patnaik	45
12	Información sobre recurrencias según el esquema de clasificación de Kiupel	45
13	Resultados del conteo mitótico de las 37 muestras clasificadas según el esquema de Patnaik	46
14	Resultados del conteo mitótico de las 37 muestras clasificadas según el esquema de Kiupel	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Mastocito	2
2	Signo de Darier en mastocitoma cutáneo canino	7
3	Citología de mastocitoma	8
4	Grados histopatológicos por el esquema de Patnaik	11
5	Mastocitomas cutáneos	12
6	Mastocitomas subcutáneos	13
7	Mastocitomas de alto grado	14
8	Mastocitomas de bajo grado	14
9	Margen limpio y margen infiltrado en mastocitomas cutáneos	23
10	Mastocitos en mitosis	26
11	Tinción AgNOR de un mastocitoma cutáneo grado I/bajo grado	28
12	Distribución de los grados por el esquema de Patnaik de las muestras estudiadas	37
13	Clasificación de las muestras de mastocitomas cutáneos por el esquema de Kiupel	38
14	Clasificación por el esquema de Kiupel de los tumores grado II	39

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es la enfermedad que encabeza las causas de eutanasia y muerte de animales de compañía, alcanzando entre el 15 y el 30% en perros (Bronden et al., 2009). El primer reporte epidemiológico de México menciona que los tumores caninos con mayor prevalencia en machos y hembras son los de piel, seguidos por los tumores de glándula mamaria (Fajardo et al., 2013). En un estudio realizado en Italia, las neoplasias más prevalentes fueron el carcinoma mamario y el mastocitoma cutáneo (Baioni et al., 2017). Por su parte, en Perú, el mastocitoma representó el 23.7% de las neoplasias de origen mesenquimal en piel en caninos (Medina et al., 2017); mientras que en Suiza, la neoplasia más común en piel fue el mastocitoma con un total del 16.35%, seguido por el lipoma y el histiocitoma (Graf et al., 2018). Las razas Bóxer, Bulldog, American Staffordshire Terrier, Staffordshire Bull Terrier, Boston Terrier, Bulldog Francés y Pug suelen presentar mastocitomas de comportamiento benigno, al contrario de las razas Shar-Pei, Rottweiler y Labrador Retriever con predisposición a tumores agresivos (Mochizuki et al., 2016; Smiech et al., 2017). En orden de probabilidad, suelen presentarse más en tronco, extremidades, cabeza y cuello (Shaw et al., 2017; Smiech et al., 2017) y su presentación clínica es muy variable. El diagnóstico se basa en citología e histopatología; actualmente se utilizan dos esquemas de clasificación histopatológica, el descrito por Patnaik en 1984 y el descrito por Kiupel en 2011. Esta herramienta, con ayuda de la estadificación, la evaluación de los márgenes y el uso de marcadores de proliferación celular como conteo mitótico (CM), AgNOR y Ki67 dan la información completa para establecer un pronóstico certero y permitir la toma de decisiones correcta por parte del clínico y del dueño del paciente (Kiupel, 2017). La alta prevalencia del mastocitoma aunado a la variabilidad de su comportamiento biológico hacen de esta neoplasia un campo de estudio importante.

II. ANTECEDENTES

2.1 Mastocitos

Los mastocitos son células mieloides que se liberan de la médula ósea a la sangre como células indiferenciadas y maduran en los tejidos; se encuentran en piel, tejidos conjuntivos de diversos órganos y tejido epitelial mucoso de los tractos respiratorio, genitourinario y digestivo. Su núcleo es lobulado y en su citoplasma tienen una gran cantidad de gránulos metacromáticos que contienen histamina, heparina, proteasas y citocinas como IL-4, IL-13 y TNF- α , entre otras, por lo que poseen actividad antiparasitaria y vasodilatadora, regulan la inflamación y modulan la respuesta inmunitaria adaptativa (Fig. 1) (London y Thamm, 2013; Owen et al., 2014). Fueron identificados primeramente por Paul Ehrlich en 1878, su nombre deriva del alemán Mastzellen, que significa bien alimentadas, ya que pensó que sus gránulos eran depósitos de nutrientes (Ehrlich, 1878).

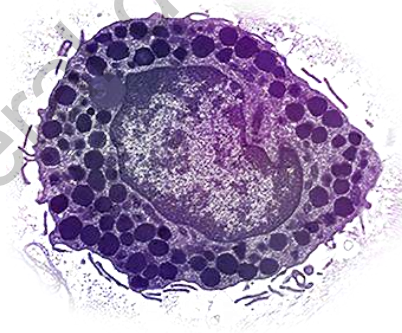


Figura 1. Mastocito Se observa el núcleo lobulado y el citoplasma con una gran cantidad de gránulos de diversos tamaños (MastCellAware, 2019).

La diferenciación de los mastocitos en mucosas es regulada por interleucinas liberadas por células T, mientras que la diferenciación de los mastocitos mesenquimales (que se encuentran en la piel) se debe al factor de células madre (SFC, por sus siglas en inglés, Stem Cell Factor), producido por fibroblastos y otras células de la médula ósea, y su efecto en el receptor tirosina quinasa conocido como KIT, el cuál es codificado por el gen *c-kit*. Este gen se expresa en todas las células

madre hematopoyéticas, sin embargo, en los mastocitos se mantiene durante su desarrollo y diferenciación, lo que les otorga un potencial de proliferación aún en sus últimas etapas de diferenciación (Ribatti et al., 2014; Kiupel, 2017).

Su función es primordial en la inmunidad innata, ya que al tener contacto con microorganismos liberan mediadores inflamatorios y factores vasoactivos mediante un proceso denominado degranulación. Poseen una gran cantidad de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) mediante los que reconocen la presencia de diversos patógenos y liberan combinaciones específicas de moléculas acorde al estímulo recibido. Uno de los mecanismos que provoca la degranulación es la unión de inmunoglobulinas E (IgE) a su receptor de membrana, que al momento de tener contacto con un antígeno provoca la activación del mastocito y la consecuente liberación de las sustancias contenidas en sus gránulos. Cuando este proceso se lleva a cabo de forma exagerada se produce una reacción de hipersensibilidad de tipo I o alergia (Tizard, 2009).

Cuando los mastocitos se transforman en células cancerosas producen una neoplasia llamada mastocitoma.

2.2 Mastocitomas en perros

Los mastocitomas son la neoplasia maligna más común en piel a nivel mundial, representando entre el 16 y el 25% de las neoplasias diagnosticadas en este órgano (London y Thamm, 2013; Ribatti et al., 2014; Mochizuki et al., 2016; Kiupel, 2017; Medina et al., 2017; Smiech et al., 2017). En México existe poca información al respecto, en un estudio realizado en Tamaulipas durante 2014 se encontró una frecuencia general del 6% para el mastocitoma entre todos los tipos de neoplasias caninas (De la Cruz Hernández et al., 2017). No se conoce la etiología de este tipo de cáncer, se ha descartado que sea de origen viral o producido por irritantes o carcinógenos tópicos. La única anomalía bien estudiada es la relacionada con el receptor KIT, las mutaciones en el gen que lo codifica son parte de la oncogénesis de aproximadamente 20 a 30% de los mastocitomas caninos y

se relacionan con un mayor riesgo de recurrencias y metástasis (London y Thamm, 2013).

El comportamiento biológico y las presentaciones clínicas de este tipo de cáncer son muy variables, puede ir desde benigno hasta altamente maligno, por lo tanto, el diagnóstico debe ser específico para lograr establecer un pronóstico y tratamiento correctos, lo cual ha representado un reto para los clínicos veterinarios (Mochizuki et al., 2016). Este tipo de neoplasia se desarrolla principalmente en la dermis y en el tejido subcutáneo pero se han reportado casos en tracto gastrointestinal, cavidad oral, conjuntiva, glándulas salivales, nasofaringe, laringe, pulmones, uretra, y médula espinal; por lo general, los mastocitomas viscerales son precedidos por un tumor cutáneo primario (Kiupel, 2017; Shaw et al., 2017). Los principales sitios de metástasis son nódulos linfáticos, hígado, bazo y médula ósea (Kiupel, 2017).

No se tiene un conocimiento preciso sobre predisposición de sexo o edad, sin embargo, un estudio en el que analizaron 9375 casos de mastocitomas cutáneos, mostró que el riesgo de presentar este tipo de neoplasia y la proporción de tumores de alto grado aumenta con la edad; la edad con mayor presentación fue de 8 a 9 años. Se compararon machos y hembras esterilizados y no esterilizados; las hembras no esterilizadas presentaron neoplasias a menor edad (7 ± 3 años), mientras que las hembras esterilizadas a una edad mayor (7.9 ± 2.9 años). Por otra parte, los machos y los animales no esterilizados tuvieron una ligera tendencia a presentar tumores de alto grado, por lo que, según este estudio, los machos no esterilizados tienen el mayor riesgo de presentar neoplasias de alto grado de malignidad (Mochizuki et al., 2016).

Las razas con mayor predisposición son Bóxer, Bulldog, American Staffordshire Terrier, Staffordshire Bull Terrier, Boston Terrier, Pug y Bulldog Francés. En estas razas, este tipo de neoplasias se presenta a menor edad y con mayor frecuencia, sin embargo, tienen un comportamiento menos agresivo que en otras razas. Por el contrario, razas como Shar-Pei, Rottweiler y Labrador Retriever

suelen presentar tumores agresivos (Mochizuki et al., 2016; Smiech et al., 2017). Ruiz Castillo et al. (2019) en Toluca de Lerdo, México, estudiaron a la población canina con mastocitoma del año 2011 al 2018; el promedio de edad fue de 7.4 años y el 60.9% de los afectados fueron machos. En cuanto a raza, el 31.2% fueron Bóxer, el 18.75% Labrador Retriever y 12.5% mestizos. De los raza Bóxer el 75% fueron machos, de los Labrador Retriever el 66.7% fueron hembras y en mestizos no hubo predilección de género.

En cuanto a la localización, los mastocitomas son más comunes en el tronco (48-65%), las extremidades (25-47%) y la cabeza y el cuello (10-13%) (Shaw et al., 2017; Smiech et al., 2017). Se ha demostrado una relación importante entre la agresividad del tumor y su localización, los tumores menos agresivos por lo general se ubican en torso y extremidades mientras que lo más agresivos en prepucio, escroto, ingle y axilas (London y Thamm, 2013; Smiech et al., 2017). Las masas solitarias son las más comunes, sin embargo, del 10 al 30% de los perros presentan masas múltiples que pueden ocurrir al mismo tiempo o subsecuentemente (Shaw et al., 2017). En el estudio realizado en Toluca de Lerdo, México se obtuvo una frecuencia de presentación del 40.38% en las extremidades, 30.76% en el tronco y 14.4% en cabeza (Ruiz Castillo et al., 2019).

Los mastocitomas por lo general se presentan como una masa bien definida que puede tener apariencia de piel normal, eritematosa, alopecica o ulcerada y que puede causar prurito. También pueden presentarse de forma multinodular, tener un diámetro de unos milímetros hasta mayor a 30 cm, e incluso aparecer como una inflamación difusa muy extendida en la piel. Debido a la variabilidad de su apariencia debe incluirse al mastocitoma como diagnóstico diferencial de cualquier masa cutánea (Moya García, 2011). Las masas solitarias bien circunscritas y alopecicas, suelen tener un crecimiento lento, mientras que aquellas que no están circunscritas, están ulceradas y causan prurito, suelen crecer rápidamente y por lo general son malignas, sin embargo, no se debe asumir que los tumores bien circunscritos son benignos. Los mastocitomas subcutáneos provocan protuberancias en la piel, son

suaves y raramente se ulceran. Cuando hay metástasis generalmente hay evidencia de linfadenomegalia u organomegalia a la palpación o en estudios de imagen (London y Thamm, 2013; Kiupel, 2017).

Los dueños de los perros afectados suelen describir que las masas aumentan y disminuyen de tamaño periódicamente, lo cual se debe a la liberación de histamina, heparina y otras aminas vasoactivas desde las células tumorales y por la degranulación de los eosinófilos que invaden el tumor. También la manipulación del tumor durante la revisión clínica provoca la liberación de estas sustancias que conlleva a una rápida inflamación y aparición de edema. Estos cambios de tamaño y enrojecimiento debidos a la vasodilatación y al edema intratumoral se conocen como signo de Darier (Fig. 2). Debido a la degranulación de los mastocitos, también puede presentarse signología sistémica, llamada síndrome paraneoplásico. Entre estas complicaciones se encuentran úlceras gastroduodenales, coagulopatías, retraso en los procesos de cicatrización e incluso shock hipotensivo. La complicación más común es la presencia de úlceras en la región antropilórica y en el duodeno proximal producidas por la liberación de histamina, que estimula los receptores H₂ causando una producción excesiva de ácido gástrico. Estas úlceras provocan vómito, diarrea, hematoquecia o melena, anemia, anorexia y dolor abdominal, que muchas veces son la razón de la visita al clínico veterinario (Moya García, 2011; London y Thamm, 2013; Kiupel, 2017; Shaw et al., 2017). Las alteraciones en la coagulación se deben a la liberación de heparina que puede provocar hemorragias durante la escisión quirúrgica o en aspiraciones con aguja delgada. El retraso en la cicatrización de la misma herida quirúrgica, con su consecuente ulceración, es producida por la liberación de enzimas proteolíticas y aminas vasoactivas que se unen a receptores de los macrófagos provocando que estos últimos liberen factores supresores de fibroblastos. Durante la cirugía el paciente puede presentar hipotensión por la liberación de histamina y otras sustancias vasoactivas (Moya García, 2011; London y Thamm, 2013).



Figura 2. Signo de Darier en mastocitoma cutáneo canino. Se aprecia el enrojecimiento y edema debido a la liberación de las sustancias vasoactivas de los mastocitos (London y Thamm, 2013)

2.3 Diagnóstico de mastocitomas caninos

Este se basa en citología e histopatología. Por lo general, el examen citológico es suficiente para llegar a un diagnóstico, sin embargo, la histopatología es imprescindible para confirmarlo, conocer el grado y llegar a un pronóstico. Actualmente se utilizan dos esquemas de clasificación histológica, el primero fue establecido por Patnaik en 1984 y clasifica a los mastocitomas en tres grados, bien diferenciados (grado I), medianamente diferenciados (grado II) y poco diferenciados (grado III). El segundo fue establecido en 2011 por Kiupel, que utiliza dos niveles, clasificando a los mastocitomas cutáneos como alto grado y bajo grado y dejando como categoría aparte a los subcutáneos. Éste último sistema tiene una consistencia de 97% entre distintos observadores y tiene una alta predicción de tiempos de supervivencia, mortalidad y de desarrollo de una nueva masa tumoral en el paciente, mientras que con el sistema de Patnaik se han observado ciertas inconsistencias principalmente en variaciones del diagnóstico entre observadores y predominancia del grado II. Debido a esto, se ha propuesto considerar el sistema de Kiupel como la clasificación estándar para los mastocitomas caninos (Kiupel et al., 2011; Sledge et al., 2016). Sin embargo, también se ha sugerido el uso de ambos esquemas de forma complementaria (Stefanello et al., 2015; VCS OPWG, 2017).

2.3.1 Características citológicas

Por lo general las citologías de los mastocitomas tienen una alta celularidad, la contaminación con sangre es común y usualmente contienen eosinófilos y fibroblastos. Además de las características de los tumores de células redondas (forma celular y nuclear de redonda a ovalada), los mastocitos tienen gránulos de finos a gruesos que adquieren un color morado cuando son teñidos con tinciones tipo Romanowsky. Los núcleos que son redondos y céntricos, muchas veces son difíciles de ver debido a la gran cantidad de gránulos en el citoplasma (Fig. 3) (DeNicola, 2007). Generalmente los gránulos dan el diagnóstico definitivo, sin embargo, aproximadamente del 15 al 20% de estos tumores al ser teñidos con Diff-Quik (una de las tinciones más comunes y usadas en la práctica veterinaria), los gránulos pueden no teñirse, por lo que la identificación de este tipo de tumor se hace muy difícil e incluso imposible. Debido a esto, se sugiere el uso de tinciones tipo Romanowsky, como May-Grünwald-Giemsa (MGG), para llegar a un diagnóstico definitivo en mastocitomas (DeNicola, 2007; Sabbatini et al., 2018).

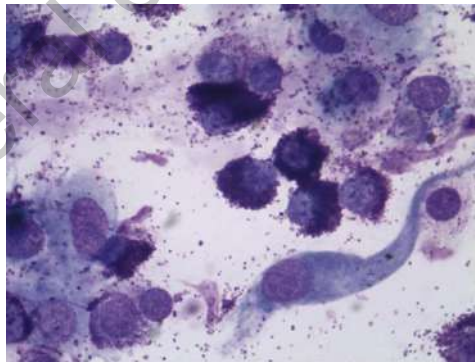


Figura 3. Citología de mastocitoma (Cortesía de Aldo Pavón) Se aprecian mastocitos con diferentes grados de granulación acompañados de un fibroblasto. Diff-Quick, 100x.

En diversos estudios se buscó clasificar a los mastocitomas cutáneos desde la citología con el objetivo de llegar a un pronóstico reduciendo el tiempo de espera a la histopatología y ayudar en la toma de decisiones para la escisión quirúrgica. Se obtuvieron resultados similares con un promedio de especificidad de 96.1% y de sensibilidad de 86.4%. Sin embargo, su mayor debilidad fue la probabilidad de

obtener falsos negativos, es decir, diagnosticar tumores de alto grado como bajo, por lo que la histopatología sigue siendo la prueba de oro. A pesar de lo anterior, la clasificación citológica si puede servir como herramienta para decisiones clínicas (Scarpa et al., 2014; Camus et al., 2016; Hergt et al., 2016).

2.3.2 Clasificación histológica según Patnaik

Este esquema fue propuesto por Patnaik et al. (1984) y clasifica a los mastocitomas caninos en tres grados según su nivel de diferenciación: grado I o bien diferenciados, grado II o medianamente diferenciados y grado III o poco diferenciados (Fig. 4). Las características morfológicas para la clasificación de cada grado se explican en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Criterios morfológicos para clasificación de mastocitomas según Patnaik et al. (1984)

	Grado I	Grado II	Grado III
Localización	Dermis y espacios interfoliculares.	Infiltra dermis profunda y tejido subcutáneo. Puede extenderse a músculo o tejido subyacente.	Reemplaza tejido subcutáneo y tejidos profundos.
Morfología celular	Monomórficas. Redondas con citoplasma amplio con gránulos de mediano tamaño.	Pleomorfismo moderado. Redondas a ovoides, con células fusiformes y gigantes dispersas. Algunas células no tienen el citoplasma definido y poseen gránulos grandes e hipercromáticos.	Pleomórficas. Redondas, ovoides o fusiformes de mediano tamaño. Citoplasma indefinido con gránulos finos a poco notorios, muchas células gigantes y células multinucleadas dispersas.
Morfología nuclear	Redondos con cromatina condensada.	Redondos a indentados con cromatina dispersa y un nucléolo, algunos con dos nucléolos.	Indentados a vesiculosos, con uno o más nucléolos prominentes, células binucleadas frecuentes.

Celularidad, arquitectura y reacción del estroma	Baja celularidad, arreglos en filas o pequeños grupos, separados por fibras de colágeno en la dermis.	Celularidad moderada a alta, arregladas en grupos con estroma fibrovascular fino, en algunas zonas grueso y fibrocolagenoso con áreas de hialinización.	Alta celularidad. Arreglos de láminas muy compactas, estroma fibrovascular grueso y fibrocolagenoso con áreas de hialinización.
Figuras mitóticas	Ninguna	Raras (0 a 2 por campo de alta potencia)	Comunes (3 a 6 por campo de alta potencia)
Edema y necrosis	Mínimo	Edema difuso y necrosis	Edema, hemorragia y necrosis común

En el estudio en el que se propuso este sistema de clasificación, se analizaron 83 casos, de los cuales 30 (36%) fueron clasificados como grado I, 36 (44%) como grado II y 17 (20%) como grado III. Se les realizó un seguimiento a los perros estudiados durante 1500 días, de los clasificados como grado I, el 93% sobrevivió más de este tiempo, de aquellos clasificados como grado II, el 44% tuvo un tiempo de supervivencia mayor al de seguimiento y de los pacientes grado III, el 6% (1 perro) sobrevivió. La tasa de supervivencia de los perros clasificados como grado II fue cinco veces mayor que aquellos clasificados como grado III (Patnaik et al., 1984).

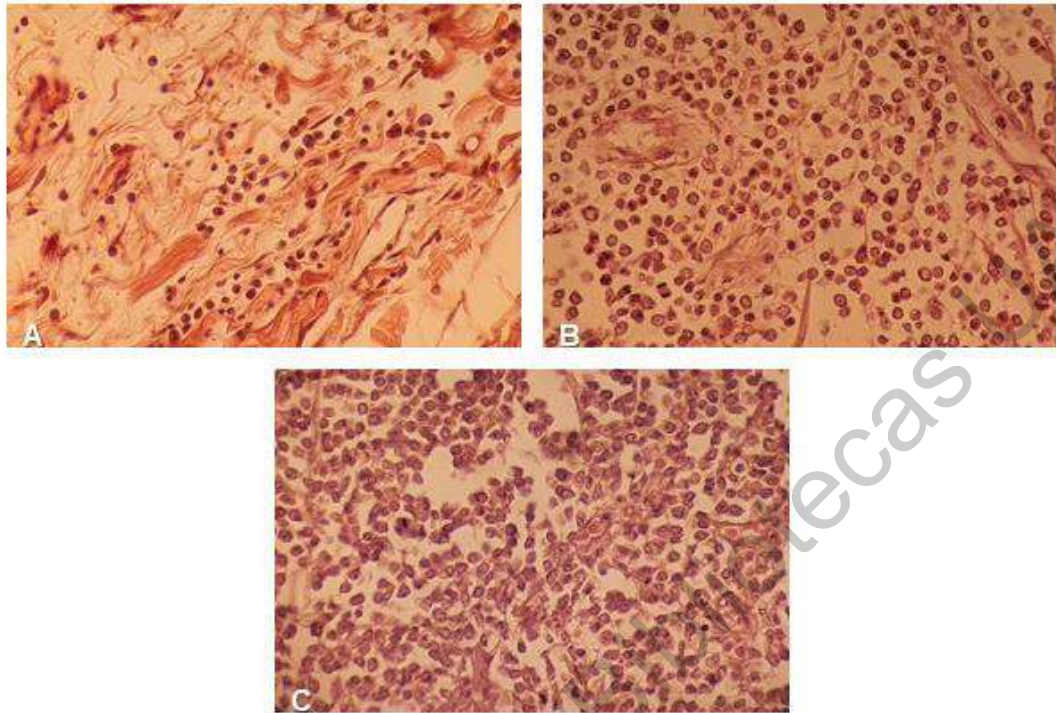


Figura 4. Grados histopatológicos por el esquema de Patnaik. A) Grado I o bien diferenciado. Células monomórficas arregladas en grupos o filas. B) Grado II o medianamente diferenciado. Celularidad y polimorfismo moderado, cromatina dispersa y mitosis raras. C) Grado III o poco diferenciado. Celularidad alta, pleomórficas con mitosis frecuentes. H&E, 40x.

2.3.3 Clasificación histológica según Kiupel

Este esquema fue propuesto por Kiupel et al. (2011) clasificando a los mastocitomas caninos cutáneos como de bajo y alto grado, dejando a los mastocitomas subcutáneos como una clasificación aparte. La propuesta de esta nueva clasificación fue debido a que el esquema de Patnaik provoca mucha variación de clasificación entre observadores, además de que el diagnóstico de tumores grado II representa un pronóstico poco certero, con casi 50% de probabilidad de tener un comportamiento benigno o agresivo.

Los mastocitomas cutáneos están localizados en la epidermis o la parte externa de la dermis, mientras que los subcutáneos se encuentran subyacentes a estas regiones, en tejido subcutáneo rodeado de tejido adiposo (Fig. 5 y 6). Los

mastocitomas por lo general no están encapsulados y pueden estar bien circunscritos o ser infiltrativos; la posición anatómica de éstos implica una evaluación y un pronóstico diferentes. La mayoría de estos tumores, sean cutáneos o subcutáneos, poseen patrones histológicos particulares que pueden reconocerse desde bajas magnificaciones como la formación de cintas y filas por las células neoplásicas, hay veces que los eosinófilos son muy abundantes y puede haber una gran cantidad de edema o hemorragia, así como colagenólisis, esclerosis, necrosis e inflamación linfocítica secundaria. Los mastocitos tienen forma redonda a poligonal y pueden estar aislados con bordes visibles o estar tan juntos que los bordes no se pueden apreciar, tienen un citoplasma moderado que se tiñe de rosa pálido y contiene gránulos que se tiñen de azul con H&E o de morado con tinciones metacromáticas (Kiupel, 2017).

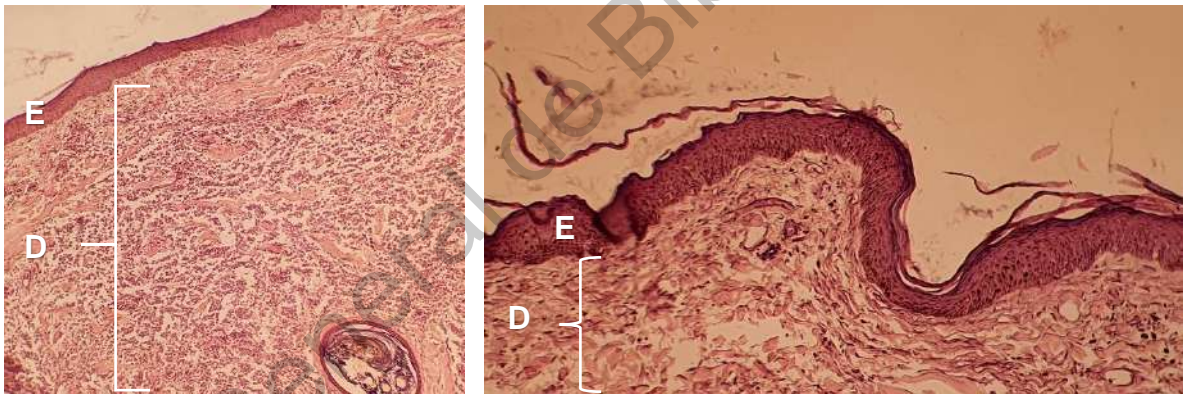


Figura 5. Mastocitomas cutáneos. Los mastocitos se encuentran en la dermis. (E= Epidermis, D= Dermis). H&E, 10x (izquierda), 40x (derecha).

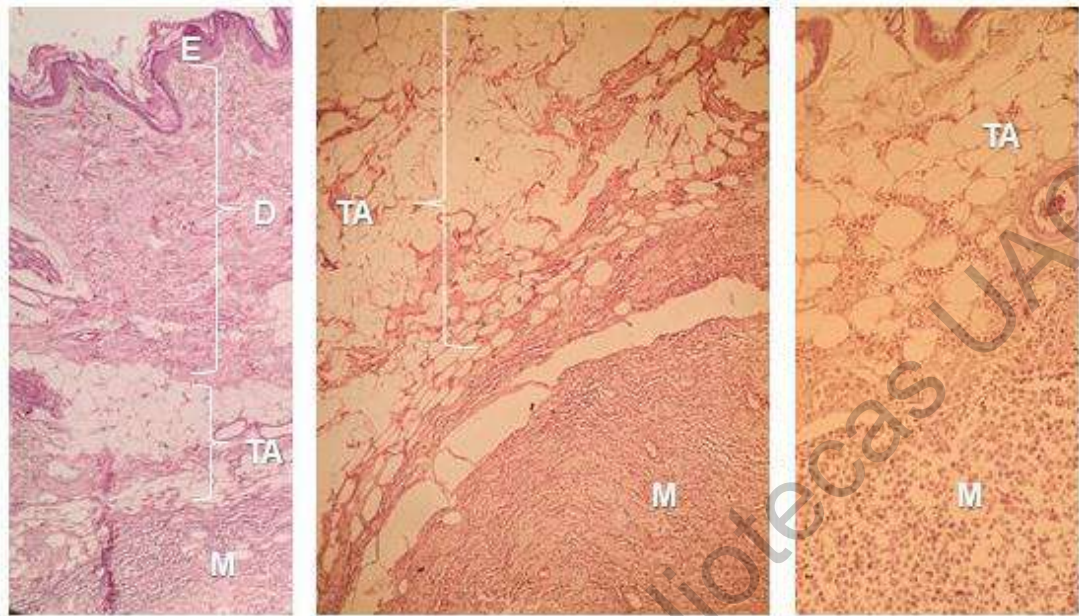


Figura 6. Mastocitomas subcutáneos. Los mastocitos se encuentran rodeados de tejido adiposo. (E= Epidermis, D= Dermis, TA= Tejido adiposo, M= Mastocitoma). H&E, 10x.

El diagnóstico de mastocitomas cutáneos de alto grado se basa en la presencia de cualquiera de los siguientes criterios, deben seleccionarse campos con la mayor actividad mitótica y con la mayor anisocariosis para establecer los parámetros (Fig. 6) (Kiupel et al., 2011):

1. Al menos siete figuras mitóticas en diez campos de alta potencia.
2. Al menos tres células multinucleadas (con tres o más núcleos) en diez campos de alta potencia.
3. Al menos tres núcleos bizarros en diez campos de alta potencia.
4. Cariomegalia (diámetros nucleares de al menos 10% del tamaño de la célula neoplásica que varían al menos por dos veces su tamaño).

Por su parte, el diagnóstico de los tumores de bajo grado se basa en la ausencia de todos los parámetros mencionados anteriormente. La mayoría de los tumores de bajo grado están bien circunscritos y sus márgenes son fáciles de identificar. Aproximadamente el 90% de los mastocitomas cutáneos son de este grado (Fig. 7) (Kiupel, 2017).

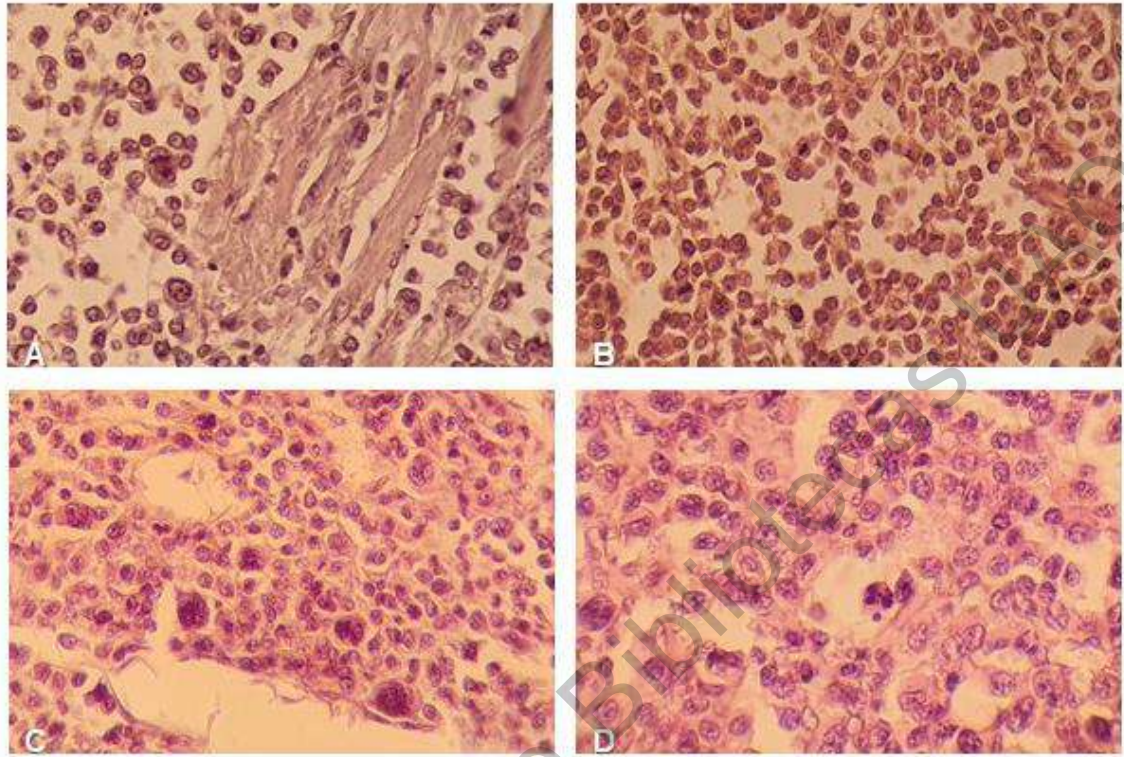


Figura 7. Mastocitomas de alto grado. A y B) Se observan numerosas células en mitosis y con cariomegalia. C) Se aprecian células multinucleadas y con núcleos bizarros D) Se observa cariomegalia y una célula con más de tres núcleos. Los mastocitomas de alto grado poseen al menos una de estas características. H&E, 40x.

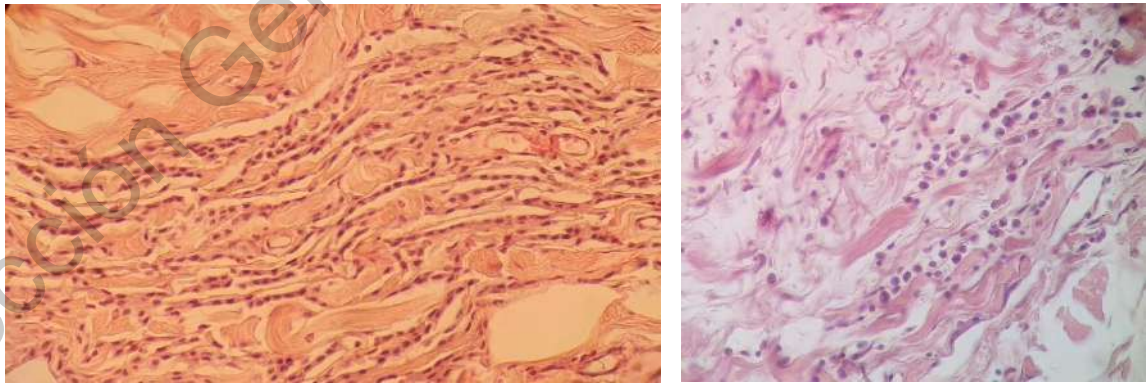


Figura 8. Mastocitomas de bajo grado. Mastocitos bien definidos, arreglados en cintas sin las características de alto grado. H&E, 40x.

En el estudio en el que se propuso este sistema, se estudiaron 95 casos de mastocitomas cutáneos, de los cuales 85 se categorizaron como bajo grado y 10 como alto grado. El tiempo medio de supervivencia en meses fue de 6.29 en tumores de alto grado y 24.26 en tumores de bajo grado. De los 10 tumores alto grado, 8 (80%) tuvieron metástasis con un tiempo medio de desarrollo del nuevo tumor de 6.3 semanas, mientras que de los 85 casos bajo grado, 14 (16.47%) tuvieron metástasis con un tiempo medio de 12.41 semanas. El 90% de los animales con tumores alto grado murieron debido a la neoplasia, mientras que sólo el 5% de aquellos con tumores de bajo grado tuvieron la misma causa de muerte (Kiupel et al., 2011).

Por su parte, los mastocitomas subcutáneos no se clasifican por grados, pero es muy importante diferenciarlos de los mastocitomas cutáneos. Aproximadamente el 90% de los mastocitomas subcutáneos son benignos y son controlados sólo con la escisión quirúrgica. Sin embargo, aproximadamente el 10% de los perros morirá debido a la neoplasia, el 11% desarrollará un segundo mastocitoma subcutáneo lejos del primario y el 5% tendrá metástasis. No hay criterios para identificar a este bajo porcentaje de malignidad, sin embargo, las siguientes características pueden sugerirlo (Kiupel, 2017):

1. Conteos mitóticos mayores a cuatro en diez campos de alta potencia.
2. Al menos una célula multinucleada en diez campos de alta potencia.
3. Crecimiento infiltrativo.
4. Ausencia de gránulos intracitoplásmicos.
5. Diagnóstico a mayor edad.
6. Marcadores moleculares: Ki67 mayor a 21.8, Índice Ki67 x AgNOR mayor a 55 y patrón difuso de KIT.

Thompson et al. (2011) analizaron sólo mastocitomas subcutáneos y encontraron que el tiempo de supervivencia con este tumor es de más de un año en el 93% de la población, más de dos años en el 92% y más de cinco años en el 86%, además sólo el 4% de los pacientes presentó metástasis y 8% recurrencia local,

aun cuando el 56% tenía márgenes quirúrgicos incompletos. Esto indica que la mayoría de los mastocitomas subcutáneos tienen un pronóstico favorable.

2.3.4 Uso complementario de ambas clasificaciones

Algunos estudios han aplicado ambos esquemas de clasificación a la misma población de perros (Vascellari et al., 2012; Sabattini et al., 2015; Stefanello et al., 2015), en ellos todos los tumores grado I de Patnaik fueron clasificados como bajo grado de Kiupel, así como todos los tumores grado III fueron de alto grado; sin embargo, los tumores grado II se dividen, siendo la mayoría clasificados como de bajo grado y una pequeña proporción como alto grado.

Ambos esquemas son capaces de dar un pronóstico en perros con mastocitomas cutáneos, pero se observó que el sistema de Patnaik es más sensible, mientras que el de Kiupel es más específico, siendo así su uso complementario. La clasificación de Kiupel puede redefinir el pronóstico de los tumores grado II, mientras que la de Patnaik puede clarificar el comportamiento de los tumores de alto grado (VCS, 2017; De Nardi et al., 2018).

La Veterinary Cancer Society (VCS) en 2017, propuso cuatro categorías para los mastocitomas cutáneos usando ambos sistemas de clasificación:

1. Grado I, Bajo Grado: Su pronóstico es excelente con prácticamente ninguna muerte asociada a la neoplasia. Se ha reportado un riesgo de metástasis a nódulos linfáticos del 6% y de metástasis a distancia del 2% (Stefanello et al., 2015).
2. Grado II, Bajo Grado: Su pronóstico es bueno con el 6% de muertes relacionadas a la neoplasia. En la etapa inicial, el riesgo de metástasis a nódulos linfáticos es de 16% y de metástasis a distancia del 2% (Sabattini et al., 2015; Stefanello et al., 2015). La diferencia en la supervivencia de esta categoría y la anterior, se debe a recurrencias locales más que a metástasis (VCS OPWG, 2017).
3. Grado II, Alto Grado: El pronóstico es reservado, con el 50% de muertes relacionadas a la neoplasia. En la etapa inicial, el riesgo de metástasis a nódulos

linfáticos es de 15% y de metástasis a distancia del 2% (Sabattini et al., 2015; Stefanello et al., 2015).

4. Grado III, Alto Grado: Su pronóstico es de reservado a malo con el 67-75% de muertes relacionadas a la neoplasia. En la etapa inicial, el riesgo de metástasis a nódulos linfáticos es de 46-49% y de metástasis a distancia del 21% (Murphy et al., 2004; Krick et al., 2009; Sabattini et al., 2015; Stefanello et al., 2015).

2.4 Pronóstico

Debido al comportamiento biológico tan variable de los mastocitomas, el llegar a un pronóstico es de gran importancia para la toma de decisiones correcta tanto de parte del clínico como del propietario del paciente. El pronóstico se basa en la clasificación histopatológica, mencionada en el capítulo anterior, la estadificación, la evaluación de los márgenes y el uso de herramientas complementarias como los marcadores de proliferación celular (Kiupel, 2017).

2.4.1 Estadificación

La estadificación es considerada la herramienta más importante para el pronóstico y tratamiento de los mastocitomas y existen varios sistemas para diferenciar las etapas, la WHO (World Health Organization) en 1980 propuso el siguiente sistema:

- Etapa 1, tumores solitarios en dermis sin afección a nódulos linfáticos.
- Etapa 2, tumores en dermis con nódulos linfáticos afectados.
- Etapa 3, tumores múltiples en la dermis o tumores grandes infiltrativos con o sin afección a nódulos linfáticos.
- Etapa 4, metástasis distantes.

Sin embargo, se han realizado estudios en los que se ha observado un peor pronóstico en pacientes en etapa 2 a comparación de aquellos en etapa 3, por lo que la Sociedad Europea de Oncólogos Veterinarios y la Sociedad Veterinaria de Cáncer recomiendan cambiar los criterios entre las etapas 2 y 3 (Kiupel, 2017).

Otro sistema fue propuesto en la Conferencia Veterinaria del Sur de Europa en Barcelona en 2008 y ha sido adoptado como el ideal por el Colegio Brasileño de Cirugía y Anestesiología Veterinaria. Este sistema se describe en el Cuadro 2 y se deben agregar los sufijos “a”, si el paciente no presenta manifestaciones sistémicas y “b”, si si las presenta (De Nardi et al., 2018).

Cuadro 2. Criterios para estadificación en mastocitomas caninos (De Nardi et al., 2018)

Etapa	Tumor	Nódulos linfáticos regionales	Metástasis
I	Una masa menor a 3 cm bien circunscrita	-	-
II	Una o más masas menores a 3 cm bien circunscritas con una distancia entre las lesiones mayor a 10 cm	-	-
III	Una o más masas mayores a 3 cm poco circunscritas o ulceradas con una distancia entre lesiones menor a 10 cm	-	-
IV	Cualquier tipo de lesión	+	-
V	Cualquier tipo de lesión	- / +	+

Los mastocitomas por lo general hacen metástasis a los nódulos linfáticos cercanos, a hígado, bazo y médula ósea. Muchos tumores no suelen hacer metástasis por lo que no es necesario hacer la evaluación completa en todos los pacientes, sin embargo, si deben incluirse punciones con aguja delgada de los nódulos linfáticos a los que drena la zona donde se presenta el tumor y un ultrasonido abdominal (Blackwood et al., 2012).

La evaluación del estadio de la enfermedad se inicia revisando el nódulo linfático regional más cercano mediante palpación y citología, antes de remover quirúrgicamente el mastocitoma cutáneo. Si se sospecha de metástasis, debe removerse quirúrgicamente, al mismo tiempo que el tumor cutáneo y, de ambos hacerse la histopatología. Cuando se confirma la metástasis del nódulo, se tiene un

paciente con un tumor de alto grado o se tiene planeado realizar un tratamiento completo, debe hacerse la evaluación completa (Kiupel, 2017).

Para los clínicos el hacer una evaluación completa del estadio de la enfermedad significa tomar radiografías torácicas, hacer ultrasonido abdominal y punciones de hígado, bazo y médula ósea. Sin embargo, un estudio demostró que las radiografías torácicas y la punción de médula ósea no son realmente importantes para la estadificación de los mastocitomas; mientras que la clave es determinar si hay o no metástasis a nódulos linfáticos, ya que en ninguno de los pacientes los tumores presentaron metástasis distantes sin haberse esparcido primero al nódulo linfático. Esto reafirma la importancia de establecer en medicina veterinaria el concepto de Nódulo Linfático Centinela (SLN), usado en oncología humana, que provee información vital para el pronóstico y el tratamiento del cáncer. Sin embargo, en medicina veterinaria no se conocen los nódulos linfáticos exactos a los que drenan muchos sitios anatómicos en las diferentes especies, por lo que no ha podido hacerse la identificación de ningún SNL a excepción de en la glándula mamaria (Warland et al., 2012).

Para realizar el diagnóstico de la metástasis a nódulos linfáticos mediante citología, Krick et al. (2009) desarrollaron un sistema reproducible y que mostró ser un apoyo para establecer el pronóstico de los pacientes, descrito en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Criterios citológicos para la determinación de la metástasis de mastocitomas caninos a nódulos linfáticos regionales (Krick et al., 2009)

Interpretación	Descripción
Normal	No se observan mastocitos
Hiperplasia linfoide reactiva	Linfocitos pequeños que representan más del 50% de la población, con una mezcla de prolinfocitos, linfoblastos, células plasmáticas y pocos a moderados macrófagos, neutrófilos y eosinófilos, así como raros mastocitos individuales.
Metástasis posible	En al menos una laminilla, de dos a tres agregados de mastocitos de dos a tres células cada uno.

Metástasis probable	En al menos una laminilla, más de tres focos de mastocitos en agregados de dos o tres células o de dos a cinco agregados de más de tres células.
Metástasis segura	En al menos una laminilla, borramiento del tejido linfoide por mastocitos y/o presencia de agregados de mastocitos poco diferenciados con pleomorfismo, anisocitosis, anisocariosis y granulación disminuida o variable, y/o más de cinco agregados de más de tres células.

Posteriormente, Weishaar et al. (2014) desarrollaron un sistema para la evaluación histopatológica de los nódulos linfáticos que obtuvo correlación con el pronóstico de los pacientes evaluados y que promete facilitar la interpretación de la metástasis en estos órganos. Este sistema se describe en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Sistema de clasificación histopatológica para la evaluación de metástasis a nódulos linfáticos en mastocitomas caninos (Weishaar et al., 2014)

Clasificación	Criterio Histopatológico	Interpretación
HN0	De 0 a 3 mastocitos individuales dispersos en los senos (subcapsular, paracortical o medular) y/o en el parénquima por campo de alta potencia. O que no pertenezca a ninguna de las clasificaciones siguientes.	No metastásico
HN1	Más de 3 mastocitos individuales en los senos y/o en el parénquima en al menos cuatro campos de alta potencia.	Pre metastásico
HN2	Agregados de mastocitos con 3 o más células en senos y/o parénquima, o formación de hojas de mastocitos en los sinusoides.	Metástasis temprana
HN3	Borramiento de la estructura normal por focos, nódulos, hojas o masas compuestas de mastocitos.	Metástasis evidente

Kiupel (2017) menciona que si los nódulos están libres de posible metástasis no se recomienda removerlos. Por su parte, Ferrari et al. (2018) retiraron quirúrgicamente nódulos linfáticos de tamaño normal o no palpables junto con el tumor cutáneo, y sus resultados mostraron que, a pesar de que los nódulos no presentaban cambios, el 15% de los casos se clasificaron como HN1, el 28% como

HN2 y el 21.5% como HN3. Por lo que recomiendan siempre extirpar el nódulo linfático regional para poder realizar una correcta estadificación de la enfermedad.

En general la estadificación está influenciada por la experiencia de los clínicos, la tecnología utilizada y las decisiones hechas por el dueño del paciente (Kiupel, 2017)

2.4.2 Evaluación de márgenes

El lograr realizar un correcto análisis de los márgenes de cualquier tumor que haya sido extraído completamente es trabajo tanto del cirujano como del patólogo, por lo que debe haber comunicación entre ambos. Al momento de extraer la masa tumoral, el cirujano debe marcar los márgenes en los que tiene interés con tinta quirúrgica de color negro, amarillo o verde, ya que contrastan al momento de teñir con H&E. También es importante que el cirujano notifique al patólogo si retiró tejido adiposo o conectivo y que el mismo cirujano mida los márgenes del tumor, ya que el tejido se puede encoger hasta un 40% después de ser extraído, fijado e incluido en parafina. En general los márgenes reportados por el patólogo son una estimación, por lo que deben usarse otros métodos que complementen el pronóstico (Stromberg et al., 2017).

Se utilizan dos tipos de cortes para revisar los márgenes, en perpendicular y en paralelo. En la primera, también llamada radial, el tejido se corta de forma perpendicular al plano de la cirugía, es la forma más común y su ventaja es que se puede observar y medir la relación entre el tumor y el margen, mientras que su desventaja es que la porción del margen que se puede analizar es muy pequeña, por lo que la probabilidad de dar un falso negativo es alta. En la forma paralela o tangente, el tejido se corta paralelo al plano de la cirugía, su ventaja es que la porción del margen que se evalúa es mucho mayor que en el corte perpendicular, por lo que cualquier célula tumoral en el margen indican una escisión incompleta, sin embargo, la relación entre el tumor y el margen no se puede medir. En medicina veterinaria, la evaluación de los márgenes ha tenido importancia en las neoplasias de piel, con la idea de predecir la recurrencia local del tumor. Sin embargo, no se

han establecido valores de márgenes de seguridad histológicos (HSM) para ningún tumor. El HSM es el término usado en medicina humana que se refiere a la distancia microscópica que previene la recurrencia local, por lo que en veterinaria se reportan los márgenes histológicos libres de tumor (HTFM). Se sugiere reportar el HTFM en rango, ya que hacerlo de forma precisa significaría que se evaluaron todos los márgenes, además que en los tejidos incluidos en parafina no es real debido al encogimiento de los tejidos antes mencionado. Se reporta la distancia más corta observada y los rangos son (Stromberg et al., 2017):

- M1 = Márgenes infiltrados. Puede ser focal (si se observan focos de células tumorales) o difuso (si hay una gran cantidad de estas).
- M2 = Margen cercano, menor a 2 mm.
- M3 = Margen limpio, 2 a 5 mm.
- M4 = Margen limpio, más de 5 mm.

Las neoplasias de células redondas crecen en forma de esfera, con agregados de densidad variable de células no conectadas que pueden producir una masa irregular y asimétrica. Este patrón de crecimiento es muy frecuente en mastocitomas, ya que muchos son infiltrativos, lo que provoca que en algunas secciones parezca que el tumor fue completamente extraído, mientras que en otras esté incompleto (Fig. 8) (Stromberg et al., 2017). Debido a esto, en los mastocitomas es menos exacto realizar el análisis de los márgenes si los comparamos con otras neoplasias. Un estudio comparó la predicción de recurrencia en carcinomas, sarcomas de tejido blando y mastocitomas mediante la evaluación de los márgenes, donde la exactitud de la predicción fue de 94% para carcinomas, 87% para sarcomas y 76% para mastocitomas (Scarpa et al., 2012).

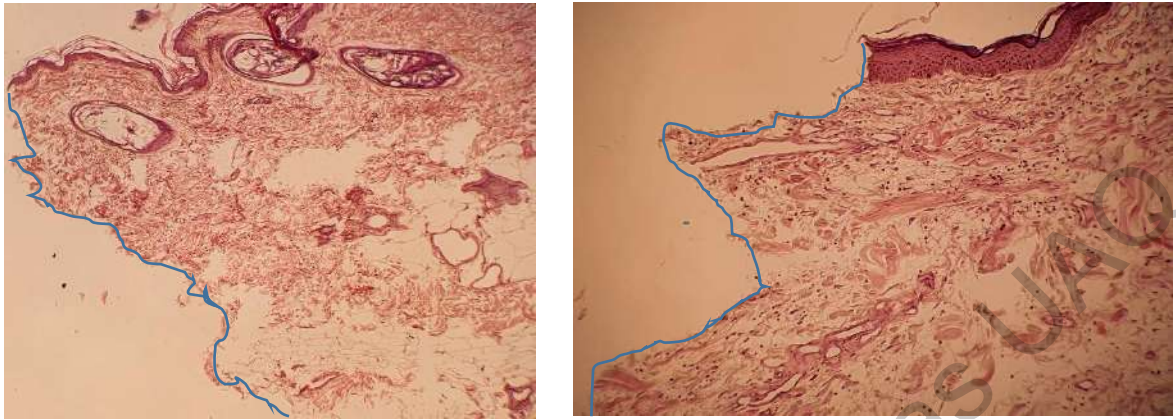


Figura 9. Margen limpio (izquierda) y margen infiltrado (derecha) en mastocitomas cutáneos. Márgenes marcados en azul. H&E, 10x.

Además, puede ser difícil reconocer si las células en los márgenes son neoplásicas o no, ya que en la mayoría de los mastocitomas cutáneos se observa un halo compuesto por líquido, células del estroma y células inflamatorias, entre las que podemos encontrar células redondas como linfocitos, macrófagos y mastocitos. Actualmente es imposible diferenciar mastocitos neoplásicos de no neoplásicos, ya que no se ha encontrado un marcador confiable para reconocerlos. Sin embargo, se asume que si los mastocitos de los márgenes son solitarios y están bien diferenciados son inflamatorios, mientras que aquellos en cúmulos son neoplásicos (Kiupel, 2017).

En el estudio realizado por Schultheiss et al. (2011) se revisaron los márgenes de más de 100 mastocitomas con la finalidad de encontrar relación entre el tamaño de los márgenes y la recurrencia local. Los tumores grado I y II con márgenes laterales mayores o iguales a 10 mm y márgenes de profundidad mayores o iguales a 4 mm no presentaron recurrencia, por lo que sugieren no es necesario extraer quirúrgicamente con márgenes amplios de 2 cm de cada lado a los mastocitomas grados I y II, lo cual puede ser contraproducente para muchos pacientes.

Posteriormente en el estudio realizado por Donnelly et al. (2013), se buscó relación entre el riesgo de recurrencia local y los HTFM de mastocitomas y se intentó

encontrar el HSM. Sin embargo, no encontraron asociación entre los márgenes y la recurrencia local y se corroboró que el grado del tumor según el sistema de Kiupel es una mejor herramienta de pronóstico que la evaluación de los márgenes, ya que los tumores de alto grado tienen un alto riesgo de recurrencia, sin importar el ancho de los márgenes libres de tumor. Los tumores de bajo grado presentaron un 4% de recurrencia, mientras que los de alto grado un 36%. Debido a esto no se pudo establecer un HSM.

Otro de los problemas en mastocitomas es que no se ha estandarizado un método de evaluación de márgenes, lo cual es necesario para tener una mayor precisión en los estudios que se realizan y poder homogeneizar los resultados. En un estudio se compararon los resultados obtenidos de cortes en forma radial de mastocitomas de bajo grado con los obtenidos de las mismas muestras pero con cortes tangentes y se observó que los cortes tangentes detectan una mayor proporción de márgenes positivos a comparación de los radiales. Se concluyó también que un solo corte radial puede describir engañosamente un margen si el HTFM es menor o igual a 10.9 mm. Si es mayor a esto, puede no ser necesario realizar el corte tangente, sin embargo la revisión de los márgenes es importante para la toma de decisiones del manejo del paciente (Dores et al., 2018).

Así mismo, Kiupel (2017) sugiere evaluar los márgenes usando una combinación de márgenes tangentes completos para revisar la limpieza del margen y medir la distancia mediante una sección radial. Esto con la idea de proveer información certera y con consistencia para próximos estudios.

2.4.3 Marcadores de proliferación celular y KIT

La clasificación histopatológica necesita la suplementación de estudios moleculares para identificar la malignidad de los tumores y precisar el pronóstico, así como para ayudar en la selección del mejor plan de tratamiento para cada paciente (Sledge et al., 2016). Los marcadores de proliferación celular han mostrado una relación importante con metástasis y tiempos de supervivencia de los pacientes. Los más importantes son el conteo mitótico (CM), Ki67 y AgNOR. El uso de estos

representa la mejor opción para conocer el comportamiento biológico de los mastocitomas cutáneos y subcutáneos y ha sido validado en diferentes artículos (Sledge et al., 2016; Kiupel, 2017).

Estos marcadores se pueden clasificar en tres categorías: marcadores de fracción de crecimiento (Ki67), marcadores de tasa de proliferación (AgNORs) y marcadores de índice de fase (CM). Ninguno de estos marcadores por si solos puede determinar la proliferación celular exactamente, por lo que se recomienda evaluarlos juntos (Kiupel, 2017).

El conteo mitótico es el más usado debido a que se puede realizar con la histopatología. Este marcador sólo refleja a las células que están en mitosis (Fig. 10) y no puede distinguir células en otras fases del ciclo celular, sin embargo, se ha demostrado su significancia en cuanto a pronóstico en mastocitomas, ya que está correlacionado inversamente con supervivencia, riesgo de metástasis y de recurrencia local (Krick et al., 2017). Se realizó un ensayo en el cual se determinó la importancia de su uso como predictor para la supervivencia en perros con mastocitomas cutáneos, y se llegó a un valor de corte de 5. Aquellos pacientes con tumores con un índice mitótico (IM) de 5 o menos, tuvieron un tiempo de vida medio de 70 meses, mientras que el de aquellos con un IM mayor a 5 fue de 2 meses, sin importar el grado del tumor (Romansik et al., 2007). Posteriormente se encontró la misma relación del IM con la supervivencia de los pacientes en mastocitomas subcutáneos, pero con un valor de corte de 4 (Thompson et al., 2011). La variabilidad en los valores de corte que se han encontrado en diferentes estudios es una limitante para el uso de estos, ya que no se ha determinado cual es el valor más predictivo (Kiupel, 2017).

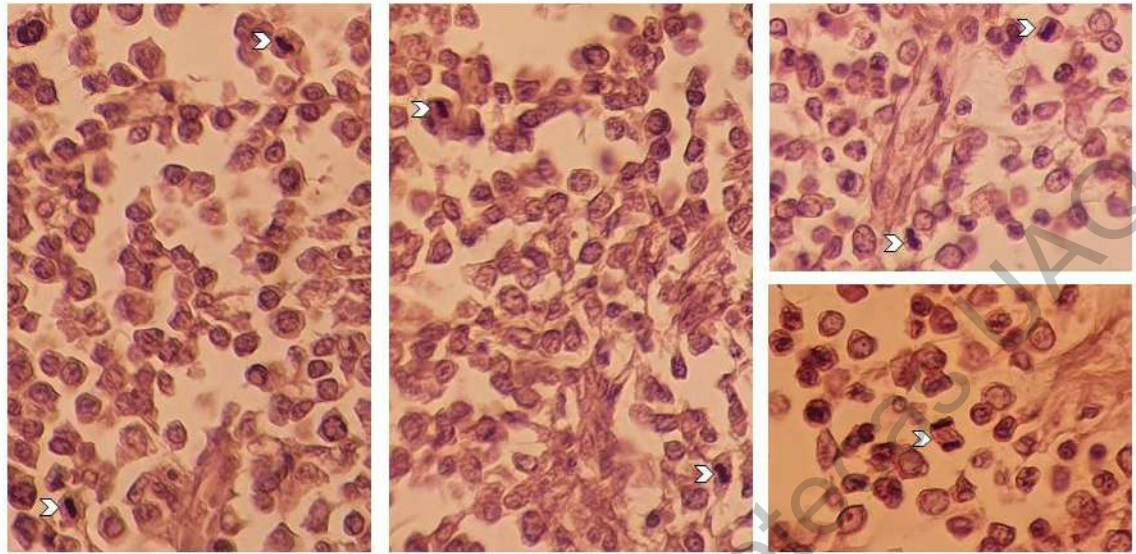


Figura 10. Mastocitos en mitosis (señalados con puntas de flecha blancas). H&E, 40x.

Ki67 es una proteína que está presente en todas las fases activas del ciclo celular y ausente en todas las que se encuentran en descanso (G_0) por lo que este marcador, identificado mediante inmunohistoquímica, indica todas las células que se están dividiendo (Krick et al., 2017). En un estudio se comparó el índice de Ki67 en mastocitomas cutáneos clasificados por ambos esquemas, y se encontró que la presencia de este marcador es significativamente más alta en tumores de mayor grado de malignidad, así como que los conteos altos de Ki67 están significativamente asociados al incremento de la incidencia de la mortalidad relacionada con el tumor. El valor de corte que determinaron fue de 10.6, la probabilidad de muerte de los pacientes con mastocitomas cutáneos con un índice de Ki67 mayor o igual a 10.6 fue 8 veces mayor que en los pacientes con un índice menor a este (Vascellari et al., 2012). En cuanto a los mastocitomas subcutáneos, un estudio encontró que los pacientes con conteos mayores a 21.8 de este marcador tuvieron una mayor probabilidad de presentar recurrencias locales y metástasis que aquellos con conteos menores (Thompson et al., 2011).

Los regiones organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNORs) son proteínas que se tiñen de plata unidas a bucles de DNA ribosomal (rDNA) que forman el

nucléolo. Estos arreglos de bucles de rDNA se conocen como NORs, regiones organizadoras nucleolares, y están relacionados directamente con la actividad proliferativa de la célula debido a la transcripción de RNA ribosomal necesaria para el ensamble de los ribosomas. La descondensación de este rDNA durante alta actividad transcripcional provoca una segregación de las proteínas asociadas, lo que se observa microscópicamente como un aumento en el número y en el área de las regiones intranucleares o intranucleolares teñidas de plata (AgNORs) (Fig. 11) (Löhr et al., 1997). Esta tinción refleja el ritmo de progreso de las células en el ciclo celular. Un estudio encontró que el conteo AgNOR es un indicador de pronóstico certero ya que el 73% de los perros con un conteo mayor a 4.9 y el 33% de los pacientes con un conteo entre 1.7 y 4.8 murieron debido al mastocitoma, mientras que ninguno de los pacientes con un conteo menor a 1.7 murieron en el tiempo que duró el seguimiento de este estudio (Bostock et al., 1989). Otro estudio encontró un punto de corte de 2.25 AgNORs por célula. Los pacientes con un conteo superior a este tuvieron mayor probabilidad de presentar metástasis y un menor tiempo de vida (Simoes et al., 1994). En cuanto a mastocitomas subcutáneos, se encontró que, aquellos con un conteo AgNOR mayor a 2.71 tuvieron una tasa de recurrencia local más alta que aquellos con un conteo igual o menor a 2.71 (Thompson et al., 2011).

Se ha validado en diferentes estudios el uso combinado de AgNOR y Ki67. Al multiplicar los dos conteos, el producto es llamado Ag67 y resulta en una mejor predicción del comportamiento biológico de los mastocitomas cutáneos y subcutáneos (Kiupel, 2017; Krick et al., 2017). En un estudio se encontró que en mastocitomas cutáneos, un índice alto de Ag67 se relaciona con un incremento en la incidencia y velocidad de recurrencia en el mismo lugar, así como un aumento en la velocidad de recurrencia en lugares distantes y en la incidencia y velocidad de mortalidad relacionada al mastocitoma, además se llegó a un valor de corte de 54 (Webster et al., 2007). En cuanto a mastocitomas subcutáneos, se observó que aquellos con índices Ag67 mayores a 55 presentaron una mayor probabilidad de

presentar recurrencia local y metástasis que aquellos con conteos menores (Thompson et al., 2011).

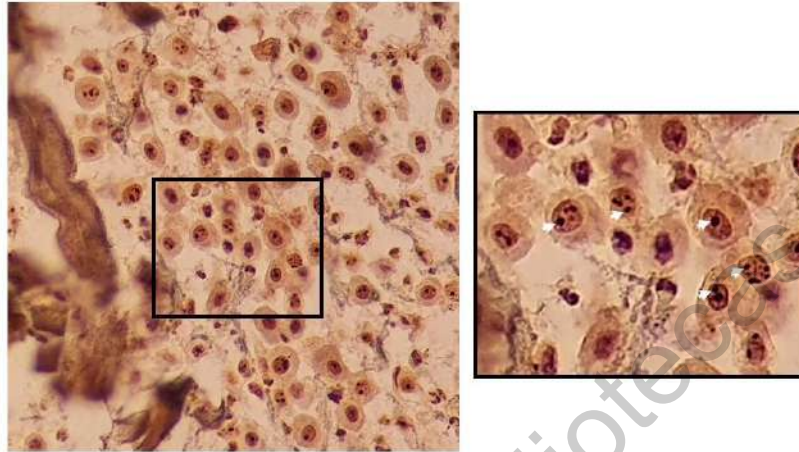


Figura 11. Tinción AgNOR de un mastocitoma cutáneo grado I/bajo grado. En la ampliación 200% (cuadro derecho) se observan dentro del núcleo de los mastocitos zonas redondas de color negro que representan las regiones organizadoras nucleolares argirofílicas (señalados con flechas blancas). 40x.

Otro marcador importante para pronóstico de mastocitomas caninos, aparte de los de proliferación celular, es KIT, el receptor de tirosina quinasa codificado por el gen *c-kit*, involucrado en la supervivencia, proliferación y migración de mastocitos. Se ha descubierto que las mutaciones en este son parte de la oncogénesis de aproximadamente 20 a 30% de los mastocitomas cutáneos caninos. La expresión aberrante de la proteína KIT observada mediante inmunohistoquímica, así como las mutaciones del gen *c-kit* analizadas mediante PCR, están involucradas con un peor pronóstico para los pacientes. La terapia con inhibidores de tirosina quinasa es más efectiva en este tipo de tumores que el uso de vinblastina/prednisolona (Kiupel, 2017). Se ha correlacionado la presencia de mutaciones en el exón 11 del gen *c-kit* con incrementos en el riesgo de muerte por mastocitoma y en el riesgo de recurrencias locales y sistémicas (Webster et al., 2006). La expresión de esta proteína puede darse en tres patrones diferentes: asociada a membrana, citoplásmica focal y citoplásmica difusa; la expresión de KIT en el citoplasma se

correlaciona con grados histopatológicos más altos, tiempo de supervivencia reducido, mayor probabilidad de recurrencias y una proliferación celular aumentada evaluada con los marcadores Ki67 y AgNOR (Kiupel et al., 2004; Gil da Costa et al., 2007).

Debido a lo planteado anteriormente, este trabajo busca encontrar relación entre características clínicas del paciente y el tumor con la clasificación histopatológica por los esquemas de Patnaik y Kiupel, además de evaluar el conteo mitótico con el fin de conocer el comportamiento y la epidemiología de este tipo de tumores en pacientes caninos en Querétaro.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

III. JUSTIFICACIÓN

Las publicaciones a nivel mundial sitúan al mastocitoma como una de las neoplasias más comunes en piel en perros. Este tipo de cáncer tiene un comportamiento biológico altamente variable, llegando a producir metástasis, por lo que ha sido de suma importancia buscar herramientas que ayuden a establecer pronósticos y tratamientos certeros. Los esquemas de clasificación histopatológica de Patnaik y Kiupel son la base de esto, complementándose con la estadificación, la evaluación de márgenes y los marcadores de proliferación celular.

En México es mínima la información epidemiológica que se tiene sobre este tipo de cáncer y no se ha realizado ningún estudio en donde se relacionen características clínicas y patológicas.

Este trabajo busca encontrar relación entre la clasificación histopatológica por ambos esquemas y las características tanto del tumor como del paciente, así como, relacionar la histopatología con el conteo mitótico para proporcionar información epidemiológica que contribuya a investigaciones futuras.

IV. HIPÓTESIS

Los mastocitomas clasificados como grado III por Patnaik y alto grado por Kiupel tienen un conteo mitótico elevado, mayor a 5 y tienen una probabilidad de recurrencia mayor comparados con los grados restantes.

V. OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar el grado histopatológico y el conteo mitótico de los mastocitomas caninos, asociándolos con características de los individuos y los tumores.

5.2 Específicos

- Establecer los grados histopatológicos de los mastocitomas caninos mediante los esquemas de Patnaik y Kiupel.
- Evaluar el conteo mitótico de cada muestra.
- Asociar las características de los perros (sexo, edad y raza) y de los tumores (localización, tamaño, cantidad y aspecto) con la clasificación histopatológica.
- Correlacionar los resultados histopatológicos con los resultados del conteo mitótico.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Obtención de muestras

Se utilizaron 37 muestras de mastocitomas caninos remitidas al laboratorio de Histopatología de la Universidad Autónoma de Querétaro y al laboratorio privado PATVET de la misma ciudad, durante el periodo Mayo 2018 a Mayo 2019, que fueron extraídas quirúrgicamente y fijadas en formol al 10%. De todos los casos se solicitó información a los clínicos que remitieron la muestra con la finalidad de conocer datos del paciente (género, edad y raza), así como referencias sobre localización, tamaño, cantidad y aspecto del tumor, para encontrar relación entre éstas y los resultados obtenidos de la histopatología. Se hizo un seguimiento de 30 de los pacientes hasta Diciembre 2019 para obtener información de probables recurrencias.

6.2 Inclusión en parafina y corte

Para incluir el tejido en parafina, primero se realizó un corte del área de interés de aproximadamente 0.5 a 1 cm de tamaño, se colocó dentro de un cassette para inclusión identificado con lápiz. Este cassette se introdujo al Histoquinette, el cual realizó automáticamente la deshidratación, aclaramiento y parafinización del tejido. Dicho proceso tuvo una duración de 12 horas. Posteriormente se llevó a cabo la inclusión del tejido en bloques de parafina (fusión de parafina a 56°C) y se hicieron dos cortes finos de 5 micras de grosor con un micrótopo marca Leica. Para mantener la adherencia del tejido a la laminilla, se sometió el corte a una solución caliente de grenetina (45°C). Posteriormente se depositó sobre el portaobjeto.

6.3 Tinción con Hematoxilina y Eosina

Los cortes fueron teñidos con hematoxilina y eosina, para esto, las laminillas se desparafinaron y rehidrataron mediante 10 pases de xilol dos veces, 10 pases en cada solución con etanol absoluto, etanol al 96%, etanol al 80%, etanol al 70%, etanol al 50%, y agua. Posteriormente se introdujeron al colorante hematoxilina durante 8 minutos y se lavaron con 10 pases de agua, 1 pase rápido de etanol ácido,

10 pases de agua, 8 pases de agua amoniacal y 10 pases de agua. Después se pasaron por el colorante eosina 8 veces y se deshidrataron mediante 10 pases de etanol al 96% dos veces, 10 pases de etanol-xilol, y 5 minutos en xilol. Las laminillas fueron montadas con resina Entellan.

6.4 Histopatología y conteo mitótico

Las preparaciones fueron observadas en un microscopio óptico marca Leica con el fin de realizar la clasificación histopatológica mediante el esquema de tres niveles de Patnaik y el esquema de dos niveles de Kiupel, según lo descrito por ambos autores, previamente explicado en el apartado de antecedentes.

El conteo mitótico se realizó en las mismas laminillas, registrado como el número de figuras mitóticas en un área estándar de 2.37 mm². Para esto se contaron las mitosis presentes en 15 campos observados con el objetivo 40x con un número de campo 18 del mismo microscopio.

6.5 Estudios estadísticos

Se utilizó la prueba de Chi cuadrada para analizar la relación entre las características del tumor y el paciente y los resultados de la histopatología. Posteriormente se realizó la prueba de coeficiente de correlación de Spearman para analizar la asociación entre la histopatología y el conteo mitótico. Para ambas pruebas se utilizó el software IBM SPSS Statistics versión 23.

6.6 Desecho de residuos

El desecho de las masas tumorales se realizó en bolsas de polietileno amarillas, ya que se consideran residuos peligrosos biológico-infecciosos de tipo patológico, de acuerdo a lo establecido en la norma NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002; mientras que el formol se desechó en frascos especiales de vidrio color ámbar debidamente marcados por considerarse residuos peligrosos según las normas NOM-052-SEMARNAT-2005 y NMX-R-019-SCFI-2011. Todos los desechos fueron procesados por la empresa que se dedica a recolectar los RP y RPBI en la Facultad de Ciencias Naturales.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Descripción de la población

Se analizaron 37 muestras obtenidas de 36 perros domésticos ya que dos muestras se derivaron del mismo paciente, una de un tumor primario y otra de su recurrencia. La población se compuso de 18 hembras y 18 machos con una edad promedio de 8.27 años y un rango de edad de 2 a 14 años, el grupo de edad más frecuente fue de 6 a 9 años. Los individuos pertenecieron a 16 razas puras y mestizos, siendo las razas más frecuentes Bóxer (25%), Pug (13.9%) y mestizos (11%). Los datos completos se aprecian en el cuadro 5.

Cuadro 5. Frecuencias de las características de los pacientes

Característica	Número de casos	Porcentaje
Sexo		
Hembras	18	50%
Machos	18	50%
Edad (Años)		
2 - 5	6	16.7%
6 - 9	18	50%
10 - 13	10	27.8%
14 en adelante	2	5.5%
Raza		
Bóxer	9	25%
Pug	5	13.9%
Mestizo	4	11%
Labrador Retriever	3	8.3%
Poodle	2	5.5%
Schnauzer	2	5.5%
Basset Hound	1	2.8%
Beagle	1	2.8%
Bull Terrier	1	2.8%
Bulldog francés	1	2.8%
Bullmastiff	1	2.8%
Chihuahueño	1	2.8%
Golden Retriever	1	2.8%
Husky Siberiano	1	2.8%
Pitbull Terrier	1	2.8%
Shih Tzu	1	2.8%
Yorkshire Terrier	1	2.8%

La frecuencia alta de presentación de mastocitomas en la raza Bóxer, Pug y mestizos coinciden con literatura a nivel mundial (Mochizuki et al., 2016; Kiupel, 2017; Smiech et al., 2017). En el estudio realizado en México por Ruiz Castillo et al. (2019), la raza con mayor frecuencia también fue el Bóxer. La edad también es similar a la observada en los estudios mencionados anteriormente, tanto a nivel mundial (8 a 9 años) como nacional (7.4 años). En el estudio realizado por Shoop et al. (2015), las razas Boxer, Pug y Staffordshire Bull Terrier mostraron una mayor probabilidad de presentar mastocitomas que los mestizos, mientras que las razas Pastor Alemán, Border Collie, West Highland White Terrier, Springer Spaniel y Cocker Spaniel tienen menor probabilidad de presentar esta neoplasia a comparación de los mestizos.

En cuanto a las características de las masas, se localizaron en 9 regiones diferentes, las más frecuentes fueron los miembros locomotores (43.3%), el tronco (16.2%) y el escroto (10.8%). En cuanto a tamaño se obtuvieron 51.4% masas menores a 3 cm y 48.6% mayores a esta medida; el 29.7% de las muestras estudiadas tuvieron una presentación múltiple (dos o más masas simultáneas), mientras que el 27% presentaron ulceraciones. Los datos completos se encuentran en el cuadro 6.

La localización de los mastocitomas a nivel mundial es ligeramente más frecuente en tronco (37-38%) que en miembros locomotores (32-38%) (Shaw et al., 2017; Smiech et al., 2017). En el presente estudio la ubicación más frecuente fueron los miembros locomotores con un 43.3%, seguidos del tronco con un 16.2%. Estos resultados son similares a los obtenidos en el estudio realizado en Toluca, México, que reportó 40.3% en extremidades y 30.7% en tronco (Ruiz Castillo et al., 2019). El 29.7% de los tumores fueron múltiples, lo que coincide con la probabilidad de esta presentación del 10 al 30% descrita por Shaw et al. (2017).

Cuadro 6. Frecuencias de las características de los tumores

Característica	Número de casos	Porcentaje
Localización anatómica		
Miembros locomotores	16	43.3%
Tronco	6	16.2%
Escroto	4	10.8%
Pezón	3	8.1%
Abdomen	2	5.4%
Ingle	2	5.4%
Periorbital	2	5.4%
Cabeza	1	2.7%
Cuello	1	2.7%
Tamaño		
Menor de 3 cm	19	51.4%
Mayor de 3 cm	18	48.6%
Cantidad		
Único	26	70.3%
Múltiple	11	29.7%
Aspecto		
No ulcerado	27	73%
Ulcerado	10	27%

En cuanto a signología, se obtuvo información de 32 pacientes, de los cuales 27 no presentaron ningún signo concomitante, de los cinco restantes, dos tuvieron vómitos y uno anorexia, los otros dos perros presentaron claudicación debido a que el tumor se ubicaba en los miembros locomotores. De los 33 pacientes de los que se obtuvo información sobre la estadificación realizada por los clínicos, a cuatro les realizaron solamente radiografías torácicas y a seis se les realizaron radiografías torácicas y ultrasonido abdominal sin encontrar cambios aparentes. A ningún paciente se le realizó la punción de nódulos linfáticos, la cual es la herramienta más importante para la estadificación según la literatura citada anteriormente. En cuanto a información sobre tratamiento, se obtuvo información de 35 pacientes, sólo 12 fueron tratados, de estos, siete se trataron sólo con prednisona y a cinco se les realizó quimioterapia, cuatro pacientes fueron tratados con Toceranib (Palladia®) y uno con vincristina.

Durante el desarrollo de este proyecto se tuvieron obstáculos para conseguir la información de todos los pacientes, esto es un punto importante para resaltar, ya que, debido a falta de disposición u organización de algunos clínicos y propietarios, fue complicado el producir información completa.

7.2 Clasificación histopatológica

En cuanto a histopatología, de las muestras clasificadas por el esquema de Patnaik se obtuvieron 6 grado I, 22 grado II y 9 grado III, por lo que se distribuyeron como se observa en la figura 12.

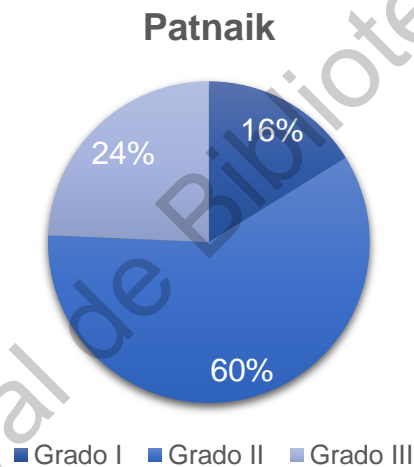


Figura 12. Distribución de los grados por el esquema de Patnaik de las muestras estudiadas

Los porcentajes reportados varían en los estudios realizados a nivel mundial. El porcentaje de grado I obtenido en el presente estudio (16%) es similar a los obtenidos por Sabattini et al. (2015) que registraron 13.1%, Stefanello et al. (2015) con 13.5% y Mochizuki et al. (2016), con 15.5% y es mucho menor al obtenido por Patnaik et al. (1984), que obtuvieron 36% de tumores grado I y por Ruiz Castillo et al. (2019) con 53.3%.

En cuanto al grado II, es el más frecuente reportado en casi todos los estudios, en este trabajo fue así (60%) y es similar a lo reportado por Sabattini et al. (2015) con 60.6%, superior a Ruiz Castillo et al. (2019) con 40%, Patnaik et al.

(1984) con 43% y a Smiech et al. (2017) con 53.23%; e inferior al 75.4% observado por Stefanello et al. (2015) y al 76.3% por Mochizuki et al. (2016).

Para tumores grado III, el porcentaje obtenido (24%) es similar a Sabbattini et al. (2015) que reportaron 26.3%, a Patnaik et al. (1984) con 20%; y es mayor al resto de los estudios que reportaron 11.1% (Stefanello et al., 2015), 8.2% (Mochizuki et al., 2016), 7.6% (Smiech et al., 2017) y 6.6% (Ruiz Castillo et al., 2019).

Por el esquema de Kiupel, 5 muestras se clasificaron como mastocitomas subcutáneos (13.5%) y 32 como cutáneos (86.5%), de estos últimos se obtuvieron 20 tumores bajo grado y 12 alto grado, por lo que se distribuyeron como la figura 13 lo muestra.

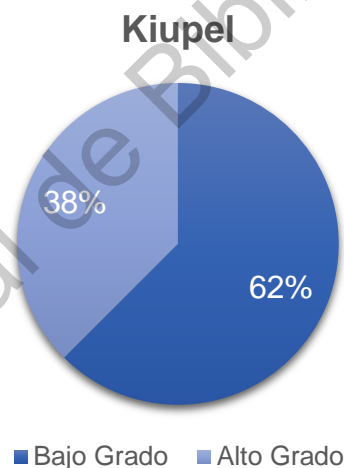


Figura 13. Clasificación de las muestras de mastocitomas cutáneos por el esquema de Kiupel

La proporción obtenida es similar a la observada por Sabbattini et al. (2015) que reportan 65% de tumores bajo grado y 35% de alto grado, sin embargo, es muy diferente a la obtenida por Kiupel et al. (2011) y Mochizuki et al. (2016), que obtuvieron 90% de bajo grado y 10% de alto grado. Estos porcentajes elevados de mastocitomas de alto grado de malignidad a comparación con los observados en las dos investigaciones anteriores, puede deberse a que en este estudio se tuvo mayor frecuencia de tumores en regiones que han sido relacionadas con la

presentación de tumores más agresivos, como son escroto e ingle (London y Thamm, 2013; Smiech et al., 2017). También puede deberse a que algunos de los clínicos que remitieron las muestras suelen tomar primero muestras para citología de las masas y después de la resección quirúrgica solo envían a histopatología las masas que en el estudio citológico se describieron como poco diferenciadas o de probable alto grado de malignidad.

Tomando el uso complementario de ambas clasificaciones, 4 de los 6 tumores grado I fueron clasificados como de bajo grado (66.7%), mientras que 2 fueron clasificados como subcutáneos (33.3%). Los 9 tumores grado III fueron clasificados como de alto grado (100%). Mientras que de los 22 tumores grado II, 3 se clasificaron como subcutáneos, 16 como bajo grado y 3 como alto grado, por lo que se distribuyeron como la figura 14 lo muestra. El porcentaje de tumores grado II/alto grado (13.6%) es similar a los registrados por Sabbattini et al. (2015) y Stefanello et al. (2015), que reportaron 14.4% y 16.5%, respectivamente.

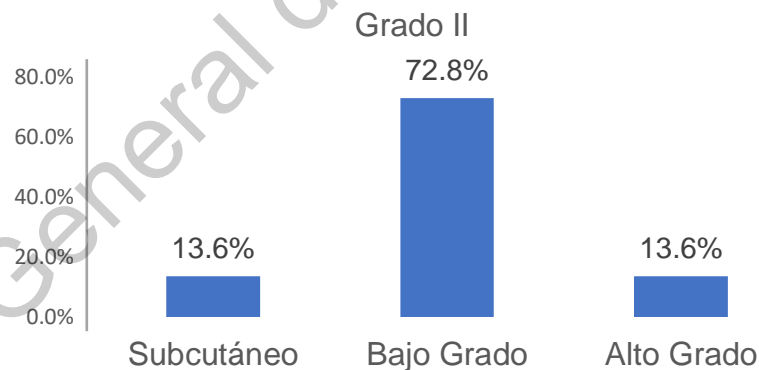


Figura 14. Clasificación por el esquema de Kiupel de los tumores grado II

7.3 Relación clínico-patológica

La frecuencia de los grados histopatológicos mediante el esquema de Patnaik en relación a las características de los pacientes y las masas tumorales se observa en el cuadro 7.

Cuadro 7. Frecuencia de grados histopatológicos por el esquema de Patnaik, en relación a las características de los pacientes y los tumores

Característica		Grado I		Grado II		Grado III	
Sexo	Hembra	3	50%	10	45%	5	55%
	Macho	3	50%	12	55%	4	45%
Edad	<6 años	1	17%	5	23%	0	-
	>6 años	5	83%	17	77%	9	100%
Raza	Bóxer	2	33.3%	6	27.3%	1	11%
	Pug	1	16.7%	3	13.6%	1	11%
	Mestizo	1	16.7%	1	4.5%	2	22%
	Labrador	1	16.7%	2	9%	0	-
	Otros	1	16.7%	10	45.6%	5	56%
Localización anatómica	Miembros locomotores	2	33.3%	11	50%	3	33.4%
	Tronco	2	33.3%	4	18.2%	0	-
	Escroto	0	-	3	13.6%	1	11.1%
	Pezón	0	-	0	-	3	33.3%
	Otros	2	33.4%	4	18.2%	2	22.2%
Tamaño de la masa	<3 cm	3	50%	12	54.5%	4	44.4%
	>3 cm	3	50%	10	45.5%	5	55.6%
Presentación	Única	3	50%	14	63.6%	9	100%
	Múltiple	3	50%	8	36.4%	0	-
Aspecto	No ulcerado	5	83.3%	17	77.3%	5	55.6%
	Ulcerado	1	16.7%	5	22.7%	4	44.4%

No se observa predisposición de grado para sexo; en cuanto a edad, el 100% de los tumores grado III se presentaron en pacientes mayores de 6 años. De la raza más frecuente (Bóxer), el 88.8% de los individuos presentaron tumores grado I y II, sólo un individuo presentó un tumor grado III, lo que corresponde con lo descrito por Mochizuki et al. (2016) y Smiech et al. (2017). En cuanto a la localización, el 81.3% de los tumores ubicados en miembros locomotores fueron grado I y II, mientras que el 18.7% grado III; en tronco el 100% de las masas se clasificaron en los primeros dos grados, y en escroto el 75% se clasificó como grado II, esto corresponde con lo encontrado por Smiech et al. (2017). Todos los tumores ubicados en pezón se clasificaron como grado III, no se tiene conocimiento sobre información similar publicada anteriormente. La presentación única es más común en tumores grado III

y el aspecto ulcerado aumenta su frecuencia conforme aumenta el grado histopatológico del tumor, esto último coincide con la literatura, en la que se menciona que usualmente los tumores con aspecto ulcerado suelen ser de mayor grado de malignidad (Welle et al., 2008; Kiupel, 2017).

Así mismo, la frecuencia de los grados histopatológicos mediante el esquema de Kiupel, en relación a las características mencionadas se observa en el cuadro 8.

Cuadro 8. Frecuencia de grados histopatológicos por el esquema de Kiupel, en relación a las características de los pacientes y los tumores

Característica		Subcutáneo		Bajo grado		Alto grado	
Sexo	Hembra	3	60%	10	50%	5	41.7%
	Macho	2	40%	10	50%	7	58.3%
Edad	<6 años	0	-	6	30%	0	-
	>6 años	5	100%	14	70%	12	100%
Raza	Bóxer	0	-	7	35%	2	16.7%
	Pug	0	-	4	20%	1	8.3%
	Mestizo	1	20%	0	-	3	25%
	Labrador	1	20%	2	10%	0	-
	Otros	3	60%	7	35%	6	50%
Localización anatómica	Miembros locomotores	2	40%	10	50%	4	33.3%
	Tronco	1	20%	4	20%	1	8.3%
	Escroto	0	-	2	10%	2	16.7%
	Pezón	0	-	0	-	3	25%
	Otros	2	40%	4	20%	2	16.7%
Tamaño de la masa	<3 cm	2	40%	12	60%	5	41.7%
	>3 cm	3	60%	8	40%	7	58.3%
Presentación	Única	3	60%	11	55%	12	100%
	Múltiple	2	40%	9	45%	0	-
Aspecto	No ulcerado	5	100%	16	80%	6	50%
	Ulcerado	0	-	4	20%	6	50%

Al igual que por el esquema de Patnaik, no se observa predisposición de sexo, sin embargo, en edad el 100% de los tumores de alto grado se presentaron en pacientes mayores de 6 años. En cuanto a raza, el 77.8% de los pacientes Bóxer presentaron tumores de bajo grado, lo que corresponde a lo observado por Mochizuki et al. (2016) y Smiech et al. (2017). El 75% de los mestizos presentaron

tumores de alto grado, esto es opuesto a lo registrado por Smiech et al. (2017), estudio en el que el porcentaje de perros mestizos con tumores de alto grado de malignidad fue mínimo.

En cuanto a la localización anatómica, el 75% de los tumores localizados en miembros locomotores y el 83.3% de los ubicados en tronco fueron clasificados como subcutáneos y bajo grado, mientras que el 50% de los tumores de escroto y el 100% de los tumores en pezón se clasificaron como alto grado; London y Thamm, 2013 mencionan un peor pronóstico para pacientes con tumores en escroto y prepucio, sin embargo, no se tiene conocimiento sobre información similar publicada anteriormente en cuanto a mastocitomas en pezones.

Para el tamaño de la masa no se observa predisposición a algún grado, sin embargo en cuanto a presentación única o múltiple (2 o más masas simultáneas en el animal), el 100% de los tumores de alto grado tuvieron una presentación única, esto no se ha registrado en ningún estudio anterior. Al igual que en los resultados del cuadro anterior, el aspecto ulcerado aumentó con el grado de malignidad.

Se buscó asociación estadística de las características de los pacientes y los tumores con su grado histopatológico mediante la prueba Chi cuadrada, agrupando las muestras para comparar grado I y grado II (Patnaik), grado II y grado III (Patnaik), cutáneo y subcutáneo (Kiupel) y bajo grado y alto grado (Kiupel).

El primer grupo (grado I y grado II) constó de 28 muestras y ninguna asociación tuvo significancia, el segundo grupo (grado II y grado III) se formó de 31 muestras y sus resultados se observan en el cuadro 9.

Se observó significancia por el esquema de Patnaik ($p=0.00$) en las masas ubicadas en el pezón, todos los tumores ubicados en esta zona fueron clasificados como grado III, representando el 33.3% de este grado. También se obtuvo significancia ($p=0.03$) en la característica de presentación única, de los 22 tumores grado II, sólo 8 (36.4%) fueron múltiples y de los 9 grado III, ninguno.

Cuadro 9. Significancias de las características de los pacientes y las masas tumorales grados II y III por el esquema de Patnaik

Características de los pacientes	<i>p</i>	Características de las masas tumorales	<i>p</i>
Raza Bóxer	0.32	Masa ubicada en miembros locomotores	0.39
Raza Pug	0.84	Masa ubicada en tronco	0.17
Raza Mestizo	0.13	Masa ubicada en escroto	0.84
Raza Labrador	0.35	Masa ubicada en pezón	0.00*
Edad mayor a 6 años	0.11	Tamaño mayor a 3 cm	0.60
Sexo	0.60	Presentación única	0.03*
		Masas ulceradas	0.22

El tercer grupo (cutáneo y subcutáneo) constó de 37 muestras y ninguna asociación tuvo significancia, mientras que el cuarto grupo (bajo y alto grado) fue formado por 32 muestras y sus resultados se observan en el cuadro 10.

Por la clasificación de Kiupel, se encontró significancia en los perros mestizos, ya que el 75% de ellos presentó tumores de alto grado ($p=0.01$); también se observó significancia ($p=0.03$) en la edad, ya que el 100% de los perros con tumores de alto grado fueron mayores a 6 años, así como en las masas ubicadas en pezón y en las masas múltiples, igual que por el esquema de Patnaik.

Cuadro 10. Significancias de las características de los pacientes y las masas tumorales de bajo y alto grado por el esquema de Kiupel

Características de los pacientes	<i>p</i>	Características de las masas tumorales	<i>p</i>
Raza Bóxer	0.26	Masa ubicada en miembros locomotores	0.35
Raza Pug	0.37	Masa ubicada en tronco	0.37
Raza Mestizo	0.01*	Masa ubicada en escroto	0.58
Raza Labrador	0.25	Masa ubicada en pezón	0.01*
Edad mayor a 6 años	0.03*	Tamaño mayor a 3 cm	0.31
Sexo	0.64	Presentación única	0.00*
		Masas ulceradas	0.07

Como se había mencionado antes, no se tiene conocimiento de ningún estudio anterior que haya encontrado asociación estadística entre la presentación de mastocitomas en los pezones de los perros y el alto grado de malignidad de estos ($p=0.01$). Así mismo, la relación entre la presentación única de los mastocitomas y su clasificación como alto grado ($p=0.00$) no se ha observado en ningún estudio del que se tenga conocimiento y, puede deberse al tamaño de muestra; Kiupel et al. (2005) encontraron relación entre mastocitomas múltiples y un menor tiempo de supervivencia, mientras que Thamm et al. (1999) y Murphy et al. (2006) no encontraron cambios significativos entre la supervivencia de pacientes con masas únicas o múltiples. Mullins et al. (2006) sugieren que los mastocitomas cutáneos múltiples están asociados con una baja tasa de metástasis y un buen pronóstico de supervivencia a largo plazo cuando se hace una adecuada escisión. Kiupel (2017) menciona que la significancia del pronóstico de mastocitomas múltiples es incierta debido a la variabilidad de resultados en distintas investigaciones, lo cual corresponde a lo obtenido en este estudio. También ésta asociación puede verse alterada debido a que los clínicos reportan el número de masas que observan o retiran, pero muchas veces no envían a histopatología todas las masas, por lo que el paciente puede estar cursando por dos o más tipos de neoplasia y no por un mastocitoma múltiple.

7.4 Recurrencias

Se obtuvo información posterior a la resección quirúrgica de las masas tumorales de 30 pacientes, la información de estos pacientes clasificados por el esquema de Patnaik se aprecian en el cuadro 11 y clasificados por el esquema de Kiupel, en el cuadro 12.

Ninguno de los pacientes con tumores grado I presentó recurrencias, coincidiendo con el buen pronóstico de este tipo de tumores descrito por Patnaik et al. (1984); de los tumores grado II, el 15% y de los grado III, el 80% presentaron recurrencias. Los porcentajes de estos dos últimos grados son más elevados que los observados por Murphy et al. (2004), que obtuvieron 6 y 19% respectivamente.

La prueba de Chi cuadrada mostró una significancia de $p=.012$ en la relación de los grados II y III con la presentación de recurrencias, teniendo 4.2 veces mayor probabilidad de presentar recurrencias si el tumor es grado III.

Cuadro 11. Información sobre recurrencias según el esquema de clasificación de Patnaik

Grado histopatológico	Individuos con información	Recurrencias	Porcentaje
Grado I	5	0	-
Grado II	20	3	15%
Grado III	5	4	80%

Cuadro 12. Información sobre recurrencias según el esquema de clasificación de Kiupel

Grado histopatológico	Individuos con información	Recurrencias	Porcentaje
Subcutáneo	4	0	-
Bajo grado	18	1	5.5%
Alto grado	8	6	75%

De los pacientes con información postquirúrgica que presentaron mastocitomas subcutáneos, ninguno experimentó recurrencias, coincidiendo con el buen pronóstico de este tipo de tumores descrito por Kiupel (2017). De los mastocitomas cutáneos, el 26.9% (7 de 26) presentó recurrencias, el 5.5% de los tumores bajo grado y el 75% de los tumores alto grado, este último porcentaje es mucho más alto que el reportado por Donnelly et al. (2013), con 36% de probabilidad de recurrencia para alto grado, en cuanto al porcentaje de bajo grado, el observado en nuestro trabajo es muy similar al reportado por este mismo autor, que fue de 4%. La prueba de Chi cuadrada mostró una significancia de $p=.001$ en la relación de bajo y alto grado con la presentación de recurrencias, teniendo 3.7 veces mayor probabilidad de presentar recurrencias si el tumor es de alto grado.

En cuanto al uso complementario de las clasificaciones, de los 20 tumores grado II de los que se obtuvo información posterior, 2 fueron clasificados como

subcutáneos y ninguno presentó recurrencias. De los 18 cutáneos, 3 fueron clasificados como alto grado por Kiupel, de los cuales 2 presentaron recurrencia (66%); de los 15 restantes clasificados como bajo grado, 1 tuvo recurrencia (6.6%). Se obtuvo asociación estadística ($p=0.05$) y se observó una probabilidad 2.8 veces mayor de no presentar recurrencias si el tumor es clasificado como grado II/bajo, lo que muestra la importancia del uso de ambas clasificaciones.

De los pacientes con recurrencias, dos no fueron tratados y cinco sí, de aquellos que no presentaron recurrencias, 18 no fueron tratados y cinco sí. No se encontró asociación estadística entre las recurrencias y los tratamientos.

7.5 Conteo mitótico

Todas las muestras fueron evaluadas para obtener el número de figuras mitóticas en un área estándar de 2.37 mm², los resultados de los tumores clasificados mediante el esquema de Patnaik y Kiupel se observan en los cuadros 13 y 14, respectivamente.

Cuadro 13. Resultados del conteo mitótico de las 37 muestras clasificadas según el esquema de Patnaik

Grado	Promedio	Rango	Número de muestras
I	0	0 – 0	6
II	1.73	0 – 9	22
III	11.1	2 – 16	9

Cuadro 14. Resultados del conteo mitótico de las 37 muestras clasificadas según el esquema de Kiupel

Grado	Promedio	Rango	Número de muestras
Subcutáneo	0	0 – 0	5
Bajo	0.6	0 – 3	20
Alto	10.5	2 – 16	12

El valor de corte propuesto por Romansik et al. (2007) para mastocitomas cutáneos es de 5 y el valor propuesto por Thompson et al. (2011) para subcutáneos es de 4. Tumores con valores mayores a los puntos de corte se han asociado a menor tiempo de supervivencia en ambos estudios. En las muestras estudiadas, sólo una muestra clasificada como grado III/Alto grado cae por debajo de este punto ya que obtuvo un valor de 2. El resto de las muestras clasificadas como grado III y alto grado tuvieron valores de 7 a 16, por lo que el punto de corte de 5 mitosis corresponde al 88.9% de las muestras estudiadas clasificadas como grado III (Patnaik) y al 91.7% de aquellas clasificados como alto grado (Kiupel).

Se buscó asociación entre las variables “grado histopatológico” y “conteo mitótico” mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Para el esquema de clasificación de Patnaik se obtuvo un coeficiente de 0.752 con una significancia bilateral de 0.000; para el esquema de Kiupel se obtuvo un coeficiente de 0.834 con una significancia bilateral de 0.000. Estos coeficientes muestran una asociación lineal proporcional entre las variables, por lo que los tumores clasificados como de mayor grado de malignidad por ambos esquemas tendrán un conteo mitótico elevado.

7.6 Propuesta de reporte histopatológico

Durante el desarrollo del proyecto, se observó una inadecuada comunicación entre el patólogo y el clínico, lo cual impacta en el manejo del paciente. Por lo tanto, se propone agregar a los reportes un anexo con información de las clasificaciones histológicas que ayuden al clínico a interpretar el diagnóstico proporcionado por el patólogo. Se sugiere que el anexo incluya las características más importantes de cada grado, el pronóstico del uso complementario de las clasificaciones e información sobre el punto de corte del conteo mitótico.

Se propone un anexo como el siguiente:

Clasificación histopatológica por el esquema de Patnaik et al. (1984)

	Grado I	Grado II	Grado III
Localización	Dermis superficial.	Dermis profunda y tejido subcutáneo.	Infiltra tejidos profundos.
Morfología celular	Monomórficas.	Pleomorfismo moderado.	Pleomórficas.
Morfología nuclear	Redondos con cromatina condensada.	Redondos a indentados con cromatina dispersa.	Indentados a vesiculosos, con nucléolos prominentes.
Celularidad, arquitectura y reacción del estroma	Baja celularidad, arreglos en filas separadas por colágeno en dermis.	Celularidad moderada. Arreglos en grupos con estroma fibrovascular fino a grueso.	Alta celularidad. Arreglos en láminas muy compactas, estroma fibrovascular a fibrocolagenoso.
Figuras mitóticas	Ninguna.	Raras (0-2/campo).	Comunes (3-6/campo).
Edema y necrosis	Mínimo	Difuso.	Común.

Clasificación histopatológica por el esquema de Kiupel et al. (2011)

Tumores cutáneos: Ubicados en dermis. Clasificados en bajo y alto grado.

Clasificación	Características
Alto Grado	Una o más de las siguientes (en 10 campos de alta potencia) <ul style="list-style-type: none"> ○ 7 figuras mitóticas ○ 3 células multinucleadas ○ 3 núcleos bizarros ○ Cariomegalia
Bajo Grado	Ninguna

Tumores subcutáneos: Rodeados de tejido adiposo. La mayoría son benignos, sin embargo, conteos mitóticos mayores a 4 sugieren malignidad.

Pronóstico de mastocitomas cutáneos mediante el uso complementario de las clasificaciones (VCS OPWG, 2017)

5. Grado I, Bajo Grado: Pronóstico excelente. Se ha reportado un riesgo de metástasis a nódulos linfáticos del 6% y de metástasis a distancia del 2%.

6. Grado II, Bajo Grado: Pronóstico bueno, 6% de muertes relacionadas a recurrencias. Riesgo de metástasis a nódulos linfáticos de 16% y de metástasis a distancia del 2%.
7. Grado II, Alto Grado: Pronóstico reservado, 50% de muertes relacionadas a la neoplasia. Riesgo de metástasis a nódulos linfáticos de 15% y de metástasis a distancia del 2%.
8. Grado III, Alto Grado: Pronóstico de reservado a malo, 67-75% de muertes relacionadas a la neoplasia. Riesgo de metástasis a nódulos linfáticos de 46-49% y de metástasis a distancia del 21%.

Conteo mitótico

Correlacionado inversamente con supervivencia, riesgo de metástasis y de recurrencia local. Valor de corte de 5 mitosis en un área estándar de 2.37 mm² en mastocitomas cutáneos (Romansik et al., 2007) y de 4 en mastocitomas subcutáneos (Thompson et al., 2011).

De esta forma, el reporte histopatológico incluye la descripción macroscópica, microscópica, el diagnóstico usando ambas clasificaciones y el conteo mitótico, así como comentarios específicos de la muestra en caso de ser necesario y al finalizar, el anexo con la información complementaria para su mejor interpretación por parte del clínico, evitando confusiones y por lo tanto, incorrectas decisiones para el manejo del paciente.

VIII. CONCLUSIONES

Para conocimiento de los autores, este es el primer reporte epidemiológico y patológico de mastocitomas caninos realizado en Querétaro, por lo que sirve como base para investigaciones posteriores. Resultados como el promedio de edad, las razas y localizaciones más frecuentes coinciden con lo observado en investigaciones a nivel mundial, sin embargo, la asociación estadística entre tumores de alta malignidad con la localización en pezón, la presentación única y la raza mestizo no se ha descrito en ningún estudio publicado anteriormente.

Debido a la asociación significativa de las recurrencias y el conteo mitótico con ambas clasificaciones histopatológicas se promueve el uso complementario de ambos sistemas de clasificación y la utilización del conteo mitótico ya que pueden ayudar a clarificar el comportamiento biológico de los tumores y, por lo tanto, proporcionar información íntegra que sirva como base para la toma de decisiones de los clínicos y los propietarios. Se solicita a los patólogos proveer de mayor información a los clínicos para facilitar la interpretación de los reportes histopatológicos tanto en mastocitomas como en cualquier otro tipo de neoplasia, una forma de hacerlo es utilizando la propuesta de anexo en el reporte histopatológico desarrollado en este trabajo.

Así como se invita a los clínicos a aclarar dudas sobre el diagnóstico con los patólogos con el fin de evitar malas interpretaciones. Además se observó que la herramienta de la estadificación está casi completamente ausente en la práctica clínica en el estado, la cual es clave para un pronóstico completo de la enfermedad, por lo que se promueve su uso por parte de los médicos.

A su vez, se sugiere la creación de un banco de información de nuestro país con la finalidad de poseer datos exactos de las diferentes patologías en medicina veterinaria, ya que debido a falta de organización no se produce información completa y las investigaciones deben basarse en datos de otros países.

IX. REFERENCIAS

- Baioni, E., Scanziani, E., Vincenti, M., Leschiera, M., Bozzetta, E., Pezzolato, M., Desiato, R.; Bertolini, S., Maurella, C., Ru, G. (2017). Estimating canine cancer incidence: findings from a population-based tumour registry in northwestern Italy. *BMC Vet Res*, 13(1), 203.
- Blackwood, L., Murphy, S., Buracco, P., De Vos, J., De Fornel-Thibaud, P., Hirschberger, J., Kessler, M., Pastor, J., Ponce, F., Savary-Bataille, K., Argyle, D. (2012). European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. *Vet Comp Oncol*, 10(3), e1-e29.
- Bostock, D., Crocker, J., Harris, K., and Smith, P. (1989). Nucleolar organiser regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumours. *Br J Cancer*, 59, 915-918.
- Bronden, L., Lindstrand, S., Nielsen, S., Toft, N., and A, K. (2009). Validation of data collected in the Danish Veterinary Cancer Registry. *Vet Comp Oncol*, 7(3), 207-211.
- Camus, M., Priest, H., Koehler, J., Driskell, E., Rakich, P., Ilha, M., and Krimer, P. (2016). Cytologic Criteria for Mast Cell Tumor Grading in Dogs With Evaluation of Clinical Outcome. *Vet Pathol*, 53(6), 1117-1123.
- De la Cruz Hernández, N. I., Monreal García, A. E., Carvajal de la Fuente, V., Barrón Vargas, C. A., Martínez Burnes, J., Zarate Terán, A., Carmona Aguirre, D., García Luna, F., Merino Charres, O. (2017). Frecuencia y caracterización de las principales neoplasias presentes en el perro doméstico en Tamaulipas (México). *Rev Med Vet*, 35, 53-71.
- De Nardi, A., Costa, M., Amorim, R., Vasconcelos, R., Dagli, M., Rocha, N., Neto, R., Grandi, F., Alessi, A., Magalhães, G., Sueiro, F., Werner, J., Figuera, R., Strefezzi, R., Daleck, C., Vasconcelos, C., Gerardi, D., Ubukata, R., Costa, S., Casagrande, T., Jark, P. (2018). Brazilian Consensus for the Diagnosis,

Treatment and Prognosis of Cutaneous Mast Cell Tumors in dogs. *Investigação*, 17(1), 1-15.

DeNicola, D. (2007). Round Cells. En R. Cowell, R. Tyler, J. Meinkoth, and D. DeNicola, *Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat* (págs. 69-72). St Louis: Mosby Elsevier.

Donnelly, L., Mullin, C., Balko, J., Goldschmidt, M., Krick, E., Hume, C., Brown, D., Sorenmo, K. (2013). Evaluation of histological grade and histologically tumour-free margins as predictors of local recurrence in completely excised canine mast cell tumours. *Vet Comp Oncol*, 13(1), 70-76.

Dores, C., Milovancev, M., and Russell, D. (2018). Comparison of histologic margin status in low-grade cutaneous and subcutaneous canine mast cell tumours examined by radial and tangential sections. *Vet Comp Oncol*, 16(1), 125-130.

Ehrlich, P. (1878). Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. *Leipzig University*. Citado por Ribatti, D., and Crivellato, E. (2014). Mast cell ontogeny: An historical overview. *Immunol Lett*, 11-14.

Fajardo, R., Alpízar, A., Pérez, L., Martínez, J., and Córdova, E. (2013). Prevalence of tumors in dogs from the municipality of Toluca, México, from 2002 to 2008. *Arch Med Vet*, 45, 305-309.

Ferrari, R., Marconato, L., Buracco, P., Boracchi, P., Giudice, C., Iussich, S., Grieco, V., Chiti, L., Favretto, E., Stefanello, D. (2018). The impact of extirpation of non-palpable/normal-sized regional lymph nodes on staging of canine cutaneous mast cell tumours: A multicentric retrospective study. *Vet Comp Oncol*, 16(4), 505-510.

Gil da Costa, R., Matos, E., Rema, A., Lopes, C., Pires, M., and Gärtner, F. (2007). CD117 immunoexpression in canine mast cell tumours: correlations with pathological variables and proliferation markers. *BMC Vet Res*, 3(19).

- Graf, R., Pospischil, A., Guscelli, F., Meier, D., Welle, M., and Dettwiler, M. (2018). Cutaneous Tumors in Swiss Dogs: Retrospective Data From the Swiss Canine Cancer Registry, 2008–2013. *Vet Pathol*, 55(6), 809-820.
- Hergt, F., Bomhard, W. v., Kent, M., and Hirschberger, J. (2016). Use of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors on cytology specimens. *Vet Clin Pathol*, 45(3), 477-483.
- Kiupel, M. (2017). Mast Cell Tumors. En D. Meuten, *Tumors in Domestic Animals* (Fifth ed., págs. 176-202). Ames: John Wiley & Sons Inc.
- Kiupel, M., Webster, J., Bailey, K., Best, S., DeLay, J., Detrisac, C., Fitzgerald, S., Gamble, D., Ginn, P., Goldschmidt, M., Hendrick, M., Howerth, E., Janovitz, E., Langohr, I., Lenz, S., Lipscomb, T., Miller, M., Misdorp, W., Moroff, S., Mullaney, T., Neyens, I. (2011). Proposal of a 2-Tier Histologic Grading System for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors to More Accurately Predict Biological Behavior. *Vet Pathol*, 48(1), 147-155.
- Kiupel, M., Webster, J., Kaneene, J., Miller, R., and Yuzbasiyan-Gurkan, V. (2004). The Use of KIT and Tryptase Expression Patterns as Prognostic Tools for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Vet Pathol*, 41, 371–377.
- Kiupel, M., Webster, J., Miller, R., and Kaneene, J. (2005). Impact of Tumour Depth, Tumour Location and Multiple Synchronous Masses on the Prognosis of Canine Cutaneous Mast Cell Tumours. *J Vet Med*, 52, 280–286.
- Krick, E., Billings, A., Shofer, F., Watanabe, S., and Sorenmo, K. (2009). Cytological lymph node evaluation in dogs with mast cell tumours: association with grade and survival. *Vet Comp Oncol*, 7(2), 130-138.
- Krick, E., Kiupel, M., Durham, A., Thaiwong, T., Brown, D., and Sorenmo, K. (2017). Investigating Associations Between Proliferation Indices, C-kit, and Lymph Node Stage in Canine Mast Cell Tumors. *J Am Anim Hosp Assoc*, 53(5), 258-264.

- Löhr, C., Teifke, J., Failing, K., and Weiss, E. (1997). Characterization of the Proliferation State in Canine Mammary Tumors by the Standardized AgNOR Method with Postfixation and Immunohistologic Detection of Ki-67 and PCNA. *Vet Pathol*, 34(3), 212-221.
- London, C., and Thamm, D. (2013). Mast Cell Tumors. En S. Withrow, D. Vail, and R. Page, *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (págs. 335-346). St Louis: Elsevier Saunders.
- MastCellAware. (30 de Mayo de 2020). *About Mast Cells*. Obtenido de MastCellAware: <http://www.mastcellaware.com/mast-cells/about-mast-cells.html>
- Medina, I., Puicón, V., and Sandoval, N. (2017). Frecuencia de Tumores en Piel de Caninos Diagnosticados Histopatológicamente en el Laboratorio de Patología Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (1999–2012). *Rev Inv Vet Perú*, 28(2), 448-454.
- Mochizuki, H., Motsinger-Reif, A., Bettini, C., Moroff, S., and Breen, M. (2016). Association of breed and histopathological grade in canine mast cell tumours. *Vet Comp Oncol*, 829-839.
- Moya García, S. (2011). Mastocitoma. En J. C. Cartagena, *Oncología Veterinaria* (págs. 101-116). Navarra, España: Servet.
- Mullins, M., Withrow, S., and Thamm, D. (2006). Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998–2004). *J Am Vet Med Assoc*, 228, 91-95.
- Murphy, S., Sparkes, A., Blunden, A., Brearley, M., and Smith, K. (2006). Effects of stage and number of tumours on prognosis of dogs with cutaneous mast cell tumours. *Vet Rec*, 158(9), 287-291.

- Murphy, S., Sparkes, A., Smith, K., Blunden, A., and Brearley, M. (2004). Relationships between the histological grade of cutaneous mast cell tumours in dogs, their survival and the efficacy of surgical resection. *Vet Rec*, 154(24), 743-746.
- Owen, J., Punt, J., Stranford, S., and Jones, P. (2014). Células, órganos y microambientes del sistema inmunitario. En J. Owen, J. Punt, S. Stranford, and P. Jones, *Kuby Inmunología* (Séptima ed., pág. 33). Ciudad de México, México: McGraw Hill.
- Patnaik, A. K., Ehler, W. J., and MacEwen, E. G. (1984). Canine Cutaneous Mast Cell Tumor: Morphologic Grading and Survival Time in 83 Dogs. *Vet Pathol*, 21, 469-474.
- Ribatti, D., and Crivellato, E. (2014). Mast cell ontogeny: An historical overview. *Immunol Lett*, 11-14.
- Romansik, E., Reilly, C., Kass, P., Moore, P., and London, C. (2007). Mitotic Index Is Predictive for Survival for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Vet Pathol*, 4(3), 335–341.
- Ruiz Castillo, D., Quijano Hernández, I., y Del Angel Caraza, J. (2019). Caracterización de la población canina con mastocitoma cutáneo del hospital veterinario de perros y gatos (HVPE). *Vanguardia Veterinaria*, 92, 28-32.
- Sabattini, S., Renzi, A., Marconato, L., Militerno, G., Agnoli, C., Barbiero, L., Rigillo, A., Capitani, O., Tinto, D., Bettini, G. (2018). Comparison between May-Grünwald-Giemsa and rapid cytological stains in fine-needle aspirates of canine mast cell tumour: Diagnostic and prognostic implications. *Vet Comp Oncol*, 16(4), 511-517.
- Sabattini, S., Scarpa, F., Berlato, D., and Bettini, G. (2015). Histologic Grading of Canine Mast Cell Tumor: Is 2 Better Than 3? *Vet Pathol*, 52(1), 70-73.

- Scarpa, F., Sabattini, S., and Bettini, G. (2014). Cytological grading of canine cutaneous mast cell tumours. *Vet Comp Oncol*, 14(3), 245-251.
- Scarpa, F., Sabattini, S., Marconato, L., Capitani, O., Morini, M., and Bettini, G. (2012). Use of histologic margin evaluation to predict recurrence of cutaneous malignant tumors in dogs and cats after surgical excision. *J Am Vet Med Assoc*, 240(10), 1181-1187.
- Schultheiss, P. C., Gardiner, D. W., Rao, S., Olea-Popelka, F., and Tuohy, J. L. (2011). Association of histologic tumor characteristics and size of surgical margins with clinical outcome after surgical removal of cutaneous mast cell tumors in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 238(11), 1464-1469.
- SE. (2011). NMX-R-019-SCFI-2011 Sistema Armonizado de Clasificación y Comunicación de Peligros de los Productos Químicos. *Diario Oficial de la Federación*.
- SEMARNAT. (2006). NOM-052-SEMARNAT-2005 Características, Procedimiento de identificación, Clasificación y Listados de los Residuos Peligrosos. *Diario Oficial de la Federación*.
- SEMARNAT, y SSA. (2003). NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. *Diario Oficial de la Federación*.
- Shaw, T., Kudnig, S., and Firestone, S. (2017). Diagnostic accuracy of pre-treatment biopsy for grading cutaneous mast cell tumours in dogs. *Vet Comp Oncol*, 16, 214-219.
- Shoop, S., Marlow, S., Church, D., English, K., McGreevy, P., Stell, A., Thomson, P., O'Neill, D., and Brodbelt, D. (2015). Prevalence and risk factors for mast cell tumours in dogs in England. *Canine Genet Epidemiol*, 2(1), 1-10.
- Simoës, J., Schoning, P., and Butine, M. (1994). Prognosis of Canine Mast Cell Tumors: A Comparison of Three Methods. *Vet Pathol*, 31(6), 637-647.

- Sledge, D., Webster, J., and Kiupel, M. (2016). Canine cutaneous mast cell tumors: A combined clinical and pathologic approach to diagnosis, prognosis and treatment selection. *Vet J*, 43-54.
- Smiech, A., Slaska, B., Lopuszynski, W., Jasik, A., Szczepanik, M., and Wilkolek, P. (2017). Epidemiological study of canine mast cell tumours according to the histological malignancy grade. *Pol J Vet Sci*, 455-465.
- Stefanello, D., Buracco, P. S., Finotello, R., Giudice, C., Grieco, V., and Iussich, S. (2015). Comparison of 2- and 3-category histologic grading systems for predicting the presence of metastasis at the time of initial evaluation in dogs with cutaneous mast cell tumors: 386 cases (2009–2014). *J Am Vet Med Assoc*, 246(7), 765–769.
- Stromberg, P., and Meuten, D. (2017). Trimming Tumors for Diagnosis and Prognosis. En D. Meuten, *Tumors in Domestic Animals* (págs. 27-43). Iowa: Wiley Blackwell.
- Thamm, D., Mauldin, E., and Vail, D. (1999). Prednisone and Vinblastine Chemotherapy for Canine Mast Cell Tumor- 41 Cases (1992–1997). *J Vet Intern Med*, 13, 491-497.
- Thompson, J., Pearl, D., Yager, J., Best, S., Coomber, B., and Foster, R. (2011). Canine Subcutaneous Mast Cell Tumor: Characterization and Prognostic Indices. *Vet Pathol*, 48(1), 156-168.
- Thompson, J., Yager, J., Best, S., Pearl, D., Coomber, B., Torres, R., Kiupel, M., Foster, R. (2011). Canine Subcutaneous Mast Cell Tumors: Cellular Proliferation and KIT Expression as Prognostic Indices. *Vet Pathol*, 48(1), 169–181.
- Tizard, I. (2009). *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. Barcelona: Elsevier España.

- Vascellari, M., Giantin, M., Capello, K., Carminato, A., Morello, E., Vercelli, A., Granato, A., Buracco, P., Dacasto, M., Mutinelli, F. (2012). Expression of Ki67, BCL-2, and COX-2 in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Association With Grading and Prognosis. *Vet Pathol*, 50(1), 110–121.
- VCS. (2017). Updated Consensus on Grading of Canine Cutaneous MCTs. Missouri: Oncology Pathology Working Group, Veterinary Cancer Society (no publicado).
- Warland, J., Amores-Fuster, I., Newbury, W., Brearley, M., and Dobson, J. (2012). The utility of staging in canine mast cell tumours. *Vet Comp Oncol*, 12(4), 287-298.
- Webster, J., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Kaneene, J., Miller, R., Resau, J., and Kiupel, M. (2006). The Role of c-KIT in Tumorigenesis: Evaluation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Neoplasia*, 8(2), 104–111.
- Webster, J., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Miller, R., Kaneene, J., and Kiupel, M. (2007). Cellular Proliferation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Associations with c-KIT and Its Role in Prognostication. *Vet Pathol*, 44(3), 298-308.
- Weishaar, K., Thamm, D., Worley, D., and Kamstock, D. (2014). Correlation of Nodal Mast Cells with Clinical Outcome in Dogs with Mast Cell Tumour and a Proposed Classification System for the Evaluation of Node Metastasis. *J Comp Pathol*, 151(4), 329-338.
- Welle, M., Rohrer, C., Howard, J., and Rüfenacht, S. (2008). Blackwell Publishing Ltd Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. *Vet Dermatol*, 19(6), 321-339.
- WHO, and Owen, L. (1980). *TNM Classification of Tumours in Domestic Animals*. Ginebra: World Health Organization.