



TESIS DOCTORAL

CORRELACIÓN DE FACTORES PRONÓSTICO CLÍNICOS, HISTOPATOLÓGICOS E INMUNOHISTOQUÍMICOS EN LESIONES NEOPLÁSICAS MAMARIAS MALIGNAS EN LA ESPECIE CANINA

Nieves Pastor Sirvent

M^a Esther Durán Flórez, Profesora Titular de Anatomía y Anatomía Comparadas del Departamento de Medicina Animal de la Universidad de Extremadura y Raquel Tarazona Lafarga, Profesora Titular del área de Inmunología del Departamento de Fisiología de la Universidad de Extremadura, en calidad de Directoras de la Tesis titulada “Correlación de factores pronóstico clínicos, histopatológicos e inmunohistoquímicos en lesiones neoplásicas mamarias malignas en la especie canina”, tienen el honor de informar que:

Dña. Nieves Pastor Sirvent ha trabajado bajo su dirección desde 2012 en el tema antes citado.

Que tanto el material bibliográfico como las experiencias presentadas han sido oportunamente analizados y cuidadosamente seleccionados. Los resultados y conclusiones hacen estimar a quienes esto suscriben como directoras de la Tesis Doctoral, que puede ser presentada a efectos de ser juzgada.

Lo que firman y rubrican en Cáceres, a 9 de Noviembre de 2015.

Fdo: M^a Esther Durán Florez

Fdo. Raquel Tarazona Lafarga

Financiación

Este trabajo ha sido parcialmente financiado con las Ayudas a los Grupos de investigación Inmunopatología Tumoral (INPATT) y Medicina y Cirugía Animal (MECIAN) de la Junta de Extremadura (GR09156, GR10104, GR15183 y GR10115) y de la Universidad de Extremadura y por el proyecto Large Animal Biopole (LABPOLE) del Ministerio de Economía y Competitividad cofinanciados por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).



A Alfredo, por estar siempre a mi lado dándome fuerzas para seguir adelante y saber entenderme. Por intentar arrancarme siempre una sonrisa.

A mis padres, que me han apoyado constante e incondicionalmente en todas las facetas de mi vida, ofreciéndome todo su cariño y haciéndome crecer como persona.

A mi hermano, por cuidarme y ayudarme en todo desde que tengo uso de razón. Por ser tan especial para mí.

A toda mi familia por su apoyo, y en especial, le dedico este trabajo a mis tres princesas porque lo son todo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Esther Durán Flórez, directora de esta Tesis, por su apoyo, consejos y por confiar en mí para este trabajo, porque sin su constante esfuerzo esta Tesis no se habría podido llevar a cabo. Por su dedicación a esta profesión.

A la Dra. Raquel Tarazona Lafarga, directora de esta Tesis, por estar siempre disponible y dispuesta a ayudarme durante estos años.

A Núria Cervigón Caballé, por su esfuerzo para realizar toda la parte de estadística de esta Tesis, por estar siempre dispuesta a enseñarme tantas cosas.

A Silvia, por su gran aportación a esta Tesis, porque sin su trabajo incondicional no habría podido concluir este trabajo. Por estar ahí como amiga.

A mi jefe, Javier, por su apoyo constante y todas sus enseñanzas diarias.

A mis compañeros de trabajo en el HCV, a María, Ana, Alejandro, Luisa, Massimo, Yolanda... por su ayuda y cariño todos estos años. Por su amistad.

A mis amigos en Cáceres, Simón, Anita, Bruce, Pilar, María, Ricardo.... y a mis amigos en esta tierra, Ysa, Joana, Babé, Javi... por vuestra amistad durante tantos años y por ser como sois. Mi segunda familia.

A mis amigos en Alicante, Bea, Lucía, Mari... por mantener nuestra amistad como el primer día a pesar de la distancia y por darme tanto cariño durante muchos años. Porque me haceis sentir parte de vosotras.

A mis amigas de la Conce, por todos esos momentos compartidos y por darme vuestro ánimo.

En general, a todos los que han participado de alguna manera en la elaboración de esta Tesis.

¡MUCHAS GRACIAS A TODOS!

ABREVIATURAS

(ADN) Ácido desoxirribonucleico	(FISH) Hibridación Fluorescente In Situ
(AgNOR) Regiones Organizadoras Nucleolares Argirofílicas	(HER-2) Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal Humano - 2
(AINEs) Antiinflamatorios no esteroideos	(GH) Hormona de Crecimiento
(ARN) Ácido ribonucleico	(HPF) Campos de Alta Potencia
(ARNm) Ácido ribonucleico mensajero	(IHC) Inmunohistoquímica
(ASCO/CAP) Sociedad Americana de Oncología Clínica/Colegio de Patólogos Americano	(IL) Interleucina
(ATP) Adenosin trifosfato	(IQR) Rango Intercuartílico
(Bcl-2) B-cell Lymphoma 2	(IS) Intensity Score
(BCRP) Proteína de Resistencia del Cáncer de Mama	(M) Metástasis distantes
(bFGF) Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico	(MAPK) Proteína Quinasa Activada por Mitógenos
(CISH) Hibridación Cromogénica In Situ	(MRP) Proteína Relacionada con la Motilidad
(col.) Colaboradores	(N) Estado de los nódulos linfáticos regionales
(COX) Ciclooxygenasa	(NFkB) Factor Nuclear Kappa-B
(CLA) Ácido Linoleico Conjugado	(OR) Odds Ratio
(DNA-EP/Ad) Electroporación del Ácido desoxirribonucleico y Adenovirus	(PCNA) Antígeno Nuclear de Proliferación Celular
(EGFR) Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal	(PCR) Reacción en Cadena de la Polimerasa
(EGF) Epidermal Growth Factor	(PGE2) Prostaglandina E2
(ELISA) Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas	(PGG2) Prostaglandina G2
(EP) Receptor de Prostaglandina E	(PGH2) Prostaglandina H2
(ER) Receptor de Estrógeno	(PGHS) Prostaglandina H sintasa
(FCS) Federación Cinológica Internacional	(pH) Potencial hidrógeno
(FGF) Factor de Crecimiento Fibroblástico	(PR) Receptor de progesterona
	(PS) Proportion Score
	(SPF) Fracción de Fase S

X

(SPSS) Statistical Package for the Social Sciences

(TS) Total Score

(T) Tamaño del tumor primario

(UEx) Universidad de Extremadura

(TNF) Factor de Necrosis Tumoral

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	2
OBJETIVOS	2
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
1. GENERALIDADES DE LOS TUMORES MAMARIOS EN LA ESPECIE CANINA	3
1. PREVALENCIA DE LOS TUMORES MAMARIOS CANINOS	3
2. FACTORES DE RIESGO EN EL CÁNCER MAMARIO DE LA ESPECIE CANINA	3
Factores de Riesgo Hormonales	4
Factores de Riesgo Genéticos	5
3. DIAGNÓSTICO DE LOS TUMORES MAMARIOS CANINOS	6
4. TRATAMIENTO DE LOS TUMORES MAMARIOS CANINOS	11
5. FACTORES PRONÓSTICOS EN LOS TUMORES MAMARIOS CANINOS	13
Factores clínicos y epidemiológicos	14
Factores patológicos	16
2. EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y PROGESTERONA	22
1. INTRODUCCIÓN	22
2. TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE RECEPTORES HORMONALES	23
3. ANÁLISIS DE LAS LESIONES MAMARIAS	26
4. INDICADOR PRONÓSTICO Y TERAPIA	29
3. EXPRESIÓN DEL ONCOGEN ErbB2	30
1. INTRODUCCIÓN	30
Propiedades de ErbB2:	31
Mecanismos moleculares que conducen a la sobreexpresión de ErbB2 en el cáncer mamario humano	32
2.- TÉCNICAS PARA LA EVALUACIÓN DE ErbB2.	32
Análisis inmunohistoquímico (IHC)	35
3. IMPLICACIÓN CLÍNICA DE LA EXPRESIÓN DE ErbB2	36
4. RESPUESTA A LA TERAPIA PARA TUMORES POSITIVOS A ErbB2	40
4. EXPRESIÓN DE LA CICLOOXIGENASA-2	42
1. INTRODUCCIÓN	42
Prostaglandinas y ciclooxigenasas	42
Ciclooxigenasa-2 y su relación con el cáncer	42
El papel de la enzima ciclooxigenasa-2 en el cáncer mamario humano	45
El papel de la enzima ciclooxigenasa-2 en los tumores mamarios de la especie canina	45
Ciclooxigenasa-2 y su inducción por el oncogen HER-2	46
Ciclooxigenasa-2 y su relación con los receptores de estrógenos	46
2. TÉCNICAS PARA EVALUAR LA EXPRESIÓN DE LA CICLOOXIGENASA-2	46

3. EXPRESIÓN DE CICLOOXIGENASA-2 EN LOS DIFERENTES TIPOS HISTOLÓGICOS DE TUMORES MAMARIOS CANINOS	48
4. CICLOOXIGENASA-2 COMO FACTOR PRONÓSTICO	48
5. INHIBICIÓN DE CICLOOXIGENASA-2 COMO HERRAMIENTA PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER	50
Los inhibidores de la ciclooxigenasa-2 en combinación con la quimioterapia	51
Uso de inhibidores de la ciclooxigenasa-2 en combinación con la radioterapia	52
III. MATERIALES Y MÉTODO	55
1. ANÁLISIS DE LA PATOLOGÍA ONCOLÓGICA DE LA GLÁNDULA MAMARIA DE LA ESPECIE CANINA EN EL PERÍODO COMPRENDIDO ENTRE 2008-2012.	55
SUJETOS DE ESTUDIO	55
MÉTODO	55
Justificación del método.	55
Descripción de la muestra	55
Descripción de las variables de estudio:	55
2. ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS PRONÓSTICO: CLÍNICOS, MORFOLÓGICOS E INMUNOHISTOQUÍMICOS EN CARCINOMAS MAMARIOS CANINOS DURANTE EL PERIODO COMPRENDIDO ENTRE 2008 Y 2012.	57
SUJETOS DE ESTUDIO	57
MÉTODO	57
Justificación del método	57
Criterios de inclusión de pacientes en el estudio.	58
Descripción de la muestra.	58
Descripción de las variables de estudio.	63
Análisis estadístico	68
IV. RESULTADOS	69
1. ANÁLISIS DE LA PATOLOGÍA ONCOLÓGICA DE LA GLÁNDULA MAMARIA EN HEMBRAS DE LA ESPECIE CANINA EN EL PERIODO COMPRENDIDO ENTRE 2008-2012.	69
ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LAS VARIABLES	69
A- GRUPO I:	69
B- GRUPO II:	71
C- GRUPO III:	73
D. GRUPO IV:	76
PERFILES GENERALES DE LAS MUESTRAS	77
A. GRUPO I:	77
B. GRUPO II:	77
C. GRUPO III:	78
D. GRUPO IV:	78
COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS	78

2. ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS PRONÓSTICO: CLÍNICOS, MORFOLÓGICOS E INMUNOHISTOQUÍMICOS EN CARCINOMAS MAMARIOS CANINOS DURANTE EL PERIODO COMPRENDIDO ENTRE 2008 Y 2012.	80
ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LAS VARIABLES	80
PERFIL GENERAL DE LA MUESTRA	99
COMPARACIÓN ENTRE VARIABLES	101
ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA	106
V. DISCUSIÓN	107
1. ANÁLISIS DE LA PATOLOGÍA ONCOLÓGICA DE LA GLÁNDULA MAMARIA EN HEMBRAS DE LA ESPECIE CANINA EN EL PERIODO COMPRENDIDO ENTRE 2008-2012.	107
2. ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS PRONÓSTICO: CLÍNICOS, MORFOLÓGICOS E INMUNOHISTOQUÍMICOS EN CARCINOMAS MAMARIOS CANINOS DURANTE EL PERIODO COMPRENDIDO ENTRE 2008 Y 2012.	109
VI. CONCLUSIONES	117
VII. RESUMEN	119
VII. SUMMARY	121
VIII. BIBLIOGRAFÍA	123
IX. ANEXOS	147

I. Introducción

La incidencia del cáncer ha aumentado en la población considerablemente durante los últimos tiempos siguiendo una tendencia a aumentar en los próximos años, siendo una enfermedad grave que puede conducir a la muerte del individuo afectado, sea de la especie humana o de cualquier otra especie animal, como la especie canina [1]. Pese a la gravedad de este proceso y a los múltiples estudios realizados, la investigación médica actual sigue viéndose dificultada por la compleja biología de dicha enfermedad. Aunque los modelos de cáncer en ratones están altamente estandarizados y han contribuido enormemente al conocimiento de los mecanismos de esta enfermedad y de su tratamiento, estos suelen estar limitados a aspectos muy específicos del cáncer humano espontáneo como el período de latencia, de recurrencia y de metástasis [2, 3]. Sin embargo, el estudio de las neoplasias en animales de compañía no sólo ofrece datos útiles sobre la epidemiología de los individuos afectados, sino que también aporta información beneficiosa en la investigación sobre la epidemiología, la patogenia y la terapéutica comparadas, ya que estos animales tienen una esperanza de vida que permite desarrollar tumores parecidos a los diagnosticados en la especie humana tanto a nivel morfológico como de comportamiento biológico [4]. La especie canina, en particular, comparte mayor proporción de su genoma con el hombre que los roedores [1].

Así, la aparición de tumores mamarios espontáneos en la especie canina ha sido estudiada por numerosas vías para proporcionar un modelo adecuado para el cáncer mamario humano [5].

Las neoplasias de la glándula mamaria son una de las neoplasias más comunes en las hembras de la especie canina [6] y son muy

similares a aquellas que se producen en humanos aunque su incidencia es tres veces mayor [6, 7]. Diariamente los clínicos veterinarios valoran numerosas pacientes con esta patología mamaria, intentando determinar su estadio clínico, así como conocer aquellos factores que permiten establecer un pronóstico inicial y un adecuado tratamiento [8]. El tratamiento de elección es el quirúrgico, a excepción de las pacientes con carcinoma inflamatorio o con metástasis distantes [9]. La predicción del comportamiento postquirúrgico de la enfermedad de la paciente resulta claramente necesaria, para ello se emplean diversos parámetros clínicos y patológicos que establecen la probabilidad de aparición de recidivas y/o metástasis [8]. Entre los factores clínicos que proporcionan información acerca de esta patología se debe considerar la influencia del factor raza y tamaño del animal, apreciándose mayor supervivencia en aquellas pacientes de pequeño tamaño [10]. Una edad avanzada también se asocia con un período libre de enfermedad y una supervivencia más cortas [11, 12]. Pero sin duda, los principales factores pronósticos clínicos que permiten establecer con mayor seguridad un pronóstico adverso son, un estadio avanzado en la clasificación TNM [13, 14], un tipo de crecimiento invasivo y rápido, así como la presencia de ulceración en la piel [8].

Los parámetros morfológicos de utilidad pronóstica recomendados son la clasificación histológica de las neoplasias mamarias, describiéndose los sarcomas como los de peor pronóstico [15-17] y los carcinomas simples presentan una menor tasa de supervivencia que los complejos [16]. El grado de diferenciación tumoral ha demostrado ser importante en el pronóstico de la enfermedad, siendo el riesgo de recidivas, de metástasis y de muertes

2 Introducción

vinculadas con estos tumores ostensiblemente mayores en pacientes con lesiones con un alto grado de malignidad en comparación con aquellas pacientes con neoplasias de grado bajo o intermedio [16]. La invasión peritumoral y linfática [18, 19], así como la presencia de grandes áreas de necrosis son parámetros a considerar, los cuales se asocian con un mal pronóstico del proceso [19, 20]. Por el contrario, la presencia de infiltrado inflamatorio en la neoplasia se considera una evidencia de actividad inmune contra el crecimiento del proceso tumoral [21, 22].

Al igual que en el cáncer de mama de la mujer, el empleo de marcadores tumorales inmunohistoquímicos en medicina veterinaria tiene un gran interés pronóstico. Así, una alta expresión de receptores de estrógenos se asocia con un mejor pronóstico, mientras que la pérdida de estos receptores y de los de progesterona se relaciona con una progresión desfavorable de la enfermedad [23, 24]. Determinar el estado de estos receptores es así mismo beneficioso para identificar aquellas pacientes que pueden responder a la terapia antiestrogénica [25]. Altos niveles de expresión de la enzima ciclooxigenasa-2 se asocia con un mal pronóstico para la paciente, correlacionándose con características clínicas de malignidad [26, 27]. La sobreexpresión de c-erbB-2 se describe en los procesos mamarios malignos, estableciéndose una correlación positiva entre dicha expresión y marcadores morfológicos como el índice mitótico y el grado de diferenciación nuclear [28], incluso se demuestra que pacientes con sobreexpresión de esta proteína desarrollan metástasis o mueren en un breve período de tiempo tras el tratamiento quirúrgico [29].

El gran valor de ErbB2 como un marcador predictivo radica en que las pacientes con cáncer mamario fuertemente positivos a ErbB2 muestran un beneficio clínico significativo de la terapia con trastuzumab o con el empleo de éste de modo combinado [30].

HIPÓTESIS

La hipótesis del trabajo es:

“La interacción de factores predictivos clínicos, morfológicos e inmunohistoquímicos determinan la evolución de la enfermedad neoplásica mamaria en la especie canina, siendo la ausencia de expresión de los receptores de estrógeno y progesterona y el aumento de expresión para c-erbB-2 y ciclooxigenasa-2 (COX-2) indicativos de un peor pronóstico para la paciente”.

OBJETIVOS

Los objetivos concretos del estudio son:

- 1- Correlacionar los diferentes factores pronósticos clínicos de la enfermedad con factores pronósticos morfológicos e inmunohistoquímicos.
- 2- Correlacionar los diferentes factores pronósticos clínicos, morfológicos e inmunohistoquímicos con el período libre de enfermedad y la supervivencia total.
- 3- Correlacionar los diferentes factores pronósticos inmunohistoquímicos entre sí.
- 4- Evaluar los parámetros elegidos en la evolución del paciente.

II. Revisión Bibliográfica

1. GENERALIDADES DE LOS TUMORES MAMARIOS EN LA ESPECIE CANINA

1. PREVALENCIA DE LOS TUMORES MAMARIOS CANINOS

El cáncer es una importante enfermedad en la especie canina, representando una de las causas más importantes de muerte, contabilizando un 27% de todas las muertes en perros de razas puras según un estudio de mortalidad llevado a cabo en el Reino Unido en el año 2010 [30].

El cáncer mamario es la neoplasia maligna más común en las hembras de la especie canina [9, 31, 32]. El sistema de registro del cáncer en animales de compañía es mucho más reciente que el desarrollado en la especie humana, comenzando alrededor de los años 60 con estudios de población en California [31], hasta llegar a los años 90 con dos estudios de grandes poblaciones en los que se obtuvieron los siguientes resultados: en el primer estudio, en el cual se analiza una población definida de 130.684 perros en el Reino Unido, aparecía una incidencia de 205 tumores mamarios por 100.000 perros y año, incluyendo a machos y hembras [33]; en el siguiente estudio, realizado en Suecia entre 1995 y 2002, con una población de más de 80.000 hembras de la especie canina, se observa que la incidencia de esta neoplasia en perras entre 3 y 10 años de edad de numerosas razas es de 111 por 10.000 animales en riesgo [7].

En el estudio llevado a cabo en Italia sobre la incidencia del cáncer en perros, se comprueba que la neoplasia mamaria es el tipo de cáncer más común en la hembra canina, correspondiendo al 70,5% del total de casos oncológicos registrados [34]. Posteriormente, se ha realizado en Suiza

un registro del cáncer canino que recopila datos desde 1955 a 2008, y en el que se ha obtenido una incidencia de cáncer en el 51,83% del total de pacientes analizados, sin embargo, en este estudio la localización mayoritaria fue la piel (32,29%), seguida en segundo lugar de la glándula mamaria (20,53%) y en tercer lugar de los tejidos blandos (11,90%) [35].

1. FACTORES DE RIESGO EN EL CÁNCER MAMARIO DE LA ESPECIE CANINA

La edad media de aparición de las neoplasias mamarias oscila entre los 10 y 11 años [7, 9]; clasificándose como raros los desarrollados antes de los 2 años de edad [36]. En general, se considera que la incidencia de estos tumores aumenta lentamente después de los 4 años de edad, incrementándose notablemente entre los 6 y los 10 años, edad en la cual alcanzan un pico en su presentación seguido de un marcado descenso [7, 20]. Por otra parte, Sorenmo K.U. y col. (2009) establecen la existencia de diferencias entre la edad de aparición de los tumores mamarios benignos y los malignos. En su estudio las pacientes con tumores benignos tienen una edad media de 8,5 años, mientras que aquellas que presentan tumores malignos tienen una edad más avanzada, concretamente una edad media de 9,5 años [37].

En otro estudio realizado por Sonnenschein E.G. y col. [38], en el que se analiza la relación entre la edad de aparición de los tumores de la glándula mamaria y la raza de los individuos afectados, así como la relación entre la edad y la condición corporal de dichos individuos, se comprueba que los individuos de razas puras de gran tamaño son significativamente

más jóvenes que el resto de los animales valorados en el momento del diagnóstico de las neoplasias mamarias, mientras que los mestizos se encuentran afectados con una edad más avanzada que aquellos de razas puras [38].

Existen numerosos análisis en los que se valora la predisposición de distintas razas a padecer neoplasias de mama, describiéndose una mayor incidencia en las razas de caza (Pointer, Setter, Spaniel breton y Labrador retriever) en comparación con la presentación de estos tumores en razas como el Chihuahua y el Bóxer [8]. Por el contrario, Moe L. (2001) encuentra un mayor riesgo de padecer tumores mamarios en Bóxer, Cocker spaniel, English springer spaniels y Teckel. Mientras que hay otros autores que consideran que la raza pura más afectada por los tumores malignos es el Pastor alemán [39, 40]. Otros autores proponen al Caniche como raza más predispuesta a padecer este tipo de neoplasias [9]. Todas estas observaciones sugieren la existencia de un componente genético en este tipo de neoplasia, a pesar de que no se ha identificado ninguna mutación genética común en perros con tumores mamarios [9, 41].

Varios trabajos muestran una mayor incidencia de neoplasias mamarias en perros de raza pura que en los mestizos [8, 39, 42], mientras que en otras investigaciones son los mestizos los que están más predispuestos, diagnosticándose un mayor número de casos de carcinoma en dichos animales [43]. Por el contrario, es el Pastor alemán el más afectado por los tumores mixtos benignos y los tumores mixtos malignos [44]. También existen estudios en los que no se ha documentado la predisposición racial en este tipo de patología [45, 46].

En una investigación de Itoh T. y col. (2005) se sugiere que la incidencia de malignidad histológica y biológica en tumores de la glándula mamaria es más baja en razas pequeñas, con un porcentaje de presentación del 25% frente al 58% apreciado en razas grandes [10].

Factores de Riesgo Hormonales:

El proceso de carcinogénesis en los tumores mamarios se corresponde con una secuencia de

transformaciones de tipo químico, siendo los factores etiológicos de mayor importancia los de tipo hormonal, destacando el papel fundamental de las hormonas ováricas [42].

Las hormonas esteroideas, estradiol y progesterona, cumplen un papel fundamental en el desarrollo de la glándula mamaria normal, ya que estimulan el crecimiento ductal y desarrollo lobuloadveolar [47], por lo que si se produce un descontrol en la secreción hormonal se pierde la homeostasis celular, generándose alteraciones potenciales, entre las que se encuentra la carcinogénesis [48]. Estas hormonas se consideran, por tanto, como principales factores de riesgo de esta enfermedad en la especie canina [26]. Por ello, las hembras se encuentran protegidas contra el desarrollo de este tipo de neoplasias mediante la ovariectomía practicada al año de edad, con una protección casi completa si dicha técnica quirúrgica se realiza antes de la aparición del primer estro, con un riesgo que oscila entre el 0,01% [38], el 0,05% [36] e incluso el 0,5% [42] según el criterio de otros autores.

El riesgo de padecer tumores de mama, comparado con el que tienen hembras enteras, es alrededor de 10 veces menor en las hembras que se han castrado más tarde, pero antes de los 2 años de edad [20]; ya que si la ovariectomía se realiza después del segundo celo el riesgo se reduce a un 26%, mientras que si se lleva a cabo después de los dos años y medio este riesgo apenas disminuye [42]. Para Rutteman G.R. (1990), la práctica de una castración tardía todavía reduce el riesgo de aparición de tumores benignos, pero probablemente tiene un efecto muy ligero o nulo sobre los tumores malignos [49]. Sin embargo, en un trabajo reciente de Beauvais J.M. y col. (2012) en el que se realizó una revisión sistemática de todos estos estudios establecieron que, debido a las limitadas evidencias disponibles y el riesgo de sesgo en los resultados publicados, la evidencia de que la castración reduce el riesgo de neoplasias mamarias y de que la edad en que se lleva a cabo dicha técnica quirúrgica tenga efecto sólo se sostiene débilmente, por lo que no se deberían establecer como base para recomendaciones

firmes [50].

Otro factor estudiado en relación con la tumorigénesis es el número de gestaciones. Se observa una mayor incidencia de neoplasias mamarias en perras nulíparas o con pocas camadas en comparación con las hembras que han tenido camadas numerosas [42] o que han sido empleadas de forma intensiva para la cría desde una temprana edad [36]. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en la especie humana, en la especie canina no se ha demostrado un efecto protector asociado a una preñez temprana [9]. Por otra parte, algunos autores han demostrado que otros factores como el desarrollo de celos irregulares, la edad del primer parto, la presencia de quistes foliculares, el cuerpo lúteo persistente, la hiperplasia endometrial o la pseudogestación no aumentan el riesgo de dichas neoplasias [36]. En el estudio retrospectivo en 267 hembras con tumores mamarios realizado por Veronesi, M.C. y col. (2003) no se aprecia ninguna influencia de la pseudogestación en el comienzo de la enfermedad [51]. Tampoco se han encontrado evidencias de que la lactancia sea un factor que altere significativamente dicho riesgo [36], al contrario de lo que ocurre en la especie humana, al disminuir aún más el número total de ciclos menstruales después de la gestación [52].

El rol que juegan las hormonas hipofisarias endógenas no está bien definido. Basándose en estudios morfológicos de la glándula pituitaria de individuos con tumores mamarios, en los que se relacionan los cambios en dicha glándula con los niveles serológicos hormonales, se sugiere que la hormona de crecimiento y la prolactina deben asociarse con la carcinogénesis mamaria en el perro [53]. Sin embargo, según otros estudios llevados a cabo en hembras con tumores mamarios, se observa que los niveles plasmáticos basales de hormona de crecimiento (GH) y prolactina no se encuentran elevados en comparación con los controles elegidos por edad en la misma fase del ciclo estral [49]. En contraste, la progesterona endógena en la fase luteal y los progestágenos inyectados son capaces de inducir la producción de GH en el epitelio mamario de los perros [54], por lo que algunos autores mantienen la hipótesis de que

la mayor secreción de hormona del crecimiento inducida en el tratamiento con progestágenos en la práctica veterinaria, ejerce un efecto directo en la carcinogénesis mamaria independientemente de la acción de la progesterona. Y, aunque se ha visto que los niveles en sangre de la hormona del crecimiento en perras con tumores espontáneos son similares a los de perras sanas [42], se ha observado que algunas neoplasias mamarias expresan el gen para GH, indicándose que, tras la transformación maligna, esta expresión puede llegar a ser independiente de los niveles de progesterona [54]. En cuanto al papel de la prolactina, esta hormona incrementa el riesgo de desarrollar cáncer mamario en función de la duración e intensidad de la exposición del epitelio mamario a esta hormona, ya que la prolactina facilitaría el papel mitogénico del estradiol al incrementar el número de receptores de dicha hormona [48]. Otros autores sugieren, por el contrario, que la prolactina junto con varios esteroides (estradiol, progesterona, testosterona, androstenediona) promueven el neocrecimiento tumoral mediante un mecanismo autocrino/paracrino, dado que el tejido mamario neoplásico podría ser una fuente de estas hormonas [55].

Factores de Riesgo Genéticos:

Durante el desarrollo y progresión de los tumores las alteraciones de mayor importancia se producen en la estructura y función de los genes, entre las que destacan dos, la primera de ellas es la formación de oncogenes activados y la segunda implica la pérdida o inactivación del gen supresor del tumor, que normalmente mantiene la división de la célula o la senescencia celular bajo control [36].

En el primer tipo de alteración uno de los mecanismos que se produce es la amplificación y sobreexpresión de genes de la familia de proteínas-quinasa [36]. Estos genes controlan el crecimiento celular mediante la fosforilación de los residuos tirosina o serina/treonina en las proteínas. La sobreexpresión de varios de estos genes proteína-quinasa, incluyendo al oncogen c-erbB-2, está asociada con el desarrollo del cáncer de mama en la especie humana ya que el producto de este gen es parte del mecanismo

celular asociado con la transformación celular [56]. Cambios estructurales en estos genes y proteínas conducen a un incremento de la actividad quinasa que puede tener profundos efectos en las señales de transducción [9]. La sobreexpresión o amplificación de c-erbB-2 ha sido descrita en aproximadamente el 75% de los pacientes de cáncer mamario de la especie humana con metástasis, encontrando una fuerte correlación con un breve plazo de tiempo hasta la recidiva, un breve plazo de tiempo de supervivencia y un pobre pronóstico [56].

La pérdida de la función de los genes que se produce en el segundo tipo de alteración puede incrementar la tumorigénesis [36]. El gen supresor p53 es el gen que muta más frecuentemente en el cáncer humano, habiéndose demostrado repetidamente una correlación directa entre la sobreexpresión de este gen y el grado histológico del cáncer mamario [57], utilizándose en la actualidad la detección inmunohistoquímica de este gen en carcinomas inflamatorios humanos como indicador pronóstico. En un estudio desarrollado Rungsipat A. y col. (2000) [58] se detecta que la inmunorreactividad de p53 se produce con una frecuencia del 16% en lesiones mamarias benignas y del 30,6% en tumores malignos, principalmente en adenocarcinomas en la especie canina; manteniéndose similares resultados a los encontrados en cáncer mamario humano. Se ha comprobado que la sobreexpresión de p53 ocurre en todos los estadios del cáncer mamario humano, y como p53 está directamente involucrado en importantes funciones celulares, incluyendo la regulación del ciclo celular, la alteración del gen p53 es un paso muy importante en el estudio de los tumores mamarios caninos [58].

Con el propósito de determinar el significado pronóstico de la mutación del gen p53 en pacientes caninos con carcinoma mamario, Wakui y col. (2001) realizan un trabajo en el que evalúan la presencia de este gen mutado a lo largo de la evolución de este tipo de tumores en 69 pacientes, determinando que su presencia estaba asociada al tamaño del tumor, pero no a la edad, ni al estadio, ni a la histología [59]. Con

los resultados estadísticos alcanzados, después de un seguimiento de 30 meses, los autores comprueban que la presencia del gen mutado junto con la variable tamaño tumoral se asocian a un incremento de las recidivas y de las muertes por carcinoma mamario, y de esta forma, al final del estudio el 50% de los pacientes con mutación del gen habían muerto. Los resultados de dicho estudio sugieren que la mutación del gen p53 es un indicador del aumento del potencial maligno y del peor pronóstico de los carcinomas mamarios caninos [59]. Rodo A. y col. (2008) han demostrado que un incremento en la malignidad de la neoplasia se correlaciona positivamente con el número de células que muestran expresión de p53 [60]. En otro estudio sobre carcinoma de mama en la especie canina en el que se realizan pruebas inmunohistoquímicas para la detección de mutaciones de este gen supresor, un 97% de los tumores analizados se consideraron positivos a la mutación de p53, encontrándose la mayor expresión en las neoplasias de perras de menor edad, carcinomas inflamatorios primarios y en tumores con infiltración en dermis de tipo sarcomatoso [61].

3. DIAGNÓSTICO DE LOS TUMORES MAMARIOS CANINOS

Los tumores mamarios se manifiestan clínicamente bien como masas únicas o, como ocurre en más de la mitad de los casos, como múltiples nódulos dentro de una misma glándula mamaria [9]. Estos nódulos se pueden desarrollar simultáneamente y pertenecer al mismo o a diferentes tipos morfológicos, presentando estructuras y comportamientos biológicos variables [9]. La multiplicidad suele ser menos común en hembras con una exposición a hormonas esteroideas limitada [9].

Los tumores pueden presentarse asociados al pezón o, más frecuentemente, vinculados al tejido glandular propiamente dicho [9].

Los individuos de la especie canina presentan cinco pares de glándulas mamarias y en todas ellas se pueden desarrollar tumores benignos y malignos; sin embargo, alrededor del 65 ó 70% de estos procesos se ubican en los pares

glandulares cuarto y quinto, relacionándose este hecho con un mayor volumen de tejido mamario a este nivel [9, 62].

Los tumores mamarios benignos, suelen ser de pequeño tamaño, están bien circunscritos y muestran una consistencia firme a la palpación [9, 63]. Por el contrario, los signos de malignidad de estas neoplasias incluyen un rápido crecimiento del proceso, presencia de bordes mal definidos, infiltración en piel o en tejidos subyacentes y tendencia a la ulceración e inflamación [9, 64]. La presencia de uno o más de estos signos incrementa la probabilidad de diagnóstico de malignidad, aunque un proceso maligno no se puede excluir en ausencia de dichos signos. Destacar que algunos tumores benignos pueden alcanzar también grandes tamaños como resultado de una larga evolución o en el caso de lesiones quísticas mostrar un rápido crecimiento sin representar necesariamente un signo de gravedad [36].

La valoración de todos los signos de malignidad señalados no debe suponer un problema diagnóstico para el clínico [15]. Sin embargo, muchos tumores mamarios cuando son detectados por primera vez no llegan en un estado avanzado de desarrollo, por lo que el comportamiento biológico que desarrollan en ese momento o el potencial (hiperplasia, proliferación benigna, transformación maligna) es difícil de predecir clínicamente [15].

Existen algunos factores pronósticos de las neoplasias mamarias malignas reconocidos y aceptados, tales como el tamaño del tumor, el estado de los ganglios linfáticos regionales, la presencia de metástasis distantes, el tipo histológico, el grado de malignidad histológica [9, 64]. Por todo esto, es necesario obtener un diagnóstico previo a la instauración de un tratamiento, que incluya el tipo de tumor e información sobre el pronóstico de este, pudiendo aumentar de esta manera las probabilidades de que dicho tratamiento sea el más adecuado [9, 64].

La citología es utilizada como una herramienta diagnóstica en veterinaria y los hallazgos alcanzados se correlacionan con el

diagnóstico histopatológico en muchos tipos de tumores [65, 66]. En medicina humana, la evaluación citológica prequirúrgica de los tumores mamarios sirve para determinar la malignidad del proceso y se considera un método rápido y mínimamente invasivo alternativo a la biopsia quirúrgica [67]; en muchos estudios, se han obtenido valores mayores al 95% de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico citológico de tumores mamarios al compararlos con la histopatología [68, 69]. En el perro, sin embargo, se han encontrado resultados citológicos menos favorables para los tumores mamarios que para otros tipos de tumores debido, en parte, a la heterogeneidad de estos procesos caninos, en los que la morfología es variable al valorar las diferentes áreas del tumor y a la presencia de necrosis o inflamación [65]. En contraste, en el trabajo de Simon y col. (2009) los hallazgos citológicos muestran una buena precisión, con un 93% de acierto en la diferenciación de tumores benignos respecto a los malignos, al compararlo con el diagnóstico histopatológico, y una precisión de un 81% en la determinación específica del tipo de tumor; obteniéndose, además una sensibilidad y especificidad relativamente alta (86% y 96% respectivamente), debido posiblemente a la toma de al menos cuatro muestras de diferentes partes del tumor [70]. En este mismo estudio también se asocia significativamente el diagnóstico citológico con la supervivencia postquirúrgica, duración del control tumoral y el intervalo libre de metástasis; por todo esto, se considera que la evaluación citológica prequirúrgica de los tumores mamarios puede proporcionar información pronóstica y diagnóstica y ayudar en la toma de decisiones clínicas, aunque sin representar un factor pronóstico independiente ya que sólo se realiza un análisis estadístico univariado [70].

Para la evaluación de metástasis en ganglios linfáticos regionales la citología de un aspirado con aguja es habitualmente suficiente, siendo el examen histológico de las biopsias de los ganglios raramente necesario [36]. La metástasis a ganglios linfáticos regionales puede afectar al ganglio linfático accesorio axilar si el tumor

primario está situado en los tres primeros pares de glándulas mamarias y, a veces, también cuando afecta al cuarto par. Los tumores desarrollados en el tercer, cuarto y quinto par, y ocasionalmente en el segundo, se pueden diseminar hacia el ganglio inguinal superficial [36]. La presencia de una mayor extensión regional del proceso tumoral significa un alto riesgo de presencia de metástasis distantes. Sin embargo, se puede producir una extensión hematógena sin signos de haber involucrado a ganglios linfáticos regionales [36].

Patsikas M.N. y col. han realizado varios estudios investigando el drenaje linfático de las glándulas mamarias normales y neoplásicas en la perra; sus hallazgos se muestran en la Tabla 1 y son útiles para determinar que ganglios linfáticos deberían ser evaluados para comprobar la diseminación metastásica en caso de sospecha de un carcinoma mamario [71-73]. Se describe por convención, que las neoplasias epiteliales malignas (carcinomas) metastatizan vía linfática mientras que las neoplasias mesenquimales malignas (sarcomas) lo hacen por los capilares y las venas.

El estudio linfoescintigráfico llevado a cabo por Pereira C.T. y col. (2008) muestra que en el 60% de los perros, las glándulas mamarias torácicas craneales drenan hacia los ganglios linfáticos esternales y hacia los axilares [74]. En este mismo trabajo se evidencia que cuando las glándulas mamarias torácicas están afectadas por neoplasias, los ganglios linfáticos superficial cervical o torácico ventral se encuentran involucrados. En cuanto a las glándulas mamarias abdominales estas drenan hacia los ganglios linfáticos axilar, inguinofemoral y poplíteo, mientras que la glándula mamaria inguinal puede drenar también hacia el ganglio poplíteo [74].

Los posibles lugares para el desarrollo de metástasis distantes incluyen los ganglios linfáticos distantes (preescapular, esternal e inguinal profundo), los pulmones, así como otros órganos internos [9, 20, 36, 75]. Radiográficamente las imágenes de las metástasis pulmonares son variables, pudiendo corresponder a nódulos bien definidos, nódulos pobremente delimitados o a efusiones pleurales sin evidencias de lesiones pulmonares; para su

Tabla 1: Drenaje linfático de la glándula mamaria normal y neoplásica en la perra.

GLÁNDULA MAMARIA	DRENAJE LINFÁTICO NORMAL (1996)	DRENAJE LINFÁTICO EN NEOPLASIAS (2006)
Glándula mamaria 1 (torácica craneal)	GL axilar	GL axilar y esternal
Glándula mamaria 2 (torácica caudal)	GL axilar	GL axilar y esternal
Glándula mamaria 3 (abdominal craneal)	GL axilar e inguinal superficial	GL axilar, inguinal superficial e ilíaco medial
Glándula mamaria 4 (abdominal caudal)	GL inguinal superficial	GL inguinal superficial y axilar
Glándula mamaria 5 (inguinal)	GL inguinal superficial	GL inguinal superficial, poplíteo y vasos linfáticos de la zona medial del muslo

Patsikas M.N. y col (1996); Patsikas M.N. y col. (2006). GL= Ganglio linfático.

visualización se recomienda la realización de al menos tres proyecciones, dos de ellas laterales y una tercera en decúbito dorsal o esternal [75, 76]. El uso de otras técnicas de diagnóstico por imagen, como la tomografía computerizada, se considera de gran utilidad, ya que muestran una mayor sensibilidad que la radiología convencional y permite una mejor orientación hacia un pronóstico [75]. El aumento de los ganglios ilíacos profundos puede ser observado mediante radiografía o ultrasonografía del área pélvica e indica la presencia de una posible metástasis [36]. La metástasis pulmonar se suele desarrollar antes que en otros órganos internos, por este motivo, en muy raras ocasiones, el examen ecográfico de órganos como el hígado, los riñones o el bazo puede mostrar metástasis antes de que la radiografía torácica evidencie diseminación en pulmón [9, 20, 36].

La biopsia incisional preoperatoria y la excisional postoperatoria seguida del examen histopatológico son los mejores métodos para determinar el diagnóstico, incluyendo el tipo de tumor y el pronóstico. En la biopsia excisional se pueden evaluar los márgenes del tumor. Los tumores mamarios malignos frecuentemente tienen algún grado de crecimiento infiltrativo/destructivo hacia tejidos adyacentes y/o invasivo en vasos, siendo la observación de estos tipos de crecimiento uno de los mejores criterios de comportamiento maligno [20, 36]. Los tumores mamarios benignos por el contrario no presentan un crecimiento invasivo o destructivo y están a menudo encapsulados. También se debe considerar el grado de necrosis como un factor pronóstico, ya que esta se aprecia más frecuentemente en procesos malignos [20]. Por lo tanto, es el análisis histopatológico de todo el tumor, después de su resección quirúrgica, el que proporciona al clínico información sobre el tipo de tumor y el tipo de crecimiento desarrollado por este, permitiendo comprobar si ha habido una exéresis completa del mismo. El tipo de crecimiento (intraductal, infiltrativo, o invasivo de vasos) está fuertemente correlacionado con la probabilidad de que la escisión sea completa o no, y ambos factores son muy importantes

con respecto al riesgo de recurrencia local y de metástasis distantes [36]. La velocidad de crecimiento tumoral, a pesar de que parece estar vinculada con un pronóstico adverso, se considera un parámetro muy poco fiable, ya que se basa en muchas ocasiones en un criterio personal, en donde interviene la memoria del propietario y el momento en que éste detectó el tumor [76].

En cuanto a la incidencia de tumores mamarios malignos frente a los tumores considerados histológicamente como benignos, diversos autores señalan que entre el 41% y el 53% del conjunto de todos los tumores mamarios son malignos [77, 78]. Porcentajes inferiores son los descritos por Misdorff W. (2002), el cual estima que aproximadamente el 30% de todos los tumores mamarios resecados quirúrgicamente muestran un comportamiento maligno [20].

Aunque la Organización Mundial de la Salud [9, 16, 64] proporcionó un sistema de clasificación histológica que pudiera ser útil para alcanzar un pronóstico, este catálogo ha sido posteriormente modificado por Goldschmidt M. y col. en el año 2010, proponiendo la clasificación histológica y la nomenclatura de las neoplasias y de las displasias de la glándula mamaria en la especie canina que se detalla a continuación en la Tabla 2 [19].

Sontasa B.H. y col. (2009) publicaron un trabajo en el que se mostró una elevada incidencia de tumores mamarios malignos (78,3%) entre los que destacaban el carcinoma simple con una representación del 28,3%, el carcinoma complejo con un 15,09%, el carcinoma mixto con un 15,06% y el carcinosarcoma con el 13,85% de representación [80]. Así mismo, observaron que del total de tumores benignos (12,27%), el 4,72% correspondía a tumores mixtos benignos, el 3,3% a adenomas y el 2,83% a fibroadenomas. Posteriormente, Shafiee R. y col. (2013) describieron en su estudio una incidencia del 87% de neoplasias malignas, de las cuales las de mayor frecuencia de aparición fueron el carcinoma complejo (33,3%), seguido del adenocarcinoma (20%) y el carcinoma simple (6,7%) [81].

Tabla 2: Clasificación histológica y nomenclatura de las neoplasias y displasias de la glándula mamaria en la especie canina.

1. NEOPLASIAS EPITELIALES MALIGNAS	4. CARCINOSARCOMA – TUMORES MAMARIOS MIXTOS MALIGNOS
<p>Carcinoma-in situ Carcinoma simple a) Tubular b) Tubulopapilar c) Quístico-papilar d) Cribiforme Carcinoma micropapilar invasivo Carcinoma sólido Comedocarcinoma Carcinoma anaplásico Carcinoma dentro de un adenoma complejo/tumor mixto (el componente benigno es detectable en la sección) Carcinoma de tipo complejo (el componente epitelial es maligno y el mioepitelial es benigno) Carcinoma y mioepitelioma maligno (ambos componentes, epitelial y mioepitelial, son malignos) Carcinoma de tipo mixto (el componente epitelial es maligno mientras que los componentes mesenquimales (células mioepiteliales, cartílago, hueso o tejido adiposo) son benignos) Carcinoma ductal Carcinoma papilar intraductal</p>	<p>Adenoma simple Adenoma papilar intraductal (Papiloma ductal (W. 2002)) Adenoma ductal (Adenoma basaloide (W. 2002)) Con diferenciación escamosa (gránulos queratohialinos) Fibroadenoma Mioepitelioma Adenoma complejo (Adenomioepitelioma) Tumor mixto benigno</p>
2. NEOPLASIAS EPITELIALES MALIGNAS – TIPOS ESPECIALES	6. HIPERPLASIAS/DISPLASIAS
<p>Carcinoma de células escamosas Carcinoma adenoescamoso Carcinoma mucinoso Carcinoma rico en lípidos (secretor) Carcinoma de células fusiformes Mioepitelioma maligno Carcinoma de células escamosas – variante de células fusiformes Carcinoma – variante de células fusiformes Carcinoma inflamatorio</p>	<p>Ectasia ductal Hiperplasia lobular (adenosis) Regular Con actividad secretora (lactacional) Con fibrosis-tejido conectivo interlobular fibroso Con atipia Epiteliosis Papilomatosis Cambio fibroadenomatoso Ginecomastia</p>
3. NEOPLASIAS MESENQUIMALES MALIGNAS - SARCOMAS	7. NEOPLASIAS DEL PEZÓN
<p>Osteosarcoma Condrosarcoma Fibrosarcoma Hemangiosarcoma Otros sarcomas</p>	<p>Adenoma Carcinoma Carcinoma con infiltración epidermal</p>
<p>Goldschmidt, M. y col. (2011).</p>	8. HIPERPLASIA/DISPLASIA DEL PEZÓN
	<p>Melanosis de la piel del pezón</p>

4. TRATAMIENTO DE LOS TUMORES MAMARIOS CANINOS

La cirugía sigue siendo el tratamiento de elección para todos los individuos con tumores mamarios, a excepción de aquellos con carcinoma inflamatorio o con presencia de metástasis distantes. El tipo de cirugía dependerá de la extensión de la enfermedad [9].

Los pros y los contras teóricos y prácticos de la escisión local han sido extensamente debatidos [82]. En un ensayo clínico con 144 perros, en el que se comparó la mastectomía simple (de la/s glándula/s afectada/s) con la mastectomía radical (de toda la cadena afectada), se pudo constatar que no existían diferencias en el tiempo de supervivencia ni en la recurrencia [83]. Los defensores de la mastectomía radical argumentan que éste es el mejor método para reseca todo el tumor (también el oculto) y que reduce el riesgo futuro de aparición de una nueva neoplasia mediante la disminución del volumen de tejido mamario [9]. Recientemente, Stratmann y col. (2008) han llevado a cabo un trabajo con un grupo de 99 hembras de la especie canina a las que se les realiza como único tratamiento la mastectomía regional (exéresis de más de una glándula mamaria), constatando que en el 58% de las pacientes se desarrolla un nuevo tumor en la misma cadena. Teniendo en cuenta estos resultados, los autores recomiendan una cirugía más radical como tratamiento inicial para prevenir la necesidad de posteriores cirugías [84].

Aquellos que se oponen a la resección rutinaria de toda la cadena mamaria argumentan que es una cirugía demasiado agresiva teniendo en cuenta que más del 50% de las neoplasias que se desarrollan en el tejido mamario son benignas, y que siempre existe la posibilidad de realizar cirugías posteriormente en aquellos individuos con un diagnóstico histológico de malignidad, especialmente si no existen evidencias de que los márgenes quirúrgicos estén libres de enfermedad. Además, la cirugía de toda la cadena mamaria afectada incrementa el tiempo y el coste del tratamiento [9]. MacEwan y col. (1985) muestran que no existen diferencias en

el tiempo de supervivencia ni en el tiempo libre de enfermedad en perros con tumores mamarios que han sido sometidos a mastectomía radical respecto a los que se les ha realizado una mastectomía simple [83]. También se debería destacar que, en la especie canina, no existen estudios que demuestren que con cirugías radicales se obtenga una mayor supervivencia que con mastectomías simples [83], sin embargo hay autores que siguen aconsejando la realización de cirugías más radicales para el tratamiento inicial de estos procesos [84].

La característica principal de la cirugía es eliminar todo el tumor, obteniendo márgenes quirúrgicos adecuados mediante el procedimiento más simple, pudiéndose utilizar diferentes procedimientos para las neoplasias de mama [9]. La elección del procedimiento más adecuado está determinada por el tamaño del tumor, su grado de infiltración en los tejidos adyacentes, el número de lesiones que presenta la paciente y la probabilidad de lograr una cura local [9].

Algunos animales, durante períodos de exposición a la progesterona, pueden presentar hiperplasias de pequeño tamaño que deben desaparecer al eliminar el estímulo hormonal, por lo que es importante tenerlo en cuenta antes de aplicar el tratamiento quirúrgico [36]. El resto de nódulos observados en el tejido mamario deben extirparse siempre y lo antes posible [36]. El tratamiento quirúrgico es curativo para los tumores benignos y, según las estadísticas, aproximadamente el 50% de los tumores malignos también se curan si la resección se realiza antes de que el tumor alcance un tamaño superior a los 3 cm [9, 85]. El otro 50% de los pacientes con tumores mamarios malignos presentan (micro)metástasis en el momento de la cirugía, lo que conducirá a la muerte del paciente [20].

En animales jóvenes con tumores mamarios malignos puede estar indicado realizar mastectomías radicales, eliminando las dos cadenas mamarias, dejando un período mínimo de 6 semanas entre una y otra resección, de manera que se pueda evitar así la aparición de nuevos tumores de mama [36].

Aproximadamente en el 10% de los perros, el drenaje linfático se desarrolla desde las dos glándulas mamarias craneales hacia la glándula mamaria abdominal caudal y ganglios linfáticos asociados o viceversa. Este factor podría justificar las recurrencias de nódulos distantes en hembras con tumores malignos tratados únicamente mediante mastectomía regional [36]. En general, existen unas recomendaciones quirúrgicas para la extirpación de los tumores mamarios caninos, según la localización del nódulo o nódulos, que se reflejan en la Tabla 3 [36].

En un reciente estudio de Horta, R.S. y col. (2015) en el que se comparan la mastectomía radical frente a la regional concluyen que en la mastectomía radical se produce un mayor estrés quirúrgico (tiempo de intervención más prolongado y mayor estímulo nociceptivo) y una mayor incidencia de complicaciones postoperatorias (edema en extremidad posterior, hematomas, enfisema subcutáneo, dehiscencia, contaminación de la incisión quirúrgica, sangrado y seroma) cuando la comparamos con la mastectomía regional [86]. Además, previamente estos autores habían concluido en otro trabajo que la técnica quirúrgica empleada no influía

en la supervivencia total ni en el intervalo de tiempo libre de enfermedad [87]. A tenor de estos resultados, los autores recomiendan que la elección de la técnica quirúrgica debe ser individualizada para cada paciente basándonos en el drenaje linfático de la/s glándula/s afectada/s, número y tamaño de las lesiones, y en los factores pronósticos establecidos, teniendo en cuenta la recuperación de la paciente y la calidad de vida de esta [86].

La realización de ovariectomía coadyuvante no ha demostrado aportar grandes beneficios en perras con cáncer mamario, lo cual se corresponde con el hecho de que la mayor parte de las metástasis no tienen receptores hormonales [9]. En el estudio llevado a cabo por Yamagami y col. (1996), en el que se intenta determinar la influencia de la ovariectomía en el pronóstico de los tumores mamarios caninos, se establece que dicha técnica no tiene efecto en el pronóstico si la paciente ya presenta un carcinoma mamario, ya que tras aplicar este tratamiento quirúrgico los autores no encuentran diferencias significativas en el rango de supervivencia entre aquellos animales a los que sólo se les realiza la mastectomía, aquellos que son ovariectomizados

Tabla 3: Guía para la exéresis de los tumores mamarios en la especie canina.

LOCALIZACIÓN DEL NÓDULO MAMARIO	TIPO DE CIRUGÍA
Glándulas mamarias craneal y/o torácica	Resección en bloque de la 1ª a la 3ª mama (o resección de toda la cadena). Exéresis del ganglio linfático axilar si hay certeza de invasión por parte del tumor o si existen sospechas de esta.
Glándula mamaria craneal abdominal (3ª)	Resección de la cadena mamaria completa, incluyendo el ganglio inguinal superficial.
Glándulas mamarias abdominal caudal (4ª) o inguinal (5ª)	Resección en bloque de las glándulas mamarias 3ª a 5ª, incluyendo el ganglio linfático inguinal superficial.
Múltiples nódulos en mamas no adyacentes	Resección de la cadena mamaria completa, incluyendo el ganglio linfático inguinal superficial.

Rutteman, G.R. y col. (2003).

antes de la mastectomía o aquellos a los que se les realiza una ovariectomía simultánea a la mastectomía [88]. Sin embargo, a pesar de que los tumores mamarios malignos pierden el control hormonal y, por lo tanto, no se van a ver influidos por la ovariectomía, sí se puede retrasar el crecimiento de tumores benignos, e incluso favorece la disminución del volumen de tejido mamario, lo que permitiría una detección más temprana de otros nuevos tumores en esta localización [9].

En medicina humana, la quimioterapia es el tratamiento de elección postquirúrgico en pacientes con tumores refractarios a la terapia hormonal por no tener éstos receptores hormonales [89]. La doxorubicina está considerada uno de los agentes más activos para pacientes con enfermedad avanzada y, en la especie canina, este fármaco ha demostrado tener eficacia contra líneas celulares de tumores mamarios *in vitro* [88]. La utilidad de la quimioterapia en la especie canina debe reservarse para aquellos que presentan grados de malignidad o factores pronósticos negativos, ya que responden mejor al tratamiento. La terapia estándar con quimioterápicos suele utilizar doxorubicina sola o combinada con otros agentes, como la ciclofosfamida o el 5-fluorouracilo [90]. El uso de la ciclofosfamida en combinación con el 5-fluorouracilo [91] o en combinación con mitoxantrona y vincristina [92] incrementan el tiempo medio de supervivencia, mientras que solo se observan moderados efectos secundarios.

La radioterapia rara vez se utiliza en el tratamiento de tumores mamarios caninos, pero puede usarse para ayudar al control local de la enfermedad en tumores no resecaos completamente o como tratamiento paliativo de los no resecaos o de carcinomas mamarios inflamatorios [89, 93].

En cuanto al tratamiento antiestrogénico, se ha demostrado su eficacia en el retraso de la evolución de la enfermedad en alrededor del 50% de los pacientes humanos con cánceres de mama positivos a receptores de estrógenos (ER) [36], pero al igual que con la ovariectomía, no va a producir un beneficio en tumores mamarios

malignos caninos por su falta de receptores, por lo que sólo se recomienda en aquellos casos en que haya sido posible realizar estudios inmunohistoquímicos de expresión de receptores hormonales [9].

Los antagonistas de la progesterona y los moduladores de los receptores de progesterona han sido investigados en el tratamiento del cáncer mamario en la mujer [94]. En oncología veterinaria, se ha realizado un trabajo con Aglepristone [95], un bloqueante de los receptores de progesterona, en el que se muestra que dicha sustancia puede disminuir la proliferación celular en carcinomas mamarios positivos a receptores de progesterona en la especie canina. Sin embargo, estos investigadores concluyen que se necesitan más estudios con un mayor número de pacientes y el análisis de su correlación con las variables clínicas antes de poder emplear este fármaco como tratamiento neoadyuvante en este tipo de tumores mamarios caninos [95].

Los inhibidores de la enzima Ciclooxygenasa-2 (COX-2) también han sido propuestos como estrategia terapéutica y preventiva en varios tipos de tumores en perros [27, 96-99]. El uso de estos inhibidores se describe también como parte del tratamiento en perras con carcinoma mamario inflamatorio [92, 100]. En el trabajo realizado por Souza, M. y col. (2009) en el que se tratan a pacientes diagnosticadas de carcinoma mamario inflamatorio sólo con piroxicam, los autores observan una mejora de la calidad de vida de estos animales, así como un incremento significativo de su supervivencia al comparar estos resultados con los obtenidos en pacientes tratadas con protocolos quimioterápicos (combinaciones con doxorubicina) [100].

5. FACTORES PRONÓSTICOS EN LOS TUMORES MAMARIOS CANINOS

Debido a la elevada incidencia y variabilidad de los tumores mamarios caninos, es importante para los clínicos conocer los factores que permiten establecer un pronóstico inicial y un adecuado tratamiento [8]. La predicción del comportamiento postquirúrgico es igualmente

necesaria, pudiéndose utilizar varios parámetros clínicos y patológicos para predecir la aparición potencial de recidivas y/o de metástasis [8].

Basándose en estudios uni- y multivariantes, se han establecido los siguientes factores pronóstico: tamaño tumoral, afectación de los ganglios linfáticos regionales, presencia de metástasis distantes, tipo histológico de la neoplasia, grado de malignidad de ésta, grado de invasión, diseminación intravascular, actividad de los receptores hormonales, fracción-S como medida de proliferación, aneuploidía y número de regiones organizadoras nucleolares visualizadas mediante tinción con plata (AgNOR) [13, 15, 78, 83, 101-104]. Los factores que no parecen estar asociados con el pronóstico son: la localización tumoral, el número de tumores presentes, el tipo de cirugía (mientras se lleve a cabo una adecuada resección quirúrgica) y la realización de la ovariectomía en el momento de la cirugía; respecto a la edad en el momento del diagnóstico todavía existe controversia [13, 15, 63, 83, 104, 105].

Factores clínicos y epidemiológicos

Dentro de los factores clínicos que nos proporcionan información acerca del pronóstico se ha estudiado la influencia de la raza en relación con el tamaño y el peso del paciente. En este sentido, Itoh T. y col. (2005) observan que las razas de pequeño tamaño que presentan tumores mamarios malignos muestran una supervivencia más larga. Dichas razas son también las que evidencian una incidencia más alta de tumores benignos [10]. Estas observaciones no son coincidentes con los resultados de un estudio anterior llevado a cabo también en perros con tumores mamarios malignos, en el cual no se llega a establecer una influencia de la raza y el peso en la supervivencia de las pacientes [105].

En cuanto a la edad en el momento del diagnóstico, algunos autores han asociado una avanzada edad a un período libre de enfermedad y una supervivencia más corta después del tratamiento quirúrgico [11, 12, 15, 106]. Varios de estos investigadores describen a la edad como un factor independiente y fuertemente

relacionado con un mal pronóstico en perras con tumores mamarios [12, 15]. En general, se considera que los perros más jóvenes tienen mayor probabilidad de presentar tumores benignos que los perros de edad más avanzada [37, 107, 108].

Según diversos estudios, las variables reproductivas, como la ovariectomía una vez que ya se ha desarrollado el tumor, el número de gestaciones y la edad en la que se produjo la primera de estas, las características del ciclo estral y la presentación de pseudogestaciones no afectan al pronóstico de los tumores de mama [15, 109, 110]. Sin embargo, otros autores describen que la presencia de ciclos estrales cortos y un número bajo de estos ciclos se relaciona con un período libre de enfermedad y una supervivencia más corta en análisis univariantes [11], mientras que en un análisis multivariante no se confirma dicha teoría [12].

Uno de los factores clínicos más importantes es el tamaño tumoral en el momento del diagnóstico. Aunque en el estudio de Yamagami T. y col. (1996) se aprecia, en general, que los tumores de mayor tamaño (categoría T3) son los que tienen un pronóstico clínico más desfavorable, los tumores de categoría T1 y T2 presentan un pronóstico similar [13]. En el trabajo de Sorenmo K.U. y col. (2009) se establece que los tumores mamarios malignos en la especie canina son significativamente de mayor tamaño que los tumores benignos [37]. En el análisis multivariante realizado por Chang y col. (2005) se determina que tanto el tamaño del tumor como el estadio se pueden considerar factores pronóstico, e incluso observan que las perras con tumores mayores de 5 cm tienen más probabilidades de desarrollar metástasis en ganglios linfáticos regionales [14].

La mayoría de los perros presentan más de un tumor en el momento que acuden al especialista para el diagnóstico, detectándose otros tumores adicionales si se palpan más cuidadosamente ambas cadenas mamarias [111]. Estos tumores son frecuentemente de diferentes tamaños y de diferente naturaleza histopatológica [111]. En un trabajo anterior, estos mismos autores

observan una progresión hacia la malignidad según aumenta el tamaño tumoral en aquellos perros con tumores múltiples sincrónicos [37]. Estos hallazgos refuerzan la teoría de que las neoplasias mamarias caninas se transforman a lo largo de un período prolongado de tiempo de benignos a malignos como una continuidad histológica donde los carcinomas son el estadio final del proceso [111].

Se han descrito dos parámetros clínicos asociados a un peor pronóstico en perras con tumores mamarios, los cuales corresponden a un crecimiento rápido e invasivo de la neoplasia y la aparición de ulceración de la piel [8]. Un crecimiento invasivo con fijación a la piel o a tejidos adyacentes (que debe ser confirmado mediante histología) ha sido utilizado como un parámetro objetivo indicador de un mal pronóstico [11, 12, 15, 104]. Sin embargo, la tasa de crecimiento es un parámetro subjetivo, ya que procede del testimonio que nos aporta el propietario, proporcionando menos información. La ulceración de la piel ha sido asociada a malignidad y se considera como un factor independiente fuertemente asociado a un mal pronóstico [11, 12, 15].

En cuanto al estadio tumoral, de acuerdo con el sistema de clasificación propuesto por la OMS (Organización Mundial de la Salud) este ha sido evaluado para ayudar a determinar el pronóstico de los tumores mamarios caninos. La determinación del estadio clínico de los tumores mamarios caninos es importante antes de llevar a cabo el tratamiento, y los rasgos distintivos de esta escala son:

- evaluación del tumor primario
- evaluación de los ganglios linfáticos regionales
- identificación de cualquier lugar de metástasis distantes (incluidos ganglios linfáticos distantes y pulmones) [9].

La clasificación TNM propuesta por la OMS [112] y modificada por Rutteman GR. y col. (2001) ha sido desarrollada para ayudar a la determinación del pronóstico del cáncer mamario (Tabla 4) [113]. La información TNM conduce a una división en cinco estadios clínicos, destacando la extensión del tumor local en los estadios del I al III, la presencia de metástasis en ganglios linfáticos regionales en el estadio IV y el desarrollo de metástasis distantes en el estadio V (Tabla 5).

Tabla 4: Clasificación TNM.

T: tamaño del tumor primario

T₁ <3 cm de diámetro máximo

T₂ 3-5 cm de diámetro máximo

T₃ >5 cm de diámetro máximo

N: estatus de los nódulos linfáticos regionales (ganglios axilar e inguinal)

N₀ no evidencia de metástasis (histológica o citológica).

N₁ evidencia de metástasis (histológica o citológica).

M: metástasis distantes

M₀ no evidencia de metástasis distantes

M₁ se detectan metástasis distantes

Rutteman, G.R. y col. (2001).

Tabla 5: Estadio tumoral.

GRUPOS DE ESTADÍOS			
I	T ₁	N ₀	M ₀
II	T ₂	N ₀	M ₀
III	T ₃	N ₀	M ₀
IV	cualquier T	N ₁	M ₀
V	cualquier T	cualquier N	M ₁

Rutteman, G.R. y col. (2001).

En el estudio de Yamagami T. y col. (1996) se evidencia que el rango de supervivencia de los animales con tumores que invaden los ganglios linfáticos regionales (categoría N1) es marcadamente más bajo (35,7%) que el 94% mostrado por aquellos animales que no exhiben invasión a los ganglios linfáticos [13]. En este mismo trabajo también se observa como la presencia de metástasis distantes acelera la muerte de los animales, siendo la supervivencia de las pacientes con categoría M0 (ausencia de metástasis distantes) del 92,4% frente al 13,6% de supervivencia de las pacientes con categoría M1 (metástasis distantes detectadas). Dichos autores concluyen que a mayor grado de estadiaje la supervivencia de los pacientes es menor [13].

En diversos estudios, se establece que la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos regionales está asociada con un pronóstico adverso, relacionándose éste con el tiempo de supervivencia o el período de tiempo antes de la recurrencia [36, 88]. Sin embargo, esto no significa que la cirugía no pueda ser beneficiosa en casos donde se detecta la expansión de la neoplasia hacia los ganglios linfáticos regionales. En muchos perros, la resección del tumor en bloque junto con los ganglios linfáticos afectados da como resultado, al menos, un control local e incluso una cura completa [36]. En el estudio de Yamagami y col. (1996) en el que se pretende obtener un pronóstico basándose en la clasificación TNM y en la clasificación histológica del proceso, se evidencia que en

general los tumores de mayor tamaño (categoría T3) son los que tienen un pronóstico clínico más desfavorable; el rango de supervivencia de los animales con tumores que invaden a ganglios linfáticos regionales (N1) es marcadamente más bajo (35,7%) que el 94,4% mostrado por los animales sin dicha invasión (N0) [88]. Como ya es sabido, las metástasis distantes aceleran el fallecimiento de los animales afectados (pacientes M0 con el 92,4% de supervivencia y pacientes M1 con el 13,6% de supervivencia). La relación entre el estadio de la clasificación TNM y el rango de supervivencia, muestra que a mayor grado de estadiaje, el pronóstico es peor; siendo el grado de supervivencia en el estadio V (cualquier T, cualquier N y M1), en el estadio IV (cualquier T, N1 y M0) y en el estadio I (T1, N0 y M0) respectivamente de 13,6%, 75,8% y 97,9% un año después de la mastectomía, y de 13,6%, 66,4% y 97,9% dos años después [88].

Factores patológicos

A lo largo de la historia de la investigación oncológica veterinaria se han establecido varios sistemas de clasificación histológica, como se ha comentado con anterioridad, que sirven como ayuda para predecir el comportamiento del tumor después del tratamiento quirúrgico [114]. Así, los sarcomas se describen como los tumores con peor pronóstico [15, 104] mientras que los carcinomas sólidos han mostrado tener una supervivencia menor que los carcinomas tubulares o papilares [106]. Los carcinomas

mixtos malignos y los de células escamosas se consideran igualmente tumores con un mal pronóstico, mientras que los tipos histológicos con mejor pronóstico son los adenocarcinomas (los de tipo complejo más que los simples) y los carcinomas in situ [15, 104].

En 1999, Misdorp W. y col. [115] publicaron una revisión sobre el significado pronóstico de las características tumorales. Desde entonces, se han publicado diversos artículos que correlacionan el tipo de tumor (clasificación histológica) con su grado y su pronóstico; la mayor parte de estos sistemas son una modificación del método de Ellston y Ellis [5, 16]. Así mismo, se ha venido utilizando un sistema de graduación histológica que cuantifica la anaplasia (pérdida de diferenciación), la formación tubular, la actividad mitótica y el pleomorfismo nuclear [20]. El conjunto de los valores individuales determina el grado histológico de malignidad, el cual posee valor pronóstico, pero no lo tiene el grado individual de anaplasia, de actividad mitótica ni de pleomorfismo [20]. Más recientemente, Peña L. y col. han propuesto una modificación de los criterios anteriormente señalados para medir el grado de malignidad histológica [5]. En las Tablas 6 y 7 se comparan las propuestas de ambos estudios.

En general, existen solamente diferencias sutiles entre los diferentes grados de clasificación y no se conoce como podría afectar a la evolución de las neoplasias mamarias, aunque este hecho debería ser más significativo en las neoplasias de grado II (neoplasias intermedias o moderadamente diferenciadas). Karayannopoulou M. y col. (2005) hallan diferencias significativas en la supervivencia de las pacientes con diferentes grados tumorales [16]; observando, en este estudio de supervivencia que comprende un período de 2 años tras el tratamiento quirúrgico, que ésta es menor en los carcinomas de grado III que en aquellos con un grado I o grado II; los pacientes con carcinomas simples muestran un peor pronóstico que aquellos con otro tipo de carcinomas, no habiendo diferencias significativas en la supervivencia entre los individuos de grado II y grado III, ambos con muy mal pronóstico.

Tanto a nivel histológico como inmunohistoquímico, se demuestra que los carcinomas mamarios se encuentran infiltrados por diferentes tipos de leucocitos, predominantemente macrófagos y linfocitos, principalmente células T [22]. Se ha postulado que la presencia del infiltrado inflamatorio en el tumor es una evidencia de actividad del sistema inmunitario contra el crecimiento neoplásico [21, 22]. Para entender la relación de la respuesta inmunitaria y el desarrollo tumoral, Estrela-Lima A. y col. (2010) realizan un trabajo con el fin de evaluar los hallazgos inmunofenotípicos del infiltrado linfocítico en los carcinomas mamarios en la perra y su relación con el pronóstico y la supervivencia [117]. En este estudio se evidencia que el porcentaje de linfocitos T, en general, es significativamente mayor en animales con carcinomas dentro de tumores mixtos benignos sin metástasis, sugiriendo un papel protector efectivo de estas células en el desarrollo tumoral; sin embargo, en los grupos con peor pronóstico (carcinomas y carcinomas en tumores mixtos benignos, ambos con metástasis en ganglios linfáticos regionales) se aprecia una gran infiltración de células T CD4+, la cual se asocia con la progresión tumoral, la metástasis y una escasa supervivencia de la paciente [117]. Se cree que esto puede ser debido a que mientras las células T CD8+ tienen un importante papel en el control del desarrollo del tumor, las células T CD4+ participan con una respuesta inmunitaria específica dividida hacia el tumor, controlando o induciendo la progresión tumoral según la producción de distintas citoquinas [118, 119]. Recientemente, Carvalho M.I. y col. (2015) muestran en un estudio sobre la expresión de linfocitos T CD3+ la existencia de fuertes evidencias que sugieren que los linfocitos T comparten vías comunes de señalización con el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en la progresión de los tumores mamarios y pueden contribuir al incremento de la angiogénesis, de la agresividad tumoral y en consecuencia a un peor pronóstico [120].

Como se ha comentado anteriormente, el papel que juegan las hormonas en el desarrollo de los tumores mamarios en la especie canina

Tabla 6: Criterios de malignidad histológica.

	FORMACIÓN TUBULAR	PLEOMORFISMO NUCLEAR	MITOSIS POR 10 HPF / HIPERCROMATISMO
1 punto			
Peña L.	Formación tubular > 75% de la muestra	Núcleos pequeños uni-formes o regulares y ocasionales nucléolos	0-9 mitosis / 10 HPF
Misdorp W.	Formación tubular bien marcada	Tinción y pleomorfismo nuclear leve	Ocasionales núcleos hiper Cromáticos o figuras mitóticas por HPF
2 puntos			
Peña L.	Moderada formación tubular (10-75% de la muestra) mezclada con áreas de crecimiento tumoral sólido	Moderado grado de variación en tamaño y forma nuclear, núcleos hiper Cromáticos y presencia de nucléolos algunos prominentes	10-19 mitosis / 10 HPF
Misdorp W.	Moderada formación tubular	Tinción y pleomorfismo nuclear moderado	2-3 núcleos hiper Cromáticos o figuras mitóticas por HPF
3 puntos			
Peña L.	Mínima o ninguna formación tubular (<10%)	Marcada variación en el tamaño nuclear y núcleos hiper Cromáticos frecuentemente con uno o más nucléolos prominentes	>20 mitosis / 10 HPF
Misdorp W.	Pocos o ningún túbulo	Tinción y pleomorfismo nuclear marcado	2-3 núcleos hiper Cromáticos o figuras mitóticas por HPF

Misdorp W. y col. (2002); Peña L. y col. (2010).

es fundamental; es por este motivo por lo que se ha intentado cuantificar su presencia en el tejido mamario y relacionarla con un posible valor pronóstico [9, 36].

Al igual que en el cáncer de mama de la mujer, donde un alto contenido de receptores de estrógenos se asocia con un mejor pronóstico, la pérdida de receptores de estrógenos (ER) y de progesterona (PR), en los carcinomas mamarios que inicialmente contienen estos receptores, se ha asociado con la disminución de la diferenciación celular y la progresión de la enfermedad en la especie canina [23]. Sartín E. y col. (1992) por su parte, concluyen que el estado de ER / PR parece ser un indicador pronóstico útil para los carcinomas mamarios en perros, además de poder ser beneficioso para identificar a aquellas pacientes que pueden responder a la terapia antiestrogénica [25]. En este estudio, se describe una evolución más favorable de los perros con tumores que contienen uno de estos receptores o ambos a la vez, independientemente del tamaño del tumor, diagnóstico histológico o evidencia de metástasis en ganglios linfáticos regionales en el momento del tratamiento quirúrgico; además, aquellas pacientes con tumores que solo contienen uno de los receptores presentan un rango de supervivencia intermedio entre las pacientes que desarrollan tumores con expresión de ambos receptores y las que desarrollan tumores con pérdida de ambos [25].

En cuanto al papel que desarrolla la COX-2, varios investigadores han hallado una asociación entre altos niveles de COX-2 y un pronóstico desfavorable en tumores mamarios en la especie canina, correlacionando los niveles de la enzima con determinadas características clínicas de malignidad como: el mayor tamaño tumoral, la ulceración de la piel, la adherencia a piel y a planos profundos y la capacidad para desarrollar metástasis a ganglios linfáticos regionales y/o a otras localizaciones distantes [121]. Así mismo, se ha demostrado una asociación entre la expresión de la enzima y el tipo histológico del tumor para los carcinomas mamarios caninos, en donde los tumores más pobremente diferenciados expresaban la enzima COX-2 con mayor intensidad y frecuencia que

aquellos tumores más diferenciados, como los adenocarcinomas [97, 122]. Estos resultados son similares a los obtenidos en estudios sobre el carcinoma mamario humano. Ristimaki y col. (2002) han descubierto que niveles elevados de expresión de COX-2 están asociados a tumores de tipo histológico más desdiferenciado y a una evolución más desfavorable de la paciente [123]. En dos estudios que se han llevado a cabo más recientemente, también se ha demostrado una relación significativa entre una expresión elevada de la enzima y el desarrollo de metástasis distantes, un peor pronóstico del proceso y un período de supervivencia más reducido [27, 99].

Por otra parte, mediante diversas metodologías, se puede proceder a la evaluación del estado de c-erbB-2 en la especie canina con fin pronóstico. Así, Martín de las Mulas J. y col. (2003) observan, en un estudio realizado mediante inmunohistoquímica, que el 17'6% de los tumores mamarios malignos sobreexpresan la proteína c-erbB-2. Dichos tumores, que presentan un tamaño superior a 3 cm de diámetro, están compuestos por células epiteliales atípicas con patrones de crecimiento sólido. Estas neoplasias exhiben un elevado grado histológico de malignidad, mostrando un crecimiento infiltrativo y ausencia de receptores de estrógenos y progesterona. Las pacientes con tumores positivos para c-erbB-2 desarrollan metástasis o mueren en un período de tiempo menor a 6 meses después del tratamiento quirúrgico [29]. Sin embargo, al realizar la hibridación cromogénica in situ (CISH), estos autores no encuentran diferencias en el número de copias del gen entre los casos estudiados con o sin expresión de la proteína (6 tumores malignos (+++) y (++) , 2 tumores benignos (-) y una muestra de tejido normal (-)), indicando que en dichos casos no se evidencia la amplificación del gen c-erbB-2 [29]. Los resultados de este trabajo demuestran que la sobreexpresión de la proteína sólo está presente en tumores mamarios malignos, ya que contrariamente a los descrito por otros autores [57], no se visualiza sobreexpresión en lesiones benignas; esta discrepancia probablemente se debe a diferencias en el método empleado para evaluar la presencia de dicha sobreexpresión

Tabla 7: Grado de malignidad histológica de las neoplasias mamarias.

PUNTUACIÓN FINAL	GRADO DE MALIGNIDAD
3 a 5	I (bajo)
Peña L.	Bien diferenciado
Misdorp W.	
6 a 7	II (intermedio)
Peña L.	Moderadamente diferenciado
Misdorp W.	
8 a 9	III (alto)
Peña L.	Pobremente diferenciado
Misdorp W.	

Misdorp W. y col. (2002); Peña L. y col. (2010).

(siendo el sistema de puntuación Herceptest el utilizado en este estudio de Martín de las Mulas J. y col.). En un trabajo posterior llevado a cabo por Dutra A.P. y col. (2004) [28] en donde se analizan 70 muestras de tumores mamarios pertenecientes a la especie canina, un 35,4% resultaron ser positivos a la sobreexpresión de la proteína c-erbB-2 mediante técnica inmunohistoquímica, con un 25,3% puntuado como (+++) y un 64,4% como (++); este rango difiere de los resultados obtenidos por Ahern T.E. y col. (1996) con un 74% de neoplasias de intensidad (+++) [124], y de los obtenidos por Rungsipat A. y col. (1999) con un 19,1% de la misma intensidad de tinción [57]. Esta discrepancia puede ser debida al bajo número de casos estudiados (23 pacientes en el primer caso y 47 en el último) y/o a los diferentes métodos usados para detectar la sobreexpresión de c-erbB-2. En cuanto a los resultados percibidos al analizar 22 tumores benignos, se comprueba que ninguno de ellos resulta positivo mediante técnica inmunohistoquímica [28]. En este mismo estudio los autores hallaron una correlación positiva entre la biología (expresión de c-erbB2) y la morfología (pleomorfismo nuclear, índice mitótico y grado histológico) de las neoplasias mamarias malignas en la especie canina,

resaltando que ambos parámetros (biología y morfología) en estos tumores malignos están estrechamente ligados [28], como sucede en el cáncer mamario humano.

El producto normal del gen p53 ha sido definido como un factor de transcripción nuclear con diversas funciones incluyendo la regulación del ciclo celular, el mantenimiento de la estabilidad genómica, la inducción de la apoptosis en células estresadas y la regulación de otros factores de transcripción; y su alteración se ha considerado como un paso crítico en el desarrollo de una amplia variedad de neoplasias humanas [125]. Este gen supresor p53 es el gen que muta más frecuentemente en el cáncer humano, habiéndose demostrado repetidamente una correlación directa entre la sobreexpresión de este gen y el grado histológico del cáncer mamario [57]. Con el propósito de determinar el significado pronóstico de la mutación del gen p53 en pacientes de la especie canina con carcinoma mamario, Wakui y col. (2001) [59] desarrollan un trabajo en el que se evalúa la mutación de este gen en 69 pacientes, determinando que la presencia de esta mutación, caracterizada por PCR, se correlaciona con el tamaño del tumor, pero no con la edad, ni con el estadio, ni con la histología de la neoplasia, así como

tampoco con la expresión de p53 determinada mediante inmunohistoquímica. Después de un seguimiento de 30 meses de estas pacientes, los autores comprueban que la presencia de la mutación genética junto con el tamaño tumoral se asocian a un incremento de las recidivas y muertes por el carcinoma, de manera que, al final del estudio el 50% de los pacientes con mutación del gen habían muerto. El estudio sugiere que la mutación del gen p53 es un indicador del aumento del potencial de malignidad y de un peor pronóstico en los carcinomas mamarios caninos [59]. En otro estudio sobre carcinoma de mama en la especie canina en el que se realizan pruebas inmunohistoquímicas para la detección de mutaciones de dicho gen supresor, los autores consideran que un 97% de los tumores analizados son positivos a la mutación de p53, encontrándose la mayor expresión en las neoplasias de perras de menor edad, en los carcinomas inflamatorios primarios y en los tumores con infiltración en dermis de tipo sarcomatoso [61].

Existen otras reacciones inmunohistoquímicas que detectan la presencia de antígenos expresados durante el ciclo celular, entre los cuales destaca el anticuerpo monoclonal Ki-67, que detecta un antígeno nuclear expresado en las células que entran en el ciclo celular (fases G1, S, G2 y mitosis) pero no cuando se encuentran en G0, por lo que este anticuerpo monoclonal permite la detección inmunohistoquímica de células que completan un ciclo y su expresión proporciona una medida directa de la fracción de crecimiento del tejido [17, 126, 127]. En un estudio reciente, en el que se ha establecido una relación directa entre el comportamiento biológico de las neoplasias mamarias y el diagnóstico histopatológico, también se ha podido estimar el índice mitótico de neoplasias mamarias en la especie canina, tanto de origen mesenquimal como epitelial, mediante la relación entre las células marcadas y las no marcadas con este antígeno, considerando que Ki-67 es una valiosa herramienta para establecer un pronóstico de la neoplasia [127]. Por su parte, Zuccari D.A. y col. (2004) consiguen índices de proliferación de Ki-67 significativamente más bajos en muestras citológicas de tumores benignos que en las de

tumores malignos, correlacionado positivamente un elevado índice de Ki-67 con el desarrollo de metástasis, bajo grado de supervivencia libre de enfermedad, muerte a causa de la propia neoplasia, y, en general, una baja supervivencia. Estos autores llegan a la conclusión de que el valor pronóstico del índice Ki-67 sobre muestras citológicas es similar al obtenido sobre muestras histológicas, proporcionando una mejora en la precisión y en el valor de la citología gracias a la obtención de una información rápida y segura sobre la malignidad del proceso y la evolución del paciente [128].

Una técnica considerada como un método válido en la emisión de un pronóstico para lesiones neoplásicas, debido a su capacidad para mostrar el estado de proliferación de las células tumorales, es la determinación de las regiones organizadoras de nucleolos argirofilicas (AgNOR) [17, 129]. Las regiones organizadoras de nucleolos son segmentos de los cromosomas que contienen genes ribosomales; dichos segmentos se hallan relacionados a proteínas ácidas no histónicas, evidenciables por medio de impregnación argéntica como puntos negros en las muestras cito e histopatológicas [129]. En algunos estudios se ha hallado correlación entre el tipo histopatológico, la determinación de AgNORs como factor pronóstico y la mortalidad del individuo afectado por la neoplasia mamaria dentro del año postquirúrgico [129-131]. Otros autores han resaltado su interés en la determinación de los bordes que limitan el tumor cuando hay infiltración local [130].

Las aberraciones cromosómicas que tienen lugar durante la tumorigénesis conducen a cambios en el contenido nuclear del ADN de las células tumorales, que pueden ser detectados mediante la citometría de flujo [132]. Esta técnica proporciona información sobre el contenido nuclear de ADN albergado en las células G0 y G1, así como sobre la proporción de células en fase S [126]. Un índice anormal de ADN define un tumor como aneuploide y se ha visto que está relacionado con variables clínicas e histológicas desfavorables y con un pronóstico adverso en el cáncer de mama humano [132]. Además, la aneuploidía en este

tipo de cáncer frecuentemente se relaciona con un incremento en la fase S y ha sido descrita como un factor pronóstico independiente y con un pronóstico adverso [15]. Se ha descubierto que el 50-60% de los tumores mamarios caninos poseen células tumorales con contenido anómalo de ADN; estos tumores eran aneuploides. También se ha comprobado que algunas lesiones proliferativas benignas contienen células tumorales aneuploides. Este hecho podría estar relacionado con la progresión hacia un estado de malignidad ocasionalmente observada a nivel histológico en lesiones benignas. En el trabajo de Pérez Alenza y col., (1995) los autores observan un índice de aneuploidía del 48% en tumores mamarios primarios en el perro, porcentaje similar al obtenido en otros estudios en la especie canina, pero más bajo que el 63% descrito para el cáncer mamario humano; por otra parte, la incidencia de aneuploidía en lesiones proliferativas mamarias benignas en el perro (14,3%) es marcadamente más elevado que en la especie humana [132].

La hipoploidía es probablemente un acontecimiento temprano en la tumorigénesis y es seguida durante la progresión del tumor por multiploidía y poliploidía. Se ha visto que en los tumores mamarios caninos, los carcinomas hipoploides, así como los tumores hiper- y multiploides, pueden causar la muerte al individuo. La citofotometría de ADN puede también permitir una estimación de la proporción de células en fase S del ciclo celular (fracción de fase S: SPF). La SPF es generalmente más elevada en tumores malignos que en lesiones benignas. En un estudio de Hellmén y col. (1993) se determina que una SPF elevada está asociada con un pronóstico adverso tras la cirugía de tumores mamarios en perros [15].

Otra medida relacionada que sirve para determinar la proliferación celular es el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), el cual es un cofactor de la ADN polimerasa- δ , sintetizada entre la fase G1 y en la fase S de la división celular y cuya expresión está estrechamente relacionada con dicha proliferación [133]. En diferentes análisis sobre tumores mamarios caninos se ha establecido

una relación entre las células PCNA positivas y el diagnóstico histopatológico de la lesión, mostrando las neoplasias malignas un índice de PCNA más elevado que la glándula mamaria normal, que la hiperplásica o que los tumores benignos [134, 135]. En el estudio desarrollado por Funakoshi Y. y col. (2000) al igual que ocurre con otros elaborados sobre el cáncer de mama en la mujer, el índice de PCNA no se correlaciona con hallazgos clínicos, como la metástasis o el tamaño tumoral [135].

2. EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y PROGESTERONA

1. INTRODUCCIÓN

El estrógeno y la progesterona juegan un papel muy importante en la patogénesis de los tumores mamarios canino [136, 137]. No se sabe con seguridad si las hormonas esteroideas causan mutaciones o si solamente aumentan la tumorigénesis mediante su efecto promotor del crecimiento, pero si se cree que actúan en un estado muy temprano del desarrollo tumoral con el incremento del número de células susceptibles [138]. Estas hormonas ováricas, estrógeno y progesterona, ejercen sus acciones en las células diana predominantemente a través de la unión y activación del ER y del receptor de PR [139].

Los receptores nucleares forman parte de una gran familia de factores de transcripción que pueden ser regulados por asociación con otras proteínas, por fosforilación o por unión a ciertos metabolitos celulares [140]. En la mayoría de los casos, la interacción con sus respectivos ligandos permite la unión del receptor al ADN, comportándose como activador o represor de la transcripción de genes [140].

Los receptores nucleares participan en diversos procesos biológicos, como diferenciación, crecimiento y homeostasis celular. La unión del complejo receptor esteroideo-hormona con el ADN puede hacerse directamente o a través de otras proteínas a las que se une el complejo receptor-hormona. En ambos casos hay proteínas asociadas al receptor que modulan (activan o inhiben) su unión al ADN [141].

Los ER y los PR están directamente involucrados en la proliferación celular, y la integridad funcional de los mismos es fundamental para la multiplicación, el crecimiento y la diferenciación normal de las células en los tejidos sensibles a las hormonas. La transformación celular y, consecuentemente, la adquisición del fenotipo neoplásico pueden deberse a distintas causas difíciles de precisar, pero también pueden deberse a la desregulación hormonal. Alteraciones en la estructura y función de los receptores esteroideos en los tejidos diana se encuentran entre los factores desencadenantes de las neoplasias [141].

2. TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE RECEPTORES HORMONALES

El análisis de las expresiones de receptor de estrógenos α (ER α) y PR ha llegado a ser aceptado como herramienta útil en el pronóstico y predicción de la respuesta a la terapia en el cáncer mamario humano [142]. Los métodos bioquímicos iniciales, como el carbón recubierto con dextrano, han sido reemplazados hace décadas por la inmunohistoquímica, la cual necesita menor cantidad de tejido y es más barata [141], además del hecho de que dicha técnica requería de tejido en fresco y los resultados positivos podían deberse a células adyacentes normales, incluidas en el tejido a procesar. Las primeras investigaciones realizadas en medicina veterinaria, con el fin de determinar la presencia de receptores hormonales en la especie canina, empleaban estos ensayos bioquímicos [23, 25, 143-148], siendo a partir de 1999 cuando se comienzan a realizar ensayos inmunohistoquímicos, aprovechando además que la mayoría de los tumores mamarios caninos se fijan en formalina previamente a la evaluación histológica [149]. La comparación entre los diferentes estudios, según utilicen un método u otro, es complicada por dos razones; primero, los métodos inmunohistoquímicos permiten garantizar que la sección de tejido contenga el tumor, evitando los falsos positivos debidos a receptores esteroideos en el tejido normal adyacente o atrapado en la lesión tumoral,

relacionando el contenido del receptor con la morfología celular, lo que permite conocer la heterogeneidad intratumoral, particularmente importante en los tumores mamarios caninos; segundo, existen grandes diferencias en la clasificación histológica utilizada en los primeros estudios, cuando se empleaban los métodos bioquímicos [150].

La detección inmunohistoquímica de ER α en tejidos congelados o en parafina es una técnica *in situ* más precisa; permite aplicar un método semicuantitativo con una correlación constante, tanto en la proporción de células positivas como en la intensidad de la positividad inmunohistoquímica considerada; de este modo es posible identificar la positividad y reconocer la heterogeneidad de estas células [141].

La determinación inmunohistoquímica de estos marcadores es de gran valor, pero es necesaria la estandarización de todos aquellos pasos para garantizar la calidad de la prueba, incluyendo la reproducibilidad técnica, uniformidad en la interpretación, cuantificación del valor real de las inmunoreacciones mediante el uso de un sistema de puntuación y la participación de un programa de valoración de calidad externo. La estandarización de las diluciones de anticuerpos monoclonales y la validación de los bloques de parafina son requerimientos básicos en el laboratorio [151].

Existen varios factores, pre-analíticos, analíticos y post-analíticos, que influyen en el resultado final de la prueba [151].

- Los factores pre-analíticos son aquellos que afectan a la generación de la muestra, incluyendo el tiempo que tarda en ser resecado en la cirugía, la isquemia consiguiente, el intervalo entre la resección quirúrgica y la fijación, el tipo de fijación, dimensiones del tejido, etc. [151].

- Los factores analíticos pertenecen a procedimientos laborales; un manual de procedimiento operativo estándar asegura la reproducibilidad, comparación y evaluación [151]. Para la realización de esta prueba habitualmente los investigadores utilizan la técnica estandarizada de la estreptavidina-biotina peroxidasa, con el uso de anticuerpos

monoclonales, mayoritariamente (de ratón) [24, 127, 137, 141, 149, 150, 152-162], o policlonales (de conejo) en algunos otros casos [137, 163].

- La evaluación post-analítica es una cuestión crucial de la inmunohistoquímica. La interpretación de la inmunotinción puede ser simplemente positiva o negativa si no se tiene en cuenta un patrón de tinción apropiado [151]. Las reacciones inmunohistoquímicas deben ser interpretadas no sólo en las células o la estructura buscada, sino que también deben revelar un correcto patrón de tinción (membranoso, citoplasmático, nuclear como el identificado para ER y PR); difuso, en puntos o perinuclear [151]. En un estudio de Latinga-van Leeuwen I.S. y col. (2000) [152], se visualizan diversos patrones de tinción en las muestras de tumores mamarios en la especie canina, así por ejemplo, en los adenomas simples bien diferenciados se aprecia una clara tinción nuclear en todas las células epiteliales, en otros tumores benignos de tipo simple o complejo hay una marcada tinción nuclear heterogénea, mientras que en los carcinomas algunos núcleos aparecen negativos, otros con tinción más heterogénea y en otros se encuentra una intensa tinción perinuclear, en vez de exclusivamente nuclear; además, en los tumores de tipo complejo el componente de células fusiformes frecuentemente muestra una tinción citoplasmática.

El número de células que muestra inmunorreactividad (porcentaje) y la intensidad de esta tinción (negativa, débil, moderada y fuerte) son las variables restantes. Sin embargo, también se debe tener en cuenta la relevancia de la utilización de controles positivos, así como controles negativos, para la comparación de las diferentes muestras; de esta forma tenemos que, en la mayoría de los trabajos, los distintos investigadores emplean en el primer caso tejido ovárico y/o uterino de la especie en la que se basa el estudio [24, 137, 141, 149, 150, 152, 156, 158, 160, 162], otros utilizan tejido mamario normal o hiperplásico [127, 156, 160] e incluso en estudios en la especie canina se han usado carcinomas mamarios humanos con una expresión de receptores de estrógenos y/o progesterona bien establecida [150, 153,

155], mientras que como controles negativos normalmente se suelen tratar las secciones de tejido con suero normal de la especie de la que proviene el anticuerpo primario empleado [137, 155, 162] o alguna solución, como PBS (solución tampón fosfato salina) [24, 127, 150, 158] o TBS (solución salina tamponada con Tris) [156, 157, 160] sustituyendo al anticuerpo primario.

Los sistemas de puntuación empleados para valorar la presencia de estos receptores en los diferentes tejidos se basan en una combinación de estas dos últimas variables (porcentaje de células positivas e intensidad de tinción) siendo necesarios para cuantificar los resultados [151]. Durante todos estos años, se han empleado diversos sistemas de puntuación convencionales, como el H-score y el Quick score, sin embargo recientemente se utilizan otros sistemas, como el Allred score, el cual disminuye el número de casos débilmente positivos, convirtiéndolos en casos moderada o fuertemente positivos, reforzado por sus valores altamente sensibles y específicos; se aporta de este modo una importante información a los clínicos con respecto a la positividad o no de los procesos neoplásicos de cara a recomendar el uso de una terapia hormonal [164].

En todos estos sistemas la intensidad de la tinción (observada como gránulos intranucleares de color marrón) en el núcleo de la célula se puntúa de 0 a 3, correspondiendo 0 a la ausencia de tinción, 1 a una tinción nuclear débil, 2 a una tinción moderada y, por último, 3 a una intensa inmunorreacción de los núcleos [151, 164].

En cuanto al porcentaje de células positivas, la proporción de núcleos tumorales se puntúa de diferente manera según el sistema, con lo que la puntuación final varía entre ellos. Tenemos así que en el sistema H-score existe una puntuación entre 0 y 300, donde 300 significa que el 100% de las células tumorales están teñidas fuertemente, aplicando previamente una fórmula cuantitativa $(P1 + [2 \times P2] + [3 \times P3])$, donde P1, P2 y P3 son los porcentajes estimados de núcleos positivos con baja (P1), media (P2) y alta (P3) intensidad [162, 165]. El sistema Quick score es más simple y puntúa de la siguiente manera: 0% = 0, 1-25%

de núcleos teñidos = 1, 26-50% de núcleos teñidos = 2, 51-75% de núcleos teñidos = 3, 76-100% de núcleos teñidos = 4; la intensidad fue evaluada semicuantitativamente de la siguiente manera: negativa (ausencia de tinción nuclear a cualquier aumento) = 0, débil (sólo visible a gran aumento) = 1, moderada (fácilmente visible a baja magnificación) = 2, fuerte (muy positivo a baja magnificación) = 3; posteriormente, la suma de la intensidad y el porcentaje de células teñidas nos proporciona un rango entre 0 y 7, donde 0 son los procesos negativos, de 1 a 5 son neoplasias moderadamente positivas y una puntuación de 6 o 7 es catalogada como fuertemente positiva [166]. Por otra parte, en el sistema Allred score se cuantifican 5 grupos (como figura en la Tabla 8) los grupos del 0 al 2 (1 - 10% de proporción de células positivas) se consideran negativos, y los grupos del 3 al 5 (10- > 66% de proporción de células positivas) son positivos; las puntuaciones obtenidas de los parámetros, proporción e intensidad, se suman para alcanzar una puntuación total, cuyo rango varía entre 0 y 8 [150, 164, 167-169].

A lo largo de los años en que se ha llevado a cabo investigación en medicina veterinaria, han sido diversos los sistemas utilizados por los diferentes autores para puntuar la inmunorreactividad de las distintas muestras analizadas en sus trabajos. En uno de estos primeros ensayos realizado por Graham y col. [149] en 1999, utilizando un método semicuantitativo, similar a otro sistema descrito en medicina humana [170], dividen la intensidad de la tinción en cuatro categorías: 0, 1, 2 y 3, en la que el 3 es la puntuación otorgada al control positivo (útero canino). Se cuantifica la proporción de células reactivas y se asigna una puntuación de 0 (no se aprecian núcleos teñidos), 1 (<10% de células reactivas), 2 (10-50% de células reactivas) ó 3 (>50% de células) (los tumores son considerados positivos si se observaba cualquier núcleo teñido, al compararlos con el control negativo; así mismo, 3 puntos se considera control positivo).

Por su parte, Nieto A. y col. (2000) [141] en un estudio para la determinación del ER α comparan dos sistemas de puntuación recogidos de la literatura de medicina humana. El primer sistema

Tabla 8: Guía para la interpretación de los resultados mediante el método de Allred.

PROPORCIÓN DE CÉLULAS POSITIVAS		INTENSIDAD	
Puntuación promedio (observación)	Proporción	Puntuación	Valoración
0	0	0	Negativa
1	< 1/100 (< 1%)	1	Débil
2	1/100 a 1/10 (1-10%)	2	Intermedia
3	1/10 a 1/3 (10-33%)	3	Fuerte
4	1/3 a 2/3 (33-66%)		
5	> 2/3 (> 66%)		
SUMA DE LAS PUNTUACIONES DE LA PROPORCIÓN Y DE LA INTENSIDAD			
0 – 2		Negativa	
3 – 8		Positiva	

Qureshi, A. y col. (2010).

de valoración de la intensidad corresponde al sistema ERp, el cual considera sólo el porcentaje de células positivas independientemente del grado de intensidad de la tinción, mientras que en el segundo sistema utilizado es el “H score” mediante la siguiente fórmula $ER_i = P1 + (2 \times P2) + (3 \times P3)$, donde P1, P2 y P3 son los porcentajes estimados de núcleos positivos con baja (P1), media (P2) y alta (P3) intensidad. En este estudio, los investigadores hallan una correlación altamente significativa entre ambos sistemas. Este último sistema de puntuación ha sido empleado también por otros autores en sus estudios en la especie canina [162].

En el año 2002, Sobczak-Filipiak M. y Malicka E. (2002) [153] realizan una investigación en la que evalúan de la inmunotinción del ER mediante la siguiente escala: (+++): la mayoría de las células del parénquima del tumor muestran una fuerte expresión para ER; (++): racimos de células en el parénquima muestran expresión para ER; (+): grupos menos numerosos y más pequeños de células del parénquima muestran expresión para este receptor; (+/-): se aprecian células solitarias que muestran expresión para ER.

Otros trabajos han utilizado un sistema más sencillo para evaluar la inmunorreactividad de las células, en los cuales consideran positivos para los ER y los PR, aquellas muestras que evidencian una inmunorreactividad positiva celular >10% de las células en 10 campos representativos [154, 156, 160]. Contrariamente, Martín de las Mulas J. y col. (2004, 2005) clasifican los datos obtenidos en varios trabajos puntuando la tinción mediante dos registros, la puntuación PS (proportion score) y la puntuación IS (intensity score), ambos registros se cuantifican de 0 a 3, consiguiendo un resultado final, el TS (total score), consistente en la suma de las dos puntuaciones anteriores obteniendo un rango de 0 a 6. En la puntuación PS se establecen 4 categorías que se distribuyen según la siguiente descripción: 0) <5% de células tumorales con tinción positiva; 1) 5-19% de células tumorales con tinción positiva; 2) 20-60% de células tumorales con tinción positiva; y 3) >60% de células tumorales positivas. La intensidad

de tinción es estimada mediante el promedio de la intensidad de las células tumorales positivas cuantificándose como 0= negativo, 1= débilmente teñido, 2= moderadamente teñido y 3= fuertemente teñido [137, 150].

Debemos destacar que existe una gran diversificación en el empleo de los sistemas de calificación, así mientras que algunos autores emplean el sistema Allred para la evaluación de sus muestras [24], otros utilizan el sistema “Quick score” [158] o el sistema “H score” [162] e incluso adaptaciones de alguno de ellos [161].

Una de las desventajas de la inmunohistoquímica para el estudio de los receptores de estrógenos es que todos los receptores demostrados pueden no ser funcionales por un defecto en la cascada funcional del ER α a nivel transcripcional, translacional y post-translacional [171]. Un método de estimación de la función de ER α es a través de la detección del PR, ya que la síntesis del PR se considera dependiente de la presencia de estradiol y de una función normal del ER α [172, 173].

Recientemente se ha publicado un consenso en el que se exponen las guías para la cuantificación inmunohistoquímica de los receptores de estrógenos y progesterona en los tumores mamarios en la especie canina [174], basadas en la guía recomendada por la Sociedad Americana de Oncología Clínica y el Colegio de Patólogos Americano (ASCO/CAP) para la valoración de los receptores de estrógenos y progesterona, con algunas variaciones específicas para la especie canina [175]. En dicha publicación se describe la evaluación de la inmunotinción como se indica en la Tabla 9 [174].

3. ANÁLISIS DE LAS LESIONES MAMARIAS

La presencia de los receptores hormonales de estrógeno y progesterona ha sido determinada mediante diferentes técnicas en los distintos tejidos mamarios en diversos trabajos. Los primeros estudios llevados a cabo, permitieron determinar la presencia de estos receptores mediante métodos bioquímicos. En uno de estos trabajos, realizado por MacEwen E.G. y col.

Tabla 9: Guía para la cuantificación inmunohistoquímica de los receptores de estrógenos y progesterona en los tumores mamarios en la especie canina.

PS = Porcentaje de células teñidas	
PS 0	Ausencia de tinción
PS 1	< 1% (< 1/100)
PS 2	1% – 10% (1/100 – 1/10)
PS 3	10% - 33% (1/10 – 1/3)
PS 4	33% - 66% (1/3 – 2/3)
PS 5	> 66% (> 2/3)
IS: Intensidad de la tinción	
0	Ausente
1	Débil
2	Moderada
3	Fuerte
Puntuación Allred: TS (Total score – Puntuación final)	
TS = PS + IS	0 y 2-8 (0 se considera negativo y la puntuación ≥ 2 se considera positivo)

Peña L. Y col. (2014). Las áreas del tumor a evaluar deben ser representativas del tipo histológico y el grado en al menos 10 HPF.

(1982) [143] los autores encuentran que, de las 67 perras analizadas, el 92,5% de las lesiones neoplásicas desarrolladas por estas pacientes son clasificadas como epiteliales, entre las que hay adenocarcinomas, adenomas y carcinomas “in situ”, y de éstas, el 61,3% resultan positivas para el ER, mientras que las 5 lesiones no epiteliales diagnosticadas son negativas a dicho receptor. Del 61,3% de positivos para el ER, son positivos el 52,3% son adenocarcinomas, el 87% carcinomas “in situ” y el 87% adenomas, frente al 47%, 13% y 13%, respectivamente, que resultan negativos. Estos investigadores demuestran que los tumores benignos, determinados en su estudio, representan el 24% de las lesiones neoplásicas epiteliales, de las que el 87% resultaron positivos para el ER, especulando que estos altos niveles pueden ser debidos a la mayor diferenciación de los tejidos; además, el hecho de que todos los tumores diagnosticados como sarcomas hayan sido ER negativos se

asocia a la falta de elementos epiteliales en estas lesiones. Estos autores también han destacado el hecho de que los adenocarcinomas sólidos, que tienden a ser más agresivos, son negativos y que los receptores de los tejidos tumorales tienden a distribuirse de forma similar a la apreciada en los tejidos mamarios de la especie canina y de la especie humana [143].

Posteriormente, Rutteman G.R. y col. (1988) [23] encuentran que casi todos los tejidos mamarios normales analizados en la especie canina (96,7%) contienen ER y PR, en contraste con lo expresado por otros autores [176] que no demuestran su presencia en dichos tejidos. La proporción de positividad (100%) a estos receptores en lesiones benignas encontrada en este [23] y otros estudios [143, 177] es más elevada que la detectada en otro estudio anterior (52%) [176], concluyendo que los tejidos mamarios inalterados y las lesiones benignas

en el perro frecuentemente contienen ambos receptores hormonales. Este hecho es menos común en los cánceres primarios (46,9%), en las metástasis regionales (alrededor del 30%) y en las metástasis distantes (en casi ningún proceso). Esto indicaría un cambio de comportamiento desde una dependencia hormonal hacia una independencia con la desdiferenciación y la progresión de la enfermedad tumoral [23]. Por el contrario, Boldizsár H. y col. (1992) [144] no hallan diferencias estadísticamente significativas en los niveles de ER entre los tumores benignos y los malignos, apreciándose que en los primeros es más común encontrar receptores de estrógenos y no de progesterona.

Donnay I. y col. (1993) [145] llevaron a cabo un estudio en el que, aunque en menor proporción, más del 90% de los tejidos mamarios normales y alrededor del 80% de las lesiones mamarias contienen ambos receptores hormonales; sin embargo, los tejidos normales parecen contener mayor cantidad de ER y menor de PR que las lesiones, por lo que estos autores establecen que esta diferencia sugeriría una distinta regulación de la expresión de los receptores entre tejidos sanos y tumorales, especialmente en los tumores benignos, con un nivel de PR más elevado.

En otra investigación desarrollada posteriormente por Donnay I. y col. (1995), los autores encuentran que los porcentajes de positividad de los ER o PR son más altos en las displasias, los tumores benignos o los adenocarcinomas que en los carcinomas o los sarcomas, los cuales son predominantemente negativos para ambos tipos de receptores; también observan que menos del 20% de los tumores expresan solo un tipo de receptor y que dichos tumores se corresponden con lesiones malignas [146].

El estudio llevado a cabo por Millanta F. y col. (2005) [155] sobre la expresión del PR demuestra, al igual que las aportaciones realizadas por algunos otros autores [24, 156, 158, 162] y al contrario que la evidenciada por otros [145], que esta expresión es significativamente más baja en tumores benignos y malignos que en el tejido sano, siendo la positividad del 100% en

los tejidos mamarios normales, del 85,7% en los tejidos hiperplásicos/dislásicos, del 50% en los tumores benignos, del 41,6% en los carcinomas y del 34,37% en los carcinomas invasivos, aunque ninguno de los casos de carcinomas “in situ” resulta negativo. Estos autores comprueban que la expresión de PR decrece progresivamente según la lesión presente mayor malignidad, pero incluso cuando la reducción de los niveles del PR es estadísticamente significativa en los carcinomas invasivos, alrededor de un tercio de estos tumores permanece positivo para este receptor. Por lo que se refiere a los ER, estos autores [155], al igual que otros [24], encuentran que los tipos complejos y los tubulopapilares muestran mayor positividad que los carcinomas sólidos. Por otra parte, Peña L. y col. (2003) [154] hallan una asociación estadísticamente significativa entre la expresión del PR y el carcinoma inflamatorio, mientras que la ausencia de este receptor está relacionada con la existencia de metástasis pulmonar en la necropsia.

En el trabajo de 2005 desarrollado por Martín de las Mulas J. y col., [150] se detecta que la expresión de uno o ambos receptores es más frecuente en los tumores benignos (96%) que en los malignos (66%) y más en subtipos histológicos complejos y mixtos que en los simples. Los receptores de estrógenos se expresan con menor frecuencia que los de progesterona, tanto en los tumores benignos (49% de tumores benignos positivos para ER y 96% para el PR) como en los malignos (22% y 66%, respectivamente), resultados que concuerdan con los expresados en otros estudios inmunohistoquímicos previos, en los que el 55% de los tumores benignos [141] y el 24% de los malignos [149] manifiestan el ER; sin embargo, se detectaron expresiones más bajas (10%) [178], más altas (59%) [153] y mucho más elevadas (87,5%) [141] en tumores malignos de otros trabajos. En el estudio ya reseñado de Martín de las Mulas J. y col. [150], la determinación química de uno o ambos receptores es detectada en el 76% de los tumores, valor que se encuentra dentro del rango de 65 – 92% descrito en las investigaciones en las que se han utilizado los métodos bioquímicos de medida del contenido

de receptores hormonales [144, 146].

En 2009, Toniti W. y col. [127] aportan los resultados alcanzados en sus estudios, los cuales difieren completamente de la mayoría de trabajos consultados, ya que más de la mitad de los tumores benignos y malignos no expresan ninguno de los dos receptores, obteniéndose expresiones de uno o ambos receptores similares en tumores benignos y malignos.

4. INDICADOR PRONÓSTICO Y TERAPIA

En los tumores mamarios humanos el papel del ER α en el pronóstico y la terapia es bien conocido; su expresión está relacionada con el tiempo libre de enfermedad, la supervivencia total y, el índice de proliferación medido junto con anticuerpos anti-Ki-67 y anti-PCNA [179-182]. La terapia antiestrogénica con fármacos como el tamoxifeno ha demostrado mejorar la supervivencia en mujeres menopáusicas. Las pacientes con cáncer mamario que expresa el ER α tienen una tasa de supervivencia más elevada y una mejor respuesta al tratamiento hormonal que aquellas pacientes sin el ER α [183].

En la investigación veterinaria la determinación de un pronóstico más favorable se realiza en base a: a) los datos de tiempo libre de la enfermedad; b) los períodos de supervivencia más prolongados después de la resección quirúrgica del tumor primario en perros que mueren a causa de un carcinoma mamario y c) el bajo porcentaje de muertes atribuibles al carcinoma mamario [25]. La asociación de un pronóstico más favorable en los carcinomas que contienen ER o PR o ambos, se encuentra en la línea de los estudios previos realizados en perros con neoplasias mamarias [101] y en mujeres con cáncer mamario [183, 184]. La pérdida de los ER/PR en los carcinomas mamarios que inicialmente contenían estos receptores, ha sido asociada con la disminución de la diferenciación celular y la progresión de la enfermedad en los seres humanos [185] y en la especie canina [23]. Según Sartín E. y col. (1992) [25] el estado de los ER /PR parece ser un indicador pronóstico

útil para los carcinomas mamarios en perros, además de poder ser beneficioso para identificar a aquellas pacientes caninas que pueden responder a la terapia antiestrogénica. En el estudio llevado a cabo por estos autores [25], se describe una evolución más favorable de los perros con tumores que contienen uno de estos receptores o ambos a la vez independientemente del tamaño del tumor, diagnóstico histológico o evidencia de metástasis en ganglios linfáticos regionales en el momento de la resección quirúrgica del tumor primario; por otra parte, aunque el número de pacientes que mueren en este estudio es muy pequeño para poder realizar comparaciones, se aprecia que aquellas pacientes con tumores que solo contienen uno de los receptores presentan un rango de supervivencia intermedio entre las que presentan tumores con expresión de ambos receptores y las que tienen tumores con pérdida de ambos, lo que indicaría que los tumores capaces de producir hormonas son menos agresivos [25].

A pesar de estos datos, Millanta F. y col. (2005) [155] no pueden encontrar una asociación estadísticamente significativa entre la pérdida de la expresión de la hormona esteroidea y un peor pronóstico en las perras; lo cual puede estar relacionado con el pequeño número de carcinomas negativos para ambos receptores en la población estudiada.

En 1995, Donnay I. y col. concluyen en un trabajo en el que comparan ambos receptores (ER y PR) en diferentes tejidos neoplásicos mamarios, que las concentraciones de receptores están significativamente disminuidas en las lesiones malignas que han perdido la estructura glandular, en especial aquellas de gran tamaño y de gran velocidad de crecimiento; y esta disminución puede estar ligada a la heterogeneidad, indiferenciación, estadio del tumor o proporción de proliferación de los carcinomas. Los autores también aprecian, que en los estadios tempranos del cáncer mamario en la especie canina se pierden las concentraciones detectables de ambos receptores (ER y PR); consecuentemente, solo las lesiones benignas y algunos adenocarcinomas pueden ser sensibles al tratamiento hormonal, estando en concordancia

esta percepción con el papel protector de la ovariectomía en la aparición clínica de las lesiones tumorales mamarias [146].

Según diversos estudios, la edad, el tamaño tumoral, la ulceración de la piel y el estadio clínico son cuatro factores pronósticos importantes asociados al contenido de receptores de estrógenos en los tumores mamarios caninos [15, 23, 25, 154]. De acuerdo con algunos autores, existe una correlación inversa entre la edad y la presencia del ER [23, 146], en contraste con los carcinomas mamarios de mujeres postmenopáusicas, que contienen más receptores que aquellos carcinomas en mujeres premenopáusicas [186]. Por el contrario, otros autores [150] no evidencian una asociación entre la expresión inmunohistoquímica de uno o ambos receptores y la edad de los animales, ni con el estatus de castración, gestación, pseudogestación y número o localización de los tumores.

Uno de los eventos clínicos más importantes en la progresión del cáncer es el desarrollo de metástasis. En el 2000, Nieto A. y col. [141] hallan diferencias significativas en la inmunorreactividad del ER α y el desarrollo de metástasis en la evolución de la paciente: se observan rangos más bajos de expresión del ER α en los tumores primarios que dan lugar a metástasis distantes durante el período de seguimiento. Estos resultados se asemejan a los obtenidos en 2009 por Chang C.C. y col. [24] los cuales apreciaron en un estudio con 113 perras, que el porcentaje de tumores que expresan ambos tipos de receptores es significativamente más elevado en aquellos tumores menores de cinco centímetros de diámetro, con un estadio clínico I, II ó III y sin metástasis en ganglios linfáticos regionales o metástasis distantes; así como que los tumores malignos con expresión de los dos receptores tienen un rango de supervivencia mayor que aquellos que sólo expresan ER. Esto plantea que la expresión de los PR puede ser utilizada como factor pronóstico de supervivencia, especialmente en hembras de la especie canina con tumores mamarios malignos con expresión de ER [24].

3. EXPRESIÓN DEL ONCOGEN ErbB2

1. INTRODUCCIÓN

En las células normales, las señales se generan en el exterior de las células y se transmiten a través del citoplasma al núcleo, regulando el crecimiento, diferenciación, supervivencia y muerte celular [187]. Las vías de transducción de estas señales están, frecuentemente, desreguladas en las células cancerígenas, lo cual conduce al crecimiento descontrolado que contribuye a la tumorigénesis [187]. Debido a que muchos tipos de tumores tienen alteraciones similares en los componentes de las vías de transducción de señales, estos componentes se han convertido en un objetivo prometedor para la intervención terapéutica [187].

Las proteínas quinasas son un tipo particular de transductores de señales que juegan un papel crítico en la regulación de varios procesos celulares fundamentales, como el crecimiento y la diferenciación [187, 188]. Las proteínas quinasas son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo fosfato a residuos de serina, treonina o tirosina de proteínas diana, y se caracterizan por una elevada homología en el dominio quinasa o catalítico [189]. Existen dos grupos de proteínas quinasas en función del tipo de residuos que son capaces de fosforilar: tirosina quinasas y serina/treonina quinasas, las cuales pueden ser expresadas en la superficie celular, dentro del citoplasma o dentro del núcleo [187, 188].

Las tirosina quinasas de la superficie de la célula que están activas a través de la unión de factores de crecimiento en la superficie celular, se denominan receptores tirosina quinasas [187]. La mayoría de los receptores tirosina quinasa son monómeros dimerizados mediante su unión a un factor de crecimiento, lo cual cambia su estructura tridimensional, permitiendo que el ATP se una y se produzca la autofosforilación, dando como resultado la generación de una señal posterior para la regulación de diversas funciones celulares [187]. En la actualidad, se han identificado alrededor de 60 receptores

tirosina quinasa y han sido clasificados en 20 familias distintas basándose en su estructura, y dentro de las más aplicables en la medicina veterinaria se incluye a HER-2 [190].

La regulación de las quinasas ocurre a muchos niveles, incluyendo el control transcripcional, las modificaciones postraduccionales, la unión de proteínas reguladoras y la localización subcelular [191]; siendo el mecanismo más frecuentemente involucrado en la regulación de la actividad de las quinasas la fosforilación de los residuos clave de sus dominios catalíticos [192, 193]. En cuanto a los receptores tirosina quinasa, el principal mecanismo implicado es la sobreexpresión, pudiendo tener como consecuencia un aumento de la respuesta de las células cancerígenas con unos niveles normales de factor de crecimiento o, si estos niveles están lo suficientemente elevados, la quinasa se puede activar a través de una dimerización espontánea, en ausencia de la señal del factor de crecimiento [187]. Este es el caso del receptor tirosina quinasa HER-2, también conocido como ErbB2, un miembro de la familia del factor de crecimiento epidermal, que se encuentra sobreexpresado en carcinomas de mama y ovarios en la mujer [194].

La familia de receptores ErbB (Figura 1) juega un papel esencial en la determinación del linaje

celular en varios tejidos, incluyendo los procesos inductivos mesenquimales-epiteliales en órganos epiteliales [195]. ErbB2, ErbB3 así como ErbB1 se expresan en la mayoría de células epiteliales, mientras que las células mesenquimales son un rico recurso de ligandos de la familia ErbB [196]. Las mutaciones activadas y la sobreexpresión de los miembros de esta familia de receptores están implicados en una variedad de cánceres, incluyendo carcinomas mamarios, carcinomas escamosos, glioblastomas, así como otras enfermedades malignas en humanos [196]. Los receptores tirosina quinasa de la familia ErbB pueden proporcionar múltiples propiedades a las células neoplásicas, incluyendo la proliferación, migración, angiogénesis, invasión del estroma, y resistencia a la apoptosis [197].

Propiedades de ErbB2:

El oncogen c-erbB2 se encuentra situado en la especie canina en el cromosoma 1q13.1, el cual exhibe frecuentemente una aberración clonal cromosómica en los tumores caninos [199]. Dicho oncogen codifica una glicoproteína de 185kDa localizada en la membrana celular citoplasmática, jugando un papel importante en la actividad intrínseca de la proteína tirosina quinasa, la cual tiene una secuencia homóloga al

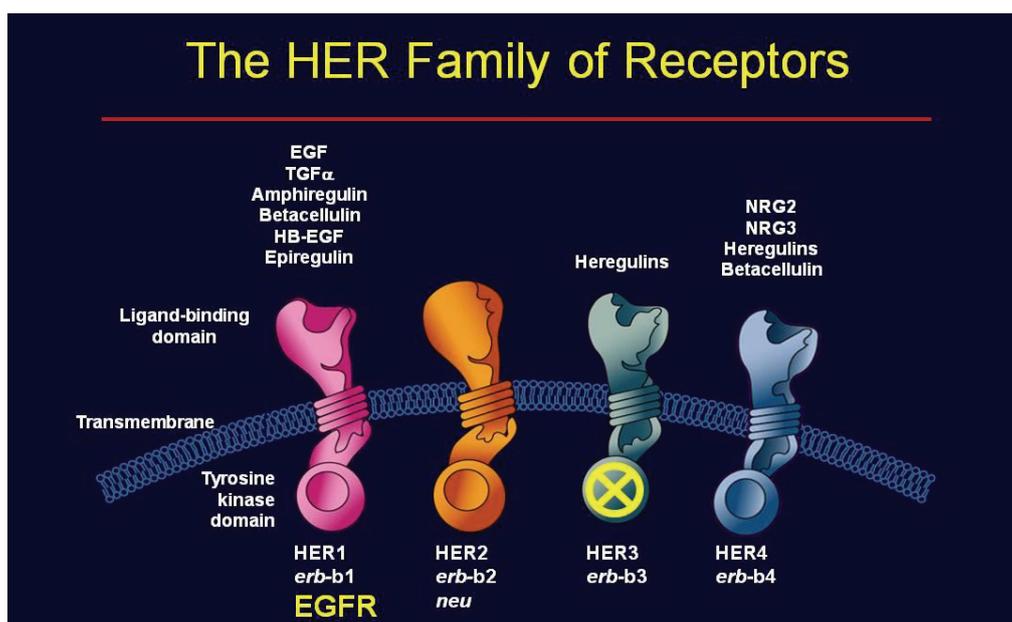


Figura 1: Receptores de ErbB2 y sus ligandos. (Gutierrez 2009).

receptor del factor de crecimiento [200].

El segundo miembro de la familia ErbB, ErbB2, tiene varias propiedades únicas. Primero, no tiene ligando conocido, sugiriendo que puede funcionar como correceptor (o compañero de heterodimerización) para otros receptores ErbB [201]. Segundo, a diferencia de otros receptores ErbB, la sobreexpresión de ErbB2 por sí misma puede causar transformación celular incluso en ausencia del ligando [201]. El ErbB de roedores, denominado neu, mostró ser un potente oncogen transformador [202].

El ErbB humano inalterado tipo salvaje está amplificado o sobreexpresado en un subconjunto de cánceres de mama humano y está correlacionado con un fenotipo tumoral agresivo, que se vincula con el tamaño del tumor, afectación de los ganglios linfáticos, alto porcentaje de células en la fase S, aneuploidía y pérdida de receptores hormonales esteroideos [203-205].

El estudio de la sobreexpresión de ErbB2 en cánceres de mama humanos ha hecho que sea considerado una diana clave para las terapias contra el cáncer ovárico y de mama, a través del empleo del trastuzumab, un anticuerpo monoclonal humanizado (IgG1) dirigido frente al dominio extracelular de ErbB2, comercializado como Herceptin® [206]. En un estudio realizado para comprobar la eficacia del uso de trastuzumab junto con la quimioterapia en cánceres mamarios en mujeres con sobreexpresión de HER-2 se ha observado que, mientras el empleo del trastuzumab como único tratamiento muestra una tasa de respuesta total media del 16%, su uso junto con la quimioterapia, incrementa el tiempo medio de progresión de la enfermedad en un 65% [207].

Mecanismos moleculares que conducen a la sobreexpresión de ErbB2 en el cáncer mamario humano

La amplificación del gen y el incremento de la velocidad de transcripción conduce a un elevado aumento en la síntesis de ARNm específico y en los niveles de su proteína en los cánceres mamarios humanos [208]. Una sobreexpresión

moderada es, con frecuencia, consecuencia únicamente de la desregulación transcripcional, por lo que hay algunos equipos de investigación interesados en desvelar estos mecanismos de desregulación [209-214].

Las tasas de transcripción están controladas mediante la unión de los factores de transcripción a secuencias específicas potenciadoras en el promotor del gen [215]. Las tasas de transcripción pueden estar incrementadas por diferentes mecanismos: niveles o actividad incrementada de los factores de transcripción, así como, mutaciones en el promotor creando secuencias de unión para un nuevo activador o interrumpiendo el sitio de unión para el represor [215]. También se han involucrado mecanismos epigenéticos, como la metilación del ADN e histonas y la acetilación de las histonas, en los niveles moduladores de la expresión genética [215].

No se han encontrado mutaciones del promotor ErbB2 en células cancerígenas que sobreexpresan este gen. Sin embargo, la sobreexpresión y activación de los factores de transcripción han sido implicadas en la sobreexpresión de ErbB2 en las células del cáncer de mama en la mujer [215]. En este estudio se concluye que P185erbB2 (proteína transmembrana codificada por ErbB2) contribuye a la carcinogénesis mamaria si se presenta en grandes cantidades, consecuencia de la combinación de la amplificación del gen y el incremento en la velocidad de transcripción [215].

La expresión de ErbB2 en el carcinoma mamario canino es similar a la que ocurre en el cáncer mamario humano, sugiriendo un posible papel en la carcinogénesis (la expresión de ErbB2 podría activarse durante las fases iniciales del desarrollo del tumor mamario, jugando un papel en su desarrollo maligno) y un valor como indicador pronóstico [29, 124].

2.- TÉCNICAS PARA LA EVALUACIÓN DE ErbB2.

El estado de ErbB2 en el cáncer mamario puede medirse de diferentes formas: 1) a través de la sobreexpresión de la oncoproteína, que puede ser valorada mediante inmunohistoquímica, en

secciones de tejido congelado o embebidos en parafina, utilizando anticuerpos monoclonales o policlonales para la proteína p185 erbB2 o para su producto fosforilado; mediante ELISA o mediante Western blot [210, 216]; 2) a través de la amplificación del gen, llevada a cabo mediante hibridación Southern, mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) competitiva, diferencial o en tiempo real, realizando la técnica FISH (hibridación de fluorescencia in situ) [210, 216] o mediante hibridación cromogénica in situ (CISH) [217]; 3) a través de la detección de moléculas de ARNm con la técnica Northern blot [218].

Slamon DJ y col. demostraron en 1987 que la amplificación del gen ErbB2, determinada por el análisis Southern, predice el tiempo de recidiva de la enfermedad y el tiempo total de supervivencia en 189 mujeres con cáncer mamario [219]. Poco después, Berger MS y col. (1988) describen la existencia de una buena correlación entre la sobreexpresión de ErbB2, determinada por inmunohistoquímica, con el estado de los receptores hormonales y el grado de pleomorfismo nuclear del tumor mamario, de modo que la mayor parte de los pacientes que muestran dicha amplificación no poseen receptores de estrógenos y el grado de pleomorfismo nuclear del tumor se puntúa como 3 (un núcleo con marcada variación en forma, tamaño y patrón de la cromatina con dos o más nucléolos) [220]. Sin embargo, en otro estudio inmunohistoquímico, llevado a cabo por Van de Vijver Mj y col. en 1988, no se demuestra una asociación significativa entre la sobreexpresión de la proteína ErbB2 y la implicación de los ganglios linfáticos o la recidiva del tumor [221]. Posteriormente, en 1990, Heinz NH y col., mediante el análisis de Southern, demuestran que el número de copias del gen ErbB2 se correlaciona significativamente con un incremento de la actividad mitótica y con la ausencia de los ER y PR, pero no pueden relacionarlo con la supervivencia del paciente, la metástasis, la recidiva o el grado histológico [222]. A lo largo de los siguientes siete años, la mayoría de los estudios llevados a cabo sí han encontrado una fuerte correlación entre el estado

de ErbB2 y el desarrollo de la enfermedad, principalmente esta observación corresponde a aquellas investigaciones que utilizan los análisis basados en genes o la inmunohistoquímica con anticuerpos anti-ErbB2 con sensibilidad en los tejidos procesados y restringiendo los casos positivos a aquellos con un patrón de tinción membranoso característico, de forma que las pacientes con sobreexpresión de la proteína o amplificación del gen mostraban un tiempo libre de enfermedad y una menor tasa de supervivencia [223-227].

En un estudio de 1994 en 442 pacientes, Muss HB y col. demuestran un valor predictivo significativo de la sobreexpresión de la proteína ErbB2, determinada mediante inmunohistoquímica, en la respuesta a la quimioterapia citotóxica y a la evolución de la enfermedad en mujeres con afectación en ganglios linfáticos. Así, las pacientes cuyos tumores sobreexpresaban ErbB2 obtienen un beneficio mucho mayor de la intensificación de las dosis de quimioterapia que aquellas con una expresión baja o sin sobreexpresión de la proteína [228]. En 1996 en un estudio de cáncer mamario sin afectación de los ganglios linfáticos, O'Malley FP y col. aprecian un papel predictivo a nivel del tiempo de supervivencia total de la paciente y el tiempo libre de enfermedad en un análisis multivariante, al realizar una evaluación inmunohistoquímica semicuantitativa de los niveles de ErbB2, asociando la sobreexpresión de la proteína a un descenso de estos dos parámetros [229]. Poco más tarde, otros dos estudios evidencian un pronóstico adverso de la enfermedad en tumores de pacientes con altos niveles de proteína ErbB2 determinados mediante el método ELISA [230, 231]. Descotes F y col. (1993) utilizando los métodos de Southern y de slot-blotting, también sugieren que la amplificación de ErbB2 podría actuar como un factor pronóstico independiente, ya que en el trabajo realizado por estos autores ellos observan que en un subgrupo de pacientes con factores pronósticos favorables, como la positividad para receptores hormonales de estrógenos y progesterona y sin afectación en ganglios linfáticos, la frecuencia de tumores con

amplificación del gen fue similar a la observada en el grupo entero en el que se incluían muestras analizadas mediante una de las dos técnicas o ambas [232].

Dado que los procedimientos Southern y slot-blotting son caros, consumen mucho tiempo, requieren el uso de grandes cantidades de tejidos frescos o congelados [233], están limitados debido a los artefactos por dilución (compuestos por células ductales mamarias benignas, acinis, células del estroma, células inflamatorias y estructuras vasculares) dando como resultado falsos negativos [234] y se produce la obtención de falsos positivos por inclusión de carcinoma in situ que expresa altos niveles de ErbB2 [235, 236], no permitiendo una valoración simultánea de la morfología del tumor [233], se prefiere el empleo de otras técnicas.

La técnica de hibridación fluorescente in situ (FISH) ha sido implantada para la medida del número de copias del gen ErbB2 en muestras archivadas fijadas en formalina. Dos estudios mediante FISH muestra que esta técnica es más sensible que el Southern blotting para la detección de la amplificación del gen ErbB2 [227, 237]. La hibridación fluorescente in situ ha mejorado a muchas técnicas de transferencia de proteínas o “blotting” en matrices sólidas, diseñadas para detectar el ADN y el ARN de ErbB2, así como también a la inmunohistoquímica, diseñada para detectar la proteína ErbB2 en tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina [227], ya que está menos afectada por la fijación del tejido y por variables analíticas [233].

La técnica FISH se ha descrito como un método rápido, reproducible y extremadamente seguro para detectar la amplificación del gen ErbB2 [227]. Además, puede ser fácilmente realizada en bloques de parafina archivados durante largos períodos de tiempo y ser aplicada satisfactoriamente a biopsias mediante aspirado con aguja fina [238]. En el estudio llevado a cabo por Xing W.R. y col. en 1996, se aprecia que la amplificación del gen ErbB2 es más predictiva cuando se emplea el método FISH que el propio el estado de los ganglios linfáticos, siendo este un indicador pronóstico potente del

desarrollo del cáncer [239]. Pero el método de FISH tiene también algunas desventajas, ya que requiere un moderno y caro microscopio de fluorescencia equipado con multifiltros de banda triple [240] y que el material biológico sometido a fluorescencia pierde la coloración tan rápido que no proporciona un archivo permanente [240]. Comparado con la técnica de FISH, la inmunohistoquímica es más utilizada al ser más económica y más fácil de realizar y conservar [241].

Aunque algunos estudios comparativos entre ambas técnicas muestran generalmente una alta concordancia [241], hay que resaltar que se puede observar sobreexpresión de la proteína sin la amplificación del gen, así como apreciarse amplificación del gen en casos negativos mediante inmunohistoquímica, por lo que se establece una controversia a nivel de la concordancia entre la técnica de FISH y la inmunohistoquímica [214, 242-244]. Estas inconsistencias pueden ser debidas a varias causas incluyendo la variabilidad en la fijación y procesado del tejido, la heterogenicidad intratumoral y la polisomía del cromosoma 17 [245, 246], que es un factor que influye en un pequeño subgrupo de tumores, los cuales son altamente positivos pero sin presentar amplificación del gen ErbB2, según demuestran algunos estudios [245, 247].

Aunque la amplificación del gen es la principal causa de la sobreexpresión de la proteína en el cáncer de mama en la mujer [237], también se ha identificado como causa de dicha sobreexpresión la delección del exón 16 [248] y el polimorfismo en el codón 655 del gen HER-2 humano [249]. Sin embargo en 2009, Hsu W.L. y col. no identifican la delección del exón ni el polimorfismo del codón en el gen HER-2 canino [250]; además no se han encontrado mutaciones biológicas significativas en la región codificante de HER-2 canino de los tumores mamarios de la especie canina, indicando que la sobreexpresión de la proteína puede no ser debida a mutaciones en nucleótidos, sino que puede estar causada por mecanismos moleculares como la amplificación genética, la estimulación transcripcional o el control translacional. Estas observaciones

difieren de las realizadas por Martín de las Mulas y col. en 2003, los cuales no hallan amplificación del gen mediante la técnica CISH [29]. Murua Escobar H. y col. (2001) determinaron mediante FISH y estudios citogenéticos de tumores caninos que la región del cromosoma 1q13.1, en donde se encuentra el oncogen, se halla frecuentemente afectada por aberraciones cromosómicas clonales [199].

Análisis inmunohistoquímico (IHC)

La sobreexpresión de la proteína HER-2 depende de varios factores, incluyendo la sensibilidad de detección de los diferentes métodos, el nivel de expresión del gen (amplificación, transcripción, translación) o de los estados de las muestras tumorales [250].

La técnica de inmunohistoquímica se ve afectada por diversas variables, incluyendo los métodos de fijación de los tejidos, los reactivos empleados, los protocolos de ensayo, la sensibilidad y especificidad de los anticuerpos y los criterios de puntuación [251-254], y con la considerable variabilidad interobservador en la interpretación de los resultados incluso en diferentes estudios al emplear el mismo anticuerpo [251, 254-256].

En cuanto a los anticuerpos utilizados, éstos difieren en su sensibilidad para detectar los epítopes de ErbB2. Las consideraciones que se deben plantear al llevar a cabo un ensayo son el tipo de anticuerpo empleado, la clonicidad del anticuerpo (monoclonal frente a policlonal) y la dilución utilizada [233].

En 2006, Gouvea, A.P. y col. comparan la capacidad de diferentes anticuerpos para detectar la expresión de HER-2 en carcinomas mamarios en la especie humana mediante inmunohistoquímica, encontrando que usando anticuerpos monoclonales los resultados están más fuertemente correlacionados con la amplificación del gen mediante FISH, que los resultados obtenidos al utilizar anticuerpos policlonales [257]. Esto puede ser debido al hecho de que los anticuerpos policlonales son capaces de detectar las cuatro moléculas de la familia EGFR mientras que los anticuerpos

monoclonales detectan sólo los casos HER-2 positivos [258].

Existen diversos sistemas de puntuación para calificar la inmunotinción de las células tumorales dentro de un tejido, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante para los patólogos. En el estudio inmunohistoquímico sobre tumores mamarios caninos, Rungisipat y col. (1999) utilizan la siguiente escala para la interpretación: (1+)- tinción débil de la membrana celular; (2+)- tinción moderada de la membrana y débil del citoplasma; (3+)- tinción intensa de la membrana y de moderada a intensa del citoplasma celular; y (4+)- tinción intensa de la membrana y del citoplasma; en este estudio los autores consideran que no se encuentra sobreexpresión de la proteína cuando sólo menos del 20% de las células muestran inmunorreacción [57]. Nowak, M. y col. (2005) evalúan la expresión de HER-2 usando una escala semicuantitativa que tiene en cuenta el porcentaje de células positivas: (-) no existe reacción; (+) 1-10% de células positivas = reacción débil; (++) 11-25% de células positivas = reacción moderada; (+++) >26% de células positivas = reacción intensa [259]. Por otra parte, Kumar y col. (2009) utilizando un sistema parecido pero en el que solamente se tiene en consideración el porcentaje de células inmunoteñidas con cualquier intensidad (débil, moderada o fuerte), obtienen la siguiente forma de puntuación: (-) <10% de células neoplásicas positivas; (+) <30% de células neoplásicas positivas; (++) 30-70% de células neoplásicas positivas; (+++) >70% de células neoplásicas positivas [258].

Por otra parte, la mayoría de los autores aplican el sistema de puntuación Herceptest [28, 250, 260-264], con el que se evalúa la expresión de la proteína de la siguiente manera: (0)- no existe tinción de la membrana o menos del 10% de las células están teñidas; (1+)- la tinción de la membrana es incompleta en más del 10% de las células; (2+)- más del 10% de las células poseen una tinción de débil a moderada y completa de la membrana celular; (3+)- la tinción de la membrana es completa y fuerte en más del 10% de las células; en este sistema (0) y (1+) se considera que tienen una expresión normal de

la proteína HER-2, mientras que (2+) y (3+) se toman como positivos.

Recientemente, al igual que en el caso de la guía recomendada para la cuantificación inmunohistoquímica de los ER/PR en los tumores mamarios en la especie canina [174], basadas en la guía recomendada por la Sociedad Americana de Oncología Clínica y el Colegio de Patólogos Americano (ASCO/CAP) para la valoración de los receptores de estrógenos y progesterona, con algunas variaciones específicas para la especie canina [175], se expone en el mismo consenso una propuesta para la interpretación inmunohistoquímica de HER-2 basada en un sistema para el cáncer mamario en la mujer, en el cual sólo los tumores clasificados como 3+ se consideran positivos (Tabla 10).

3. IMPLICACIÓN CLÍNICA DE LA EXPRESIÓN DE ErbB2

ErbB2 es un oncogen que se encuentra sobreexpresado en el 25-30% de los cánceres de mama humano [265-267] y su estudio es muy importante porque estas pacientes pueden optar a la terapia con trastuzumab, el cual es altamente eficiente para ellas [207], ya que los cánceres mamarios que sobreexpresan ErbB2 son resistentes a la quimioterapia convencional.

También se ha mostrado que estos tumores son más agresivos y desarrollan más frecuentemente metástasis en ganglios linfáticos que los tumores mamarios que no manifiestan dicha sobreexpresión [207, 268, 269].

Además, los pacientes con altos niveles de sobreexpresión o amplificación de ErbB2 tienen niveles más bajos, estadísticamente significativos, de receptores de estrógeno y progesterona, que aquellos con bajos niveles de sobreexpresión o amplificación de ErbB2. Como los niveles de receptores hormonales están fuertemente relacionados con la respuesta a la terapia hormonal en los cánceres mamarios primarios y avanzados, su expresión reducida puede ser un mecanismo para explicar la relativa resistencia de los tumores ErbB2 positivos a la terapia hormonal [270].

Algunos investigadores han observado una correlación positiva entre la afectación de los ganglios linfáticos y la sobreexpresión o amplificación de ErbB2, comprobando que la mayor parte de los tumores mamarios en mujeres con metástasis en ganglios linfáticos sobreexpresaban la proteína [271, 272]; sin embargo, no todos los investigadores han encontrado dicha asociación [273]. Un estudio que realizan en 2010 Vaidyanathan K. y col.

Tabla 10: Guía para la interpretación inmunohistoquímica de HER-2.

PUNTUACIÓN PARA IHC	CRITERIOS DE INTERPRETACIÓN
0 – 1+	Ausencia de tinción (0) o tinción de la membrana débil e incompleta en cualquier porcentaje de células (1+)
2+	Tinción de la membrana completa y fuerte en $\leq 30\%$ las células o tinción de la membrana heterogénea completa débil o moderada en al menos 10% de las células
3+	Tinción de la membrana homogénea completa y fuerte en $> 30\%$ de las células

Peña L. Y col. (2014).

[272] también demuestra que los tumores de mayor tamaño tienen una mayor sobreexpresión de ErbB2 comparados con los de pequeño tamaño, coincidiendo estos resultados con otras investigaciones previas [274].

Dentro de la oncología veterinaria encontramos diversos artículos que analizan la sobreexpresión o amplificación de ErbB2. En 1996, Ahern T.E. y col. llevan a cabo un estudio con perras que se encuentran en un avanzado estado de la enfermedad, donde son analizados 23 tumores mamarios malignos y 5 muestras de tumores mamarios benignos; al valorar la sobreexpresión de c-erbB-2 observan que el 74% de los tumores malignos (carcinomas, adenocarcinomas y tumores mixtos malignos) son positivos y no evidencian dicha sobreexpresión en ninguno de los tumores mamarios benignos, por lo que hallan una correlación significativa entre la malignidad y la sobreexpresión de la proteína [124]. Al comparar los resultados con los alcanzados en diversos estudios en medicina humana, se comprueba que este porcentaje es tres veces mayor al obtenido en el conjunto de tumores mamarios humanos, los cuales sobreexpresan la proteína o amplifican el gen en un 20 a un 30% de las neoplasias analizadas [265, 275], aunque es similar al porcentaje apreciado a nivel de tumores metastásicos [56, 276, 277]. En el trabajo de Ahern T.E. y col. (1996) de los 23 tumores malignos en la especie canina analizados 7 tenían evidencia histológica de invasión local o regional, 6 de los cuales eran positivos para c-erbB-2, mientras que un caso resultó negativo, con lo que no pudieron los autores establecer un pronóstico basándose en este marcador exclusivamente [124].

Por el contrario, en el estudio llevado a cabo por Rungsipipat A. y col. (1999) se consiguen resultados dispares respecto a los anteriormente descritos. De los 47 tumores caninos malignos valorados, el 19,1% (9/47) sobreexpresan la proteína c-erbB-2 mediante análisis inmunohistoquímico, utilizando un anticuerpo policlonal anti-humano de conejo; porcentaje aproximado al demostrado en la especie humana, de estos procesos neoplásicos el 10,1% (8/47) son diagnosticados histológicamente como

adenocarcinomas [57]; además el 50% (16/32) de los tumores benignos analizados también mostraron sobreexpresión, la mayor parte de los cuales (87,5%) correspondían a adenomas simples y complejos [57].

Posteriormente, en un trabajo desarrollado en 2001 por Matsuyama S. y col. sobre la subfamilia ErbB mediante PCR, se muestra que en los tumores mamarios caninos están expresados más de un ARNm de las subfamilias ErbB, mientras que no se detecta este hecho en la glándula mamaria normal [278]. En dicho estudio no aprecia una correlación directa entre la combinación de genes expresados y el tipo histológico de los tumores valorados, pero los resultados sugieren que la expresión de los ARNm de la subfamilia ErbB juega un importante papel en la tumorigénesis de la glándula mamaria [278].

Mediante la comparación de dos técnicas para la evaluación del estado de c-erbB-2 en la especie canina, Martín de las Mulas J. y col. (2003) detectan mediante inmunohistoquímica, que con el empleo de anticuerpo policlonal en dilución 1:100, es el 17'6% de los tumores mamarios malignos los que sobreexpresaban la proteína erbB-2. Estos tumores analizados tienen un tamaño de más de 3 cm de diámetro, están compuestos por células epiteliales atípicas con patrones de crecimiento sólido, que se corresponden con un grado histológico de malignidad de III, con un crecimiento infiltrativo y con la carencia de receptores de estrógenos y progesterona; estas pacientes no reciben terapia adyuvante y desarrollan metástasis o mueren en un período de tiempo menor de 6 meses después del tratamiento quirúrgico [29]. Por otra parte, al realizar la hibridación cromogénica in situ (CISH) no se encuentran diferencias en el número de copias del gen entre los casos estudiados con o sin expresión de la proteína (6 tumores malignos (+++) y (++) , 2 tumores benignos (-) y en una muestra de tejido normal (-)), lo que indica que en estos casos no se evidencia la amplificación del gen c-erbB-2 [29]. Los resultados de este estudio demuestran que la sobreexpresión de la proteína sólo está presente en tumores mamarios malignos, ya que contrariamente a lo que

describen en 1999 Rungsipipat A. y col., no se encuentra sobreexpresión en lesiones tumorales benignas [57]; esta discrepancia probablemente se debe a diferencias en el método empleado para evaluar la presencia de dicha sobreexpresión (en el estudio de Martín de las Mulas J. y col. se utiliza el sistema de puntuación Herceptest, mientras que en el estudio de Rungsipipat A. y col. utilizan la ya mencionada escala para la interpretación: (1+)- tinción débil de la membrana celular; (2+)- tinción moderada de la membrana y débil del citoplasma; (3+)- tinción intensa de la membrana y de moderada a intensa del citoplasma celular; y (4+)- tinción intensa de la membrana y del citoplasma; en el cual no se encuentra sobreexpresión de la proteína cuando sólo menos del 20% de las células muestran inmunorreacción).

Si comparamos el estudio antes señalado de Martín de las Mulas J. y col. de 2003, con el llevado a cabo por Ahern T.E. y col. de 1996 [124], se comprueba que en este último trabajo se necesita un incremento del ARNm doble respecto a los niveles basales utilizando la técnica “dot-blot”, mientras que con el sistema de puntuación utilizado en el estudio de Martín de las Mulas y col., mediante inmunohistoquímica, se requiere un incremento de la cantidad de proteína mayor de 2 veces respecto al nivel basal para reflejar la expresión de la proteína [29]. Las diferencias también dependen de las condiciones de hibridación, ya que puede haber falsos positivos debido a la hibridación cruzada con genes de la subfamilia ErbB altamente homólogos, como el EGFR [279].

En el análisis desarrollado en 2004 por Dutra A.P. y col. [28] de 70 muestras de tumores mamarios pertenecientes a la especie canina, de las cuales el 68,5% (48/70) corresponden a tumores malignos, se comprueba que un 35,4% (17/48) de estos procesos malignos son positivos a la sobreexpresión de la proteína c-erbB-2 mediante inmunohistoquímica, con un 25,3% (6/17) puntuado como (+++) y un 64,4% (11/17) valorado como (++) ; estos rangos difieren de los publicados en 1996 por Ahern T.E. y col., con un 74% de tumores malignos positivos [124], y por Rungsipipat A. y col. (1999) con un 19,1%

de positividad [57]. Estas diferencias quizá sean debidas al bajo número de casos estudiados (23 pacientes en el primer caso y 47 en el último) y/o a los diferentes métodos usados para detectar la sobreexpresión de c-erbB-2 [28]. En cuanto a los resultados obtenidos en el estudio realizado por Dutra A.P. y col. (2004) al valorar 22 casos de tumores benignos, ninguno de ellos resulta positivo mediante inmunohistoquímica, apreciándose que el 40,9% de éstos (9/22) presentan una inmunorreacción (+) (resultado que es considerado como negativo) [28]. En este mismo estudio los autores hallan una correlación positiva entre la biología (expresión de erbB2) y la morfología (pleomorfismo nuclear, índice mitótico y formación tubular), de tal forma que la expresión de erbB-2 se correlacionaba con un elevado grado de pleomorfismo nuclear e índice mitótico, así como con una baja tasa de formación tubular, en dichos tumores mamarios caninos. Estos hallazgos son indicativos de que la biología y la morfología de estos tumores malignos están estrechamente ligadas, como en el cáncer mamario humano [28]; además estos resultados refuerzan la idea de que los tumores mamarios espontáneos en la especie canina pueden ser usados como modelo para el estudio del proceso carcinogénico mamario humano [199, 280].

En la investigación realizada por Nowak M. y col., en 2005 en la que se analiza muestras de 40 pacientes con adenocarcinomas, se demuestra la expresión del receptor c-erbB-2 en el 72,5% de los tumores mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo monoclonal de ratón en dilución 1:50 (clon PN2A). El 37,5% de los tumores se evalúan como 1+, el 25% como 2+ y el 10% como 3+, mientras que el 27,5% de las muestras no muestran la expresión del receptor [259].

En 2009, Hsu W.L. y col. describen la sobreexpresión de la proteína c-erbB-2 en 29,7% (27/91) de los perros con tumores mamarios malignos utilizando el Herceptest, mientras que en las muestras de tumores benignos y en las glándulas mamarias normales no se detecta dicha sobreexpresión [250]. Estas observaciones son similares a las obtenidas en estudios previos de carcinomas mamarios en la mujer [265, 267,

281, 282]. En este trabajo también se demuestra, a través de los datos obtenidos del estudio del nucleótido mediante PCR, que en el 15,8% de los casos en que se sobreexpresa la proteína c-erbB-2 en la especie canina se manifiesta polimorfismo de un nucleótido solitario (T1725 C) (una mutación en los exones 14-18) en el gen c-erbB-2, aunque ésta es una mutación silente [250]. Además, en este mismo estudio se comprueba la existencia de varios factores que están asociados significativamente a un pronóstico desfavorable para la supervivencia un año después de la cirugía del tumor mamario, incluyendo un tamaño tumoral mayor de 5 cm., un estadio tumoral de IV ó V, una clasificación histológica de sarcoma, metástasis en ganglios linfáticos y metástasis distantes; factores consistentes con los descritos en otros estudios [14, 257].

Kumar P. y col. llevan a cabo en el año 2009 una investigación mediante inmunohistoquímica empleando un anticuerpo monoclonal de ratón en dilución 1:40 (clon Sigma-E 2777) en 74 muestras de tejido mamario, entre los que se diagnosticaron 54 tumores malignos y 11 de tumores benignos; del total de procesos malignos un 42,59% (23/54) resultan positivos para la sobreexpresión de la proteína c-erbB-2. De estos, aquellos con mayor inmunorreacción (++), según el sistema de puntuación empleado, son los tumores mixtos malignos, adenocarcinomas papilares y carcinomas de células escamosas, mientras que los fibrosarcomas, los osteocondrosarcomas, los carcinosarcomas y los mixosarcomas son negativos [258]. Se debe tener en cuenta que los tumores son puntuados más bajo que en estudios anteriores [283], donde la expresión de c-erbB-2 se registra como (++) y (+++) en la mayor parte de los casos positivos; dicha variación puede ser debida a la diferencia en el protocolo de estandarización, concentración del anticuerpo utilizado, naturaleza del anticuerpo (mono- o policlonal) y la variación subjetiva en la evaluación de la inmunotinción de las células neoplásicas; también hay que tener en cuenta que en el estudio de Ahern T.E. y col. (1996) [124] y en el anterior trabajo de Rungsipipat A. y col. (2003) [283], la alta expresión de

c-erbB-2 en los tumores malignos puede ser debida al hecho de que los tipos histológicos implicados corresponden principalmente a adenocarcinomas, carcinomas y tumores mixtos malignos, los cuales se cree que tienen una mayor expresión debido a su origen epidermal.

En lo que se refiere a las muestras de tumores benignos, al igual que en el estudio de Rungsipipat A. y col. (1999) [57] aunque éste en un mayor porcentaje (50%), de los 11 casos analizados sólo 2 (18,2%) son positivos para la sobreexpresión de c-erbB-2 pero mostrando señales débiles puntuadas como (+); sin embargo, estudios previos [124, 250] encuentran inmunoexpresión negativa en todos los tumores mamarios benignos. Estas discrepancias en los resultados pueden deberse al hecho de que en la investigación de Rungsipipat A. y col. se utilizan anticuerpos policlonales que son capaces de detectar las cuatro moléculas de la familia EGFR, mientras que los anticuerpos monoclonales sólo pueden detectar los casos c-erbB-2 positivos [57]. En cuanto a la glándula mamaria normal, no se observa la sobreexpresión de dicha proteína, lo que prueba la noción de que c-erbB-2 está implicado en la transformación de los tejidos mamarios.

Paralelamente al trabajo anterior, Ferreira E. y col. (2009) [260] intentando establecer la relación entre el tamaño del tumor y la expresión de varios factores pronósticos en diferentes tumores mamarios caninos, entre los que se incluye el c-erbB-2, concluyen en su estudio inmunohistoquímico en el que se utilizan anticuerpos policlonales en dilución 1:80, que la positividad para este factor pronóstico no difiere entre los tumores malignos y benignos. Esta afirmación contrasta con aquellas observaciones que muestran que la incidencia de inmunotinción positiva es significativamente más elevada en los carcinomas que en los tumores benignos [124, 258, 284]. Al contrario que en otros estudios realizados en la especie canina [28, 250, 284], para los que la sobreexpresión de la proteína ha sido asociada a un gran tamaño del tumor y en los que dicha sobreexpresión parece ser un factor pronóstico negativo independiente para aquellas pacientes afectadas, Ferreira E. y col. en 2009,

afirman que la sobreexpresión tampoco difiere al comparar los diversos tumores mamarios analizados según su diferente tamaño [260]. Por otro lado, señalan que la expresión de c-erbB-2 observada en el estudio puede ser indicativa también de un evento molecular temprano en la génesis de los tumores mixtos caninos, el tipo tumoral más común encontrado entre las muestras de este trabajo.

Finalmente, al igual que en el estudio de Dutra A.P. y col. (2004) [28], Vinothini G y col. (2009) [285], en un trabajo en el que se evalúan diferentes marcadores moleculares (incremento de receptores de estrógenos, ErbB2, estradiol, y sus enzimas, así como las proteínas implicadas en la proliferación, evasión de la apoptosis, invasión y angiogénesis) en neoplasias mamarias de la especie canina, concluyen que el estudio de dicha patología en esta especie es un modelo válido para estudios en medicina humana. En 1989, Nerurkar V.R. y col. concluyen tras un estudio de patología comparativa en tumores mamarios caninos, que éstos constituyen un modelo mucho mejor para el estudio de la evaluación comparada de los mecanismos moleculares de la carcinogénesis que el tradicional modelo de roedor [286].

En la Tabla 11 se muestran los resultados más relevantes sobre c-erbB-2 en tumores mamarios en la especie canina.

4. RESPUESTA A LA TERAPIA PARA TUMORES POSITIVOS A ErbB2

En el cáncer mamario humano se ha demostrado que, aparte del significado pronóstico en el cáncer mamario, la amplificación de ErbB2 y la expresión de su proteína predicen y modulan la respuesta a la terapia hormonal y a los agentes quimioterapéuticos convencionales [233].

Las evidencias clínicas y experimentales, particularmente en cánceres en un estadio avanzado, sugieren una asociación entre la sobreexpresión de ErbB2 y la resistencia a las terapias endocrinas en general [270, 287]. En un estudio prospectivo con 516 pacientes en estadio I y II, Gago F.E. y col. (2006) concluyen que el intervalo libre de enfermedad

y la supervivencia total en aquellas mujeres que recibieron Tamoxifeno solo o después de la quimioterapia son significativamente más bajos en el grupo positivo a receptores hormonales (estrógenos y progesterona) y con sobreexpresión de ErbB2 que en el grupo de pacientes con tumores positivos a los receptores pero sin sobreexpresión de la proteína [288]. En contraste, en un trabajo del 2000 de Berry D.A. y col., en el que se evalúa mediante diferentes métodos (IHC, FISH y PCR) el estado de ErbB2 en 651 mujeres con tumores positivos a receptores de estrógenos y con afectación en ganglios linfáticos, se muestra que el período libre de enfermedad y la supervivencia total no están influenciadas por dicha amplificación del gen y/o sobreexpresión de la proteína en los tumores [289].

El gran valor de ErbB2 como un marcador predictivo radica en la respuesta a terapias que tengan como diana a ErbB2, como el trastuzumab. Las pacientes con cáncer mamario fuertemente positivos a ErbB2 muestran un beneficio clínico significativo de la terapia con trastuzumab o con el empleo de éste de modo combinado [290]. Slamon, D.J. y col. apreciaron que con el uso del trastuzumab como tratamiento único se obtenía una proporción de respuesta total media del 16%, mientras que si era combinado con quimioterapia, el tiempo medio de progresión de la enfermedad se incrementaba en un 65% [207].

Para mejorar el efecto terapéutico del trastuzumab en los casos positivos a ErbB2, se debería incluir el uso de la técnica FISH como prueba secundaria para aquellas neoplasias IHC (++) [291].

Ya que la expresión de ErbB2 inmunorreactiva en los tumores mamarios caninos es un importante factor predictivo de la carcinogénesis de estas neoplasias y, dadas las implicaciones en medicina humana, este hecho abre la posibilidad de utilizar anticuerpos anti-ErbB2 para el tratamiento de los tumores mamarios en esta especie animal [28]. Varios estudios han demostrado que los tumores caninos y humanos comparten aberraciones y expresiones de genes similares [292-294], por lo que Peruzzi D. y col. (2010) evaluaron la

Tabla 11: Resumen de los resultados obtenidos en los diferentes estudios sobre c-erbB-2 en tumores mamarios en la especie canina.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	N° CASOS	TÉCNICA EMPLEADA	PORCENTAJE DE POSITIVIDAD		
			Tejido normal	T. benignos	T. malignos
Rungsipipat A. <i>et al.</i> (1999)	79n (47 tumores malignos; 32 benignos)	Anticuerpo policlonal anti-humano	-	50% (no especifica la intensidad)	19,1% (no especifica la intensidad)
Martín de las Mulas, J. <i>et al.</i> (2003)	24n (17 tumores malignos; 6 benignos y 1 tejido normal)	Anticuerpo policlonal anti-c-erbB-2 humano (dilución 1:1000)	0%	0%	15,6% (++) y (++++)
Dutra A.P. <i>et al.</i> (2004)	70n (48 tumores malignos; 22 benignos)	Anticuerpo policlonal anti-c-erbB-2	-	0% [pero el 40,9% son (+)]	35,4% [25,5% (++++) y 64,4% (++)]
Nowak M. <i>et al.</i> (2005)	40n (tumores malignos)	Anticuerpo monoclonal de ratón (clon PN2A; dilución 1:50)	-	-	72,5% [37,5% (+++), 25% (++) y 10% (+)]
Hsu W-L. <i>et al.</i> (2009)	100n (91 tumores malignos; 6 benignos; 2 tejidos normales)	Anticuerpo policlonal anti-c-erbB-2	0%	0%	29,7% (++) y (++++)
Kumar P. <i>et al.</i> (2009)	65n (54 tumores malignos; 11 benignos)	Anticuerpo monoclonal de ratón anti-c-erbB-2 (clon sigma-E 2777; dilución 1:40)	-	18,2% (+)	42,59% (++) y (+)
Kim J.H. <i>et al.</i> (2010)	64n (52 tumores malignos; 12 benignos)	Anticuerpo monoclonal de ratón anti-c-erbB-2 (dilución 1:40)	-	16,7% (+)	35,3% (+)

viabilidad y seguridad del régimen de vacunación DNA-EP/Ad (electroporación del plásmido de ADN y un adenovirus recombinante) en perros sanos, demostrando que la vacuna contra ErbB2 es capaz de inducir una respuesta inmune de las células T [294].

4. EXPRESIÓN DE LA CICLOOXIGENASA-2

1. INTRODUCCIÓN

Prostaglandinas y ciclooxigenasas

Las prostaglandinas son metabolitos derivados de lípidos de cadena corta que están involucrados en una amplia variedad de procesos fisiológicos importantes, como son la ovulación, el mantenimiento del flujo sanguíneo renal y la citoprotección de la mucosa gástrica. Sin embargo, las prostaglandinas también juegan papeles significativos en muchos procesos patológicos, incluyendo el desarrollo de diversos cánceres [295].

La familia de las ciclooxigenasas (COXs; también denominadas prostaglandina-endoperóxido sintasa o PGHS) comprende un grupo de isoenzimas de tipo oxidorreductasa que catalizan la biosíntesis de eicosanoides (prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos) por oxidación del ácido araquidónico [296]. De esta forma media la conversión de ácido araquidónico a prostaglandina G₂ (PGG₂) y, por lo tanto, reduce la PGG₂ a prostaglandina H₂ (PGH₂), la cual es convertida posteriormente en diferentes prostanoides biológicamente activos mediante prostaglandinas sintasas [296].

El primer componente de la familia COX en identificarse fue la enzima COX-1, reconocida a principios de los años 70 por Sir John Vane como diana de la aspirina y otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) [297]. La enzima COX-1 se expresa normalmente de forma constitutiva y está presente en muchos tejidos en niveles constantes, jugando un papel muy importante en la regulación de funciones fisiológicas como la protección del estómago, el

control de la agregación plaquetaria, la función renal y la reproducción [298].

Por otro lado, COX-2 está encargada del proceso de biosíntesis de prostaglandinas y tromboxanos al igual que COX-1 [299], pero a diferencia de éste, COX-2 se encuentra normalmente ausente (excepto en muy pocos tejidos, como la placenta, el cerebro o el riñón) y no se expresa de forma constitutiva, sino que es inducida por factores de crecimiento, citoquinas, promotores tumorales, estímulos inflamatorios y otros numerosos mediadores [300], como la interleucina-1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral (TNF) y los lipopolisacáridos [301]. De esta forma, la enzima COX-2 está implicada en la producción de prostaglandinas que participan en procesos de estrés, patológicos e inflamatorios [295].

En 2002, Chandrasekharan N.V. y col. identificaron por primera vez la tercera isoforma de ciclooxigenasa, COX-3, como una variante de maduración del ARNm transcrito desde el gen *cox-1*, que consiste en una forma de ciclooxigenasa-1 mal plegada [302]. Este estudio experimental llevado a cabo en perros se desarrolló para evaluar la inhibición de COX por Acetaminofeno (un fármaco analgésico y antipirético ampliamente utilizado), no estableciendo alguna relevancia de esta isoenzima en estados patológicos en la especie canina [302]. No hay estudios posteriores que avalen la actividad COX de la enzima COX-3 en la especie canina y su sensibilidad al Acetaminofeno, por su bajo nivel de expresión y los datos cinéticos disponibles, lo que indica que no es probable que esta interacción selectiva sea clínicamente relevante [303].

Ciclooxigenasa-2 y su relación con el cáncer

La inflamación es la mayor reacción de la inmunidad natural y tiene como objetivo defender al organismo frente a patógenos [304]. A pesar de que la primera evidencia de una conexión entre la inflamación y el cáncer data de hace más de un siglo, dicha relación sólo ha sido investigada recientemente, evidenciando

que existen varios tipos de cánceres altamente asociados a inflamación, como los cánceres de colon, de mama y de próstata [305, 306]. Esta hipótesis está avalada por los hallazgos sobre el microambiente tumoral, el cual se caracteriza por la infiltración de diferentes tipos de células inmunes, como las células dendríticas, los linfocitos y los macrófagos, responsables de la liberación de citoquinas, cuyo papel en la aparición de tumores ha sido establecida en muchos estudios [304].

La inflamación juega un importante papel en la iniciación del tumor mediante la producción dirigida de especies reactivas de oxígeno, responsables del daño al ADN, incrementando por tanto la tasa de mutaciones [307]. Esto también puede tener una implicación en la promoción tumoral, donde la inflamación dirige la secreción de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epitelial (EGF) y el fibroblástico (FGF), los cuales a su vez favorecen la proliferación de células tumorales iniciadas, mediante la determinación del balance entre proliferación celular y el estímulo de muerte celular [306], debido a la activación de diferentes vías de supervivencia celular [308]. Por otra parte, las diferentes citoquinas producidas durante la inflamación (TNF α , IL1 β , IL6 e IL8) pueden también activar varias vías de supervivencia para las células tumorales [309, 310].

Entre los diferentes mediadores de la inflamación, las enzimas COX parecen estar claramente implicadas en el cáncer, ya que están reguladas por factores de crecimiento y diversas citoquinas [311]. La primera evidencia de una relación potencial entre la enzima COX-2 y los cánceres en la especie humana se establece en 1994, cuando se demuestra que los niveles de ARNm de COX-2 se encuentran marcadamente elevados en carcinomas colorrectales [312].

La desregulación de la expresión de la COX-2 conduce a un incremento de la cantidad de su principal metabolito, la prostaglandina E2 (PGE2), cuyos efectos pleiotrópicos parecen afectar a la mayoría, si no a todas, las señas de identidad o características del cáncer [313]. Esta

capacidad de la vía COX-2/PGE2 para afectar a múltiples aspectos de la fisiología de la célula, requeridos para el desarrollo y el mantenimiento del tumor, puede ofrecer una explicación de la efectividad de los inhibidores de la COX y de las drogas antiinflamatorias no esteroideas (AINEs) en la reducción de la incidencia y progresión de tumores intestinales en modelos animales de cáncer, así como en pacientes humanos de cáncer.

La PGE2 ejerce sus acciones mediante la unión a cuatro receptores específicos de la superficie celular acoplados a la proteína G, denominados EP1, EP2, EP3 y EP4, y que parecen estar implicados en varios estados de carcinogénesis y en diferentes tipos de cáncer [314]. A pesar de las similitudes estructurales y de secuencia entre las cuatro series de receptores de prostaglandinas E (EP), estos están acoplados a diferentes vías de señalización intracelular [314]. La mayoría de los estudios indican que EP1, EP2 y EP4 promueven la carcinogénesis temprana, mientras que EP3 no solo no contribuye al comportamiento tumoral sino que además tiene un papel protector [314-316]. Sin embargo, en una publicación realizada en 2003 por Amano H. y col., los autores establecen que la activación del receptor EP3 se asocia al fenómeno de angiogénesis y de crecimiento tumoral en el desarrollo del cáncer de pulmón [317]. A través de estos receptores, la PGE2 es capaz de promover la proliferación y la supervivencia celular (mediante diferentes mecanismos, incluyendo la supresión de la apoptosis), promover la angiogénesis tumoral (a través de la producción de factores proangiogénicos como el factor de crecimiento vascular endotelial [VEGF] y el factor de crecimiento fibroblástico básico [bFGF]), incrementar la invasión celular y la metástasis, así como suprimir la respuesta inmune para que las células tumorales escapen a la inmunovigilancia [313, 318].

En el cáncer mamario de la mujer hay una limitada información disponible con respecto al papel de los receptores EP. La enzima aromataasa, que cataliza la biosíntesis del estrógeno, está totalmente regulada por la PGE2 a través de

los receptores EP1 y EP2 expresados en las células del estroma [319]. Por el contrario, la activación del receptor EP3 inhibe la expresión de la aromatasa [319]. En el estudio que se realiza en ratones en el que se compara tejido mamario normal con tejido mamario tumoral, se observa un incremento de la expresión de EP1, EP2 y EP4, existiendo un descenso de la expresión de EP3 [315]. Estos estudios sugieren que EP3 tiene un efecto protector contra el cáncer mamario en la mujer [314]. La hiperplasia mamaria, modulada por la expresión de COX-2, está mediada por el receptor EP2 [316]. La mayoría de los estudios indican que los receptores EP1, EP2 y EP4 promueven la carcinogénesis temprana, mientras que EP3 ni contribuye al comportamiento del tumor ni juega en realidad un papel protector [314].

En general, ciertas prostaglandinas, así como la enzima COX-2, pueden ayudar a la carcinogénesis alterando procesos celulares normales como la proliferación celular, la angiogénesis, la apoptosis, la inmunomodulación y el metabolismo carcinogénico [320].

Se ha demostrado que las prostaglandinas son capaces de modular la lipogénesis en cultivo celular dependiendo de la fase del ciclo celular de éstas y de la diversidad del metabolismo lipídico intrínseco [321]; dicha modulación puede ser de gran importancia en la proliferación celular y la carcinogénesis.

La angiogénesis es una función esencial para la proliferación celular y el crecimiento tumoral. Este proceso es fundamental para un sustento adecuado y un suplemento de oxígeno para las células que están dividiéndose y proliferando. Se piensa que la hipoxia tumoral es el principal estímulo para iniciar la angiogénesis [320]. El endotelio normal de los vasos sanguíneos expresa la enzima COX-1 mientras que el endotelio de los vasos sanguíneos angiogénicos expresa la COX-2 [322]. Las prostaglandinas PGE1, PGE2 y PGI2, y la enzima tromboxano sintasa parecen estar implicadas en diferentes pasos de la angiogénesis tumoral [323]. Diversos autores han observado que el fluido intersticial de algunos tumores era rico en prostaglandinas de la clase

E, que parecen ser los inductores angiogénicos más potentes [324, 325]. La sobreexpresión de la enzima COX-2 se ha asociado a un incremento en la biosíntesis de PGE2, la cual a través de todos sus metabolitos ayuda a la angiogénesis mediante la secreción de factores angiogénicos [320]. Se ha demostrado que ciertas citoquinas asociadas a tumores, como la IL-1, incrementan la expresión génica de la COX-2 y la vida media del ARNm de la COX-2 [323, 324]. Además, la enzima COX-2 y el receptor de tromboxano A2 dependientes de las vías de señalización activan la invasión celular y la angiogénesis [326].

En cuanto a la apoptosis, o muerte celular programada, se ha demostrado que la sobreexpresión de ciertas prostaglandinas, como la PGE2, mediante la COX-2 puede también mandar señales correctas en las células, estimulando así un crecimiento celular inapropiado o reduciendo la apoptosis [327]. Los estudios con AINEs que actúan mediante la inhibición de las enzimas COX revelan que éstas inducen la apoptosis en células cancerígenas y se señala que podía ser debido a la inhibición de la enzima COX-2, reduciendo por tanto los niveles de prostaglandinas en dichas células [328]. El gen Bcl-2 es un gen muy importante en la regulación de la apoptosis. En un estudio con una línea celular intestinal de ratones se demuestra que la sobreexpresión de la enzima COX-2 en células cancerígenas de dicha línea celular está asociada con la sobreexpresión del gen Bcl-2, que prolonga la vida de la célula inhibiendo la apoptosis [328]. La inhibición de las enzimas COX da como resultado una producción disminuida de prostaglandinas, conduciendo a la acumulación de sustratos, como el ácido araquidónico; dichos sustratos, cuando se presentan en una concentración aumentada en las células, estimulan la fragmentación del ADN y la conversión de la esfingomielina a ceramida en las células, que es un reconocido inductor de la apoptosis [329].

La alta concentración de ciertas prostaglandinas, como la PGE2, atenúa la respuesta inmune de los individuos previniendo la muerte de las células malignas [330, 331]. La

PGE2 muestra un potente efecto inmunosupresor actuando como un inhibidor de retroalimentación negativa, impidiendo así la actividad de las células T, la proliferación linfocitaria, la actividad de los macrófagos, la producción de anticuerpos, la producción de citoquinas por células inmunes, la actividad de las células “natural killer”, etc. [323, 331]. También se ha demostrado que los animales y las personas con cáncer tienen células dendríticas con función antigénica subóptima debido a la presencia del VEGF producido por los tumores, de la IL-10 y de las prostaglandinas, como la PGE2 [332].

Por último, al estudiar la influencia de las enzimas COX en el metabolismo carcinogénico, tenemos que el componente peroxidasa de las COX tiene amplia especificidad y puede oxidar una gran variedad de xenobióticos, incluyendo ciertos pro-carcinogénicos y carcinogénicos [320]. Los compuestos como las aflatoxinas, halógenos, pesticidas halogenados, etc., cuyos hidroperóxidos son generados en el organismo, actúan sobre el componente peroxidasa de la COX para formar carcinógenos mutagénicos. Las isoenzimas COX pueden también promover la formación de radicales peroxidasa durante la peroxidación lipídica y la reacción de hidroxiperoxidasas con metales o metaloproteínas. Estos radicales reaccionan con el ADN formando aductos nocivos de ADN dañando a éste [328, 331, 333].

El papel de la enzima ciclooxigenasa-2 en el cáncer mamario humano

La posible relación del cáncer de mama con la enzima COX-2 se postuló por primera vez al observar que los niveles de prostaglandinas en los tumores mamarios estaban elevados y especialmente en aquellos pacientes con metástasis [334].

En 2004, Chang S.H. y col. desarrollan estudios sobre los mecanismos moleculares por los que COX-2 induce angiogénesis asociada a los tumores, la cual es requerida para la iniciación y/o progresión del cáncer mamario en el ratón [315]. Otros autores también observan que la prostaglandina PGE2 induce angiogénesis

en estados tempranos del desarrollo tumoral, incluso antes de que se promueva una hiperplasia de la glándula mamaria, proporcionando una nueva explicación del papel de la angiogénesis en este proceso [315].

Se ha comprobado que la enzima COX-2 realza el fenotipo metastásico de las células de cáncer de mama in vitro y en los propios tumores [335]. El incremento de la expresión de dicha enzima ocurre en fases tempranas de esta lesión mamaria y puede ser detectado en el carcinoma ductal in situ [336] y en el carcinoma invasivo [337], observándose mayor expresión en los carcinomas ductales (63%) en comparación con los invasivos (43%) [336]. También se ha detectado en lesiones metastásicas [338] y en aquellas lesiones con características más agresivas o de peor pronóstico [339].

Existen diversos estudios en los que se han detectado inmunohistoquímicamente niveles elevados de COX-2 en aproximadamente el 40% de los carcinomas mamarios invasivos, obteniendo un rango de frecuencias individualmente que oscilan entre el 17% y el 84% [123, 340]. Recientemente, la expresión de COX-2 se ha asociado a un descenso del período de supervivencia libre de enfermedad [123] y de la supervivencia específica [341-343] en el cáncer mamario, sugiriendo que la inhibición de esta enzima tiene efectos anticancerígenos.

En los tumores mamarios benignos, se ha sugerido que la inflamación, especialmente la relacionada con las vías de COX-2, puede jugar un papel en la progresión de la enfermedad benigna mamaria hacia el carcinoma y que puede ser modificada mediante el empleo de antiinflamatorios no esteroideos [344]. La enzima COX-2 parece ser un biomarcador para aquellas mujeres con riesgo de desarrollar cáncer mamario, pudiendo ser una importante diana en la quimioprevención [345].

El papel de la enzima ciclooxigenasa-2 en los tumores mamarios de la especie canina

El primer estudio que documenta la expresión de COX-2 en los tumores mamarios caninos data

del 2003 y en él se demuestra que mientras que en el tejido de la glándula mamaria normal no se expresaba esta enzima, sí que lo hace en el tejido tumoral, siendo la inmunexpresión más frecuente e intensa en los tumores mamarios malignos (adenocarcinomas) que en los benignos (adenomas), de los que sólo un pequeño porcentaje (24%) muestra una expresión débil de COX-2 [96]. Desde este primer trabajo existen muchos otros que documentan la expresión de la enzima tanto en tumores mamarios benignos como en los malignos [97, 98, 121, 122, 346].

En general, los estudios elaborados en la especie canina muestran una relación significativa entre la expresión elevada de COX-2 y el desarrollo de metástasis distantes, así como con un peor pronóstico y un período de supervivencia más corto [27, 99].

Ciclooxigenasa-2 y su inducción por el oncogen HER-2

El origen tanto de los cánceres mamarios como de otros cánceres parece vincularse primariamente a células madre [347] que sufren una transformación a través de una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas facilitadas por mecanismos de iniciación tumoral, promoción e inestabilidad genómica [348]. Uno de los oncogenes mejor conocidos en el cáncer mamario es el HER-2, el cual puede regular a la enzima COX-2 [349] y una elevada expresión de COX-2 puede inducir muchos efectos tumorigénicos [350, 351].

Así, una sobreexpresión del oncogen HER-2 está asociada a un incremento de los niveles de COX-2 [352]. En 2010, Wang K.H. y col. demuestran en un trabajo realizado con líneas celulares, que el gen HER-2 puede regular al alza la expresión de la COX-2 a través de la fosforilación y activación de la vía del MAPK (proteínquinasa activada por mitógenos), ya que dicha expresión está parcialmente disminuida mediante un tratamiento con inhibidores selectivos de la actividad tirosin-quinasa de HER-2 [353]. En el estudio llevado a cabo por Subbaramaiah K. y col. en 2002, los autores detectan una elevada expresión de COX-2 en

14 de 15 muestras de cáncer mamario humano HER-2 positivo y en tan solo 4 de 14 muestras negativas para HER-2 mediante diferentes técnicas de hibridación e inmunoensayos enzimáticos [354].

Ciclooxigenasa-2 y su relación con los receptores de estrógenos

Diversos autores describen una relación entre ambos factores observando, a través del análisis de la función del receptor hormonal en la expresión de la COX-2, una relación inversa entre estas variables [123, 355, 356]. McCarthy K. y col. (2006) mediante el empleo de RT-PCR, aprecian una correlación significativa entre la expresión de la enzima COX-2 y la ausencia de expresión del receptor hormonal, indicando un peor pronóstico para el paciente, aunque con un aumento de la susceptibilidad a la quimioterapia [357].

2. TÉCNICAS PARA EVALUAR LA EXPRESIÓN DE LA CICLOOXIGENASA-2

Al igual que se ha evidenciado en el cáncer de mama en la mujer, mediante la inmunohistoquímica, la tinción de la enzima ciclooxigenasa-2 se localiza en las células epiteliales neoplásicas [358], donde la positividad se confirma por una tinción de las células de color marrón [27, 98, 346]. Los datos confirman que la sobreexpresión de esta enzima se observa entre el 56% y el 100% de los carcinomas mamarios en la especie canina [96-98, 122, 359], existiendo una marcada variación en el porcentaje de células tumorales positivas a COX-2 y en la intensidad de la expresión.

Es difícil comparar estos datos debido a la heterogenicidad en los tipos tumorales estudiados, la variabilidad de los anticuerpos, los procedimientos inmunohistoquímicos empleados y las diferencias en los sistemas de evaluación utilizados [346].

Para la llevar a cabo esta técnica los investigadores han utilizado varios métodos como el de la estreptavidina-biotina-peroxidasa [97, 100] o el método de la avidina-biotina-peroxidasa

[360]. Sin embargo, para estandarizar el procedimiento y reducir el error producido por la técnica, otros autores han realizado el análisis inmunohistoquímico con la técnica DAKO EnVision Plus [122]. Para llevar a cabo estos procedimientos se emplean anticuerpos anti-COX-2 monoclonales de conejo [27, 346] y de ratón [27, 361], o anticuerpos policlonales [96, 100].

La inmunotinción debe ser interpretada en las células tumorales con un determinado patrón de tinción citoplasmático [27, 96-99, 346], membranoso [346] o en regiones perinucleares [98, 99].

En los sistemas de puntuación inmunohistoquímicos se tienen en cuenta el número de células que muestra inmunorreactividad (porcentaje) y la intensidad de esta tinción (negativa, débil, moderada y fuerte). Así, la mayoría de los autores realizan un recuento semicuantitativo de las células inmunorreactivas que cuantifican en varios grados según el investigador; Doré M. y col., en 2003, expresan el porcentaje de células tumorales teñidas de las siguiente forma: 0 = <5% de las células positivas, 1 = 5-25%, 2 = 26-50%, 3 = 51-75% y 4 = >75% de las células positivas [96]. Otros autores hacen una adaptación de este recuento: 0 = 0%, 1 = <10%, 2 = 10-30%, 3 = 31-60%, 4 = >61% de células inmunorreactivas [27, 122]. También se han utilizado otros sistemas de cuantificación, como el empleado por Queiroga F.L. y col. (2007) o de Souza C.H. y col. (2009), cuyos resultados fueron valorados empleando el siguiente sistema de puntuación: 0 = 0%, 1 = 1-10%, 2 = 11-50%, 3 = 51-80% y 4 = >80% de las células reactivas [98-100, 362] o el empleado por Millanta F. y col. en 2006, que aplica un método de puntuación basado en la estimación del porcentaje de células inmunorreactivas en combinación con una estimación de la intensidad de la tinción. Los autores obtienen los siguientes valores 0 = ninguna célula inmunorreactiva, +1 = existe tinción citoplasmática débil difusa (puede contener intensidad fuerte en <10% de las células cancerígenas), +2 = de moderada a fuerte tinción granular citoplasmática en el 10-90% de las células tumorales y +3 = más del 90% de las

células cancerígenas presentan una tinción de intensidad fuerte [97].

Respecto a la medición de la intensidad de la reacción hay menos diferencias entre autores en cuanto a su puntuación, describiéndose en la mayoría de los trabajos los siguientes valores: 0 = negativo, + = débil, ++ = moderada y +++ = fuerte inmunotinción [27, 96, 98-100, 122, 362].

Finalmente, se le otorga a cada proceso neoplásico un índice total o final, el cual suele resultar de multiplicar el porcentaje de células tumorales inmunorreactivas y la intensidad de la tinción que estas presentan, obteniendo un título final que varía entre 0 y 12 [27, 99, 122, 362].

Aunque en algunos estudios se describe que el tejido mamario normal no expresa o tiene una expresión muy leve de la enzima [27, 96, 98, 359], en una investigación reciente se indica que la glándula mamaria canina normal expresa COX-2 con localización membranosa apical en contraste con la distribución citoplasmática de esta enzima en las células cancerígenas [346]. Los resultados de este último estudio sugieren que la localización membranosa de la COX-2 en tejido mamario normal puede estar relacionado con la participación de esta enzima en procesos fisiológicos implicados en el desarrollo y actividad de la glándula mamaria [346]. Así mismo, visualizan internalización citoplasmática de COX-2 que se podría relacionar con fases fisiológicas o patológicas proliferativas, explicando por tanto el patrón observado en muestras de tejido mamario en estado de diestro y en todas las muestras de lesiones neoplásicas [346].

En el estudio llevado a cabo en 2009 por Dias Pereira P. y col., distinguen expresión citoplasmática de COX-2 en el tejido mamario normal adyacente a las lesiones neoplásicas, aunque con un descenso en la intensidad de tinción, apuntando a la hipótesis de que la internalización de la enzima constituye un evento temprano en la transformación neoplásica maligna [346]. De acuerdo con Leo C. y col. (2006) esta inmunorreactividad puede reflejar la acción paracrina de las prostaglandinas derivadas de las células neoplásicas epiteliales antes de que

la detección histológica del fenotipo neoplásico sea posible [363].

Diversos autores aprecian una expresión citoplasmática de la enzima COX-2 de moderada a fuerte en el epitelio de un bajo porcentaje de tumores benignos (aproximadamente el 10%), mientras que en el caso de las neoplasias malignas dicho porcentaje es considerablemente mayor (en torno al 40%) [96, 98, 99, 346, 362]. Esta expresión es más intensa y más frecuente en áreas menos diferenciadas que exhiben signos de marcada atipia citológica [346].

En el trabajo de Dias Pereira P. y col. (2009) la mayoría de las lesiones metastásicas (53%) muestran una fuerte expresión de COX-2 y en casi todos los casos (83,3%) la intensidad de la tinción es similar o más fuerte que en la neoplasia primaria [346]. Estos resultados concuerdan con las investigaciones realizadas en medicina humana, sugiriendo que los productos metabólicos de la enzima tienen propiedades angiogénicas e incrementan la invasividad mediante la activación de las metaloproteinasas de la matriz, además de contribuir a la extensión metastásica de las células neoplásicas [364].

3. EXPRESIÓN DE CICLOOXIGENASA-2 EN LOS DIFERENTES TIPOS HISTOLÓGICOS DE TUMORES MAMARIOS CANINOS

A pesar de todas las investigaciones realizadas, existe una escasez de datos con respecto a la expresión de COX-2 en la glándula mamaria canina normal y dicha información es inconsistente [346]. Doré M. y col. (2003) no distinguen esta expresión mediante inmunohistoquímica en ninguna de las muestras de tejido mamario canino normal [96], mientras que en dos estudios posteriores, realizados también mediante inmunohistoquímica [98, 359], se hallan una de siete y dos de cuatro muestras positivas a COX-2, respectivamente. En el trabajo de Dias Pereira P. y col. (2009) se documenta una expresión de la enzima en el epitelio de las 22 muestras examinadas con una tinción membranosa moderadamente intensa, sugiriendo que, en la especie canina, esta enzima

puede estar expresada constitutivamente en este tejido [346]. Los datos de este último estudio son consistentes con los resultados que obtienen en 2006 Brunelle M. y col., quienes detectan una débil señal de COX-2 mediante análisis de western blot en una línea celular derivada de glándula mamaria canina normal [365].

Por lo que se refiere a la expresión de la enzima COX-2 en los diferentes tipos histológicos de tumores mamarios, se han desarrollado varios trabajos en los que se comprueba que los carcinomas mamarios expresan altos niveles de COX-2, incluyendo carcinomas tubulopapilares, anaplásicos, inflamatorios, carcinomas de células escamosas y carcinosarcomas [98, 100, 121, 122]. En el trabajo de Heller D.A. y col. (2005) se indica que los tumores más pobremente diferenciados expresan COX-2 con una intensidad más fuerte y con mayor frecuencia que aquellos tumores más diferenciados, como los adenocarcinomas [122], donde hay un mejor pronóstico; estos resultados son similares a los observados en el carcinoma de mama en la mujer [123]. En el estudio ya mencionado de Heller D.A. y col. [122], se obtienen los mismos porcentajes de positividad en la inmunotinción en los carcinomas mamarios malignos (56%) que en el trabajo llevado a cabo por Doré M. y col. (2003) [96]. Los autores comprueban que el 46% de los adenocarcinomas y el 100% de los carcinomas anaplásicos expresan la enzima COX-2 [122].

Para lesiones metastásicas, el estudio de Dias Pereira P. y col. (2009) mencionado anteriormente, muestra que el 58,3% de estas lesiones exhibe una fuerte expresión de la COX-2, lo que sugiere que dicha enzima promueve la angiogénesis y la invasividad de las células neoplásicas [346].

4. CICLOOXIGENASA-2 COMO FACTOR PRONÓSTICO

Desde que se conocieron los efectos de la enzima COX-2, principalmente sus efectos angiogénicos, muchos autores han intentado valorar su utilidad como factor pronóstico en diferentes tipos de neoplasias.

El estudio de 2003 de Denkert C. y col. es el primero en investigar el posible impacto pronóstico de las dos isoformas de la ciclooxigenasa en mujeres con carcinoma de mama primario [355]. Estos autores descubren que sólo la COX-2 está asociada con el pronóstico de las pacientes. Así mismo, establecen una correlación significativa entre su expresión y un tamaño tumoral mayor de 20 milímetros, el grado histológico, la afectación de los ganglios linfáticos regionales y la presencia de invasión vascular [355].

También en un trabajo realizado en el 2003, Shim J.Y. y col. valoran la expresión de COX-2 en 64 muestras de neoplasias mamarias en mujer y relacionan dicha expresión con diversos factores clinicopatológicos como el tamaño y el estadio de la enfermedad (mayor tamaño y estadio más avanzado), ambos significativamente correlacionados con la expresión de la enzima. Los autores también comprueban que la expresión de COX-2 es más frecuente en aquellas pacientes que desarrollan metástasis en ganglios linfáticos, sin expresión de receptores de estrógenos y progesterona, y con mayor grado histológico y pleomorfismo nuclear [366]. También observan que existe positividad para la enzima en las células peritumorales, tanto en las estromales, como en las endoteliales e inflamatorias mononucleares, pudiendo ejercer un efecto paracrino sobre las células tumorales [366]. Dichos autores plantean que las células epiteliales cercanas a las estromales podrían ser asiento para una posterior neoplasia.

Sin embargo, no todos los estudios muestran positividad para COX-2 en las células peritumorales, con lo que sería difícil explicar que su expresión en las células tumorales se relacione con un aumento en la proliferación de las células endoteliales [123, 338].

En cuanto a los resultados del trabajo llevado a cabo por Kulkarni S. y col. en 2008, estos muestran que una fuerte expresión citoplasmática es un factor de predicción independiente de tener un mayor riesgo de recurrencia en casos de carcinoma ductal mamario y que además el riesgo de recurrencia asociado a la expresión de

COX-2 es independiente del tamaño tumoral, el estado de los márgenes, la positividad de los receptores de estrógenos, el uso de radioterapia y de tamoxifeno [367].

Más recientemente, Glynn S.A. y col. (2010) en el estudio en el que se utiliza la expresión de COX-2 para predecir el período libre de enfermedad en pacientes negativos al receptor de estrógenos y que expresen el oncogen HER-2, aprecian que la alta expresión de la COX-2 está significativamente asociada con una supervivencia más baja en pacientes con cáncer de mama ER negativos, pero no hallan relación entre la expresión de la enzima y la supervivencia en los pacientes ER positivos. Los autores también afirman que COX-2 se asocia a un descenso significativo de la supervivencia en pacientes con tumores mamarios que sobreexpresaban el oncogen HER-2 [368]. En este mismo estudio se demuestra, mediante un análisis multivariante, que la expresión de la enzima COX-2 es un factor de predicción independiente de mal pronóstico en tumores mamarios en la mujer ER negativos y con sobreexpresión del oncogen HER-2 [368].

En cuanto a los tumores mamarios en la especie canina, no hay demasiada información disponible sobre el significado pronóstico de la expresión de la enzima COX-2. En el primer trabajo en el que se intenta establecer esta posible relación se aprecia que el 100% de los tumores mamarios malignos expresan esta enzima (79% con una elevada expresión), mediante técnicas inmunohistoquímicas utilizando un anticuerpo anti-COX-2 de caprino, estando su expresión significativamente correlacionada con un mal pronóstico. Los autores de este estudio no proporcionan detalles sobre la duración del período de supervivencia de las pacientes analizadas. [97]. En el trabajo inmunoenzimático llevado a cabo por Queiroga F.L. y col. (2005), donde los niveles de COX-2 son determinados mediante un ensayo, se halla una asociación entre altos niveles de COX-2 y un mal pronóstico para la paciente, correlacionando los niveles de la enzima con determinadas características clínicas de malignidad como son el mayor

tamaño tumoral, la ulceración de la piel, la adherencia a piel y planos profundos y las metástasis a ganglios linfáticos regionales y/o a zonas distantes [121]. En dos estudios más recientes también se han encontrado una relación significativa entre una expresión elevada de la enzima y el desarrollo de metástasis distantes, un peor pronóstico y un período de supervivencia más reducido [27, 99].

5. INHIBICIÓN DE CICLOOXIGENASA-2 COMO HERRAMIENTA PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

A pesar de los últimos progresos realizados en la investigación del cáncer y de las diferentes estrategias para eliminar células cancerígenas, existen diferentes tumores que son resistentes a los tratamientos convencionales terapéuticos, es decir, radioterapia, quimioterapia y terapia fotodinámica [311].

Muchos agentes anticancerígenos, incluyendo el 5-fluorouracilo, la ciclofosfamida y los anticuerpos monoclonales como el trastuzumab, han demostrado tener gran eficacia en la extensión del período de supervivencia de pacientes con cáncer de mama; sin embargo, los mecanismos por los cuales estos agentes inhiben la progresión del cáncer no se comprenden todavía completamente [369]. A pesar de que se han desarrollado muchos agentes anticancerígenos prometedores y que muestran un gran potencial en los ensayos preclínicos, los agentes quimioterapéuticos clásicos, como la doxorubicina, se siguen utilizando ampliamente en las pacientes [369].

Los inhibidores de COX-2 juegan un papel muy importante en la prevención del cáncer. De hecho, la toma crónica de AINEs es capaz de reducir consistentemente la aparición e incidencia de muchos tipos de cáncer, como el cáncer de mama [339]. Muchos estudios muestran evidencias genéticas, farmacológicas y epidemiológicas que sostienen que los inhibidores de COX-2 son responsables de una inhibición de la proliferación celular e inducción de la apoptosis en muchos modelos diferentes de

células cancerígenas, lo cual hace que se tenga en cuenta un posible uso de estos inhibidores en la prevención y en futuros protocolos terapéuticos, administrados solos o en combinación con otros protocolos anticancerígenos para provocar la muerte celular [311, 370]. En modelos animales, más concretamente en una investigación desarrollada en ratas, el tratamiento con inhibidores selectivos de la COX-2 reduce el crecimiento y la formación de metástasis en tumores desarrollados experimentalmente, destacando el papel emergente de estos inhibidores específicos en la prevención y tratamiento de los tumores malignos [355, 371]

La enzima COX-2 puede ser diana de varios compuestos que pueden inhibir sus funciones. La primera generación de antiinflamatorios no esteroideos puede afectar a ambas isoformas de la COX, aunque preferentemente incumbe a la COX-2 [311]. Los mecanismos de acción no están completamente dilucidados, lo que se complica con el hecho de que diferentes agentes parecen actuar sobre distintas vías. Así, diferentes AINEs se unen al lugar activo de la COX-2, lo que ocurre normalmente mediante una inhibición competitiva reversible (ibuprofeno, naproxeno, etc.), mientras que la aspirina, en contraste, es capaz de acetilar el sitio activo de la COX en una residuo serina, llevando a una inhibición irreversible [311]. Posteriormente, se ha desarrollado una nueva generación de inhibidores selectivos de la COX-2, llamados “coxib”, con una gastrotoxicidad mucho menor y que actúan como inhibidores competitivos en el lugar activo de COX-2, presentando mayor especificidad [372]. Los problemas derivados del uso de estas sustancias se relacionan con la necesidad de una administración a largo plazo, ya que se ha descrito una correlación entre su consumo y un incremento en el riesgo de infarto de miocardio [372]. Por este motivo, se han desarrollado investigaciones enfocadas a estudiar el uso de los AINEs tradicionales en contraposición al empleo de los inhibidores selectivos de la COX-2, alguna de estas investigaciones sugieren que los “coxib” pueden incrementar realmente los riesgos cardiovasculares, pero sólo en pacientes que

presentan otros factores de riesgo cardiovascular, como una presión sanguínea elevada y un metabolismo lipídico alterado [373, 374]. Estos resultados sugieren que su uso debería limitarse a pacientes con un bajo riesgo de complicación cardiovascular a las que debería aplicarse previamente análisis de múltiples biomarcadores [375, 376].

Los inhibidores de la ciclooxigenasa-2 en combinación con la quimioterapia

El mayor problema del uso de la quimioterapia para tratar muchos tipos de cánceres (incluido el cáncer de mama) es la supervivencia y/o el desarrollo de una resistencia intrínseca o adquirida a las drogas, lo cual conduce a la recurrencia de la enfermedad y a las metástasis. Esta resistencia esta mediada por numerosos mecanismos, incluyendo la sobreexpresión de las proteínas implicadas en la inhibición de la apoptosis (es decir, Bcl-2), lo que conduce a la insensibilidad de las células tumorales al estímulo apoptótico, a una regulación al alza de la reparación del ADN, a la alteración de las dianas, a la regulación al alza de la detoxificación enzimática (glutatión-transferasas) y a la extrusión de drogas quimioterapéuticas por la sobreexpresión de proteínas cassette de unión a ATP, como la MRP (proteína asociada a la resistencia multidrogas) y la BCRP (proteína de resistencia del cáncer de mama), ya que estas proteínas regulan la absorción, la distribución y la excreción de varios componentes farmacológicos; consecuentemente, los agentes quimioterapéuticos son expulsados inmediatamente de las células [377].

En los años 90, se llevan a cabo investigaciones que sugieren que la capacidad de las células tumorales para adquirir un fenotipo agresivo puede ser el resultado de la acumulación de alteraciones genéticas, consecuencia de una supervivencia prolongada [378, 379].

Recientemente, los inhibidores de COX-2 han mostrado una habilidad para sensibilizar a las células tumorales a los agentes quimioterapéuticos en varios modelos animales y en diversos ensayos clínicos [380-384]. Todos los datos sugieren que COX-2 está implicada en las rutas apoptóticas y

de resistencia multidrogas y que los inhibidores selectivos de COX-2 podrían ser utilizados para mejorar la eficacia de la quimioterapia [311].

Varios laboratorios han investigado el mecanismo por el que las células de cáncer mamario llegan a ser resistentes a la doxorrubicina, así como el perfil molecular de las células que son resistentes a este agente quimioterapéutico [385, 386]. El gen Bcl-x1 es el responsable de la adquisición de resistencia a los agentes quimioterapéuticos, como la doxorrubicina, dando como resultado un descenso de la apoptosis y un incremento de la supervivencia de las células del cáncer de mama [387].

En cuanto al papel de COX-2 como regulador de la resistencia a la quimioterapia en el cáncer mamario, se demuestra que la expresión de la enzima es indicativa de un fenotipo agresivo que es resistente a la doxorrubicina [342]. El estudio de COX-2 y su asociación con la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante en el cáncer de mama es necesario ya que la identificación de biomarcadores permite hallar al grupo de pacientes que puede beneficiarse de un tratamiento que conserve intacta la glándula mamaria, estando sometidos a una menor toxicidad [356]. Los inhibidores selectivos para COX-2 se han desarrollado como agentes antiinflamatorios y también se ha visto que tienen propiedades anticancerígenas en pacientes con cáncer de mama en riesgo de recurrencia de la enfermedad [388]. Además, la inhibición de COX-2 tiene un destacado efecto disminuyendo la resistencia a las drogas y el potencial metastásico de las células cancerígenas [388]. Eliminando COX-2 con pequeños fragmentos de ARN de interferencia o utilizando inhibidores de COX-2 se suprime el crecimiento celular y la capacidad de invasión, mejorando la quimiosensibilidad del cáncer de mama [382, 389, 390].

Recientemente, dos ensayos clínicos aleatorios examinaron la eficacia de un inhibidor de COX-2, el celecoxib, en combinación con un inhibidor de la aromataasa, el exemestane, en mujeres menopáusicas con cáncer de mama metastásico sensible a factores hormonales [391,

392]. Ambos estudios fueron llevados a cabo fundamentalmente en pacientes positivas al receptor de estrógenos, encontrando un beneficio clínico significativo con el uso combinado de ambos fármacos [391, 392]. Los resultados alcanzados en el trabajo de Glynn S.A. y col., en 2010 [368], son consistentes con los de los anteriores estudios y sugieren que la eficacia de los inhibidores de COX-2 podría ser bastante limitada en el cáncer de mama positivo a receptores de estrógenos, por lo que el beneficio de estos inhibidores como terapia sería mayor en pacientes negativos a receptores de estrógenos y positivos a HER-2 [391, 392].

Por otra parte, Millanta F. y col. (2006) respaldan la hipótesis de que el efecto antineoplásico de los inhibidores de HER-2 se refuerza al combinarlos con inhibidores de la enzima COX-2 [97].

Otra estrategia discutida en la literatura es el uso de antagonistas de los receptores EP. De hecho se ha demostrado que estos fármacos antagonistas pueden disminuir la proliferación e invasión celular [317, 393]; lo cual podría suponer una modalidad terapéutica más específica para limitar los efectos secundarios de los inhibidores clásicos de COX-2 [311].

Obviamente, la estrategia de apuntar hacia varias vías de señalización de las prostaglandinas simultáneamente puede ser crítica para mejorar la eficacia no sólo de la terapia con un agente único sino también la terapia de modalidad combinada en la prevención y tratamiento del cáncer de mama y otros cánceres humanos [312].

El manejo clínico de la enfermedad neoplásica mamaria en la especie canina es complicado ya que, excluyendo el tratamiento quirúrgico, hay muy pocas opciones terapéuticas efectivas. Los animales con metástasis en ganglios linfáticos regionales o con metástasis distantes representan un importante desafío para los clínicos porque no se ha descrito ningún protocolo quimioterápico efectivo como terapia adyuvante [394]. Consecuentemente, la búsqueda de nuevas modalidades terapéuticas permanece como un problema de importancia actual y de interés para

los investigadores y los clínicos [84, 93, 395]; sin embargo, hay muy poca información publicada con respecto al empleo de los antiinflamatorios no esteroideos para el tratamiento del cáncer mamario en la perra.

En un estudio de Souza C.H. y col. (2009) se describe una mejoría clínica en perros con carcinoma inflamatorio tratados con doxorrubicina al administrarla conjuntamente con piroxicam [100]. En 2006, Millanta F. y col. sugieren que COX-2 es una diana potencial para estrategias terapéuticas y preventivas en el tratamiento de los tumores mamarios caninos [97].

En el trabajo llevado a cabo por Wang L.S. y col. en 2006, utilizan un modelo mamario canino para investigar si el microambiente de esta glándula modulado por ácido linoleico conjugado (CLA) (un producto natural producido por fermentación en el rumen y que se encuentra en productos alimenticios procedentes de rumiantes) es capaz de alterar la señalización de la prostaglandina E2. Tras realizar dicho estudio los investigadores concluyen que el CLA interrumpe la señalización autocrina y paracrina, por lo que recomiendan el consumo de leche de rumiante y de productos derivados de carne de res que contengan CLA como agentes quimiopreventivos y quimioterapéuticos potenciales [396].

Uso de inhibidores de la ciclooxigenasa-2 en combinación con la radioterapia

La radioterapia es un tratamiento común utilizado para tumores sólidos, como los de mama, próstata, pulmón y los de localización colorectal. Se sabe que las propiedades anticancerígenas de la radiación ionizante se deben a mecanismos pleiotrópicos que conducen a que el ADN de doble hélice se rompa en las células en proliferación, lo que desencadena la activación de las rutas de daño al ADN (como el gen p53), seguida de la inducción de la apoptosis [397].

La importancia de los miembros de la familia de Bcl-2 durante la apoptosis sugiere que las proteínas pro-supervivencia (es decir, Bcl-2

y Bcl-xL) juegan un importante papel en la radioprotección de las células tumorales [397]. La ruta del NFκB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) regula el nivel de la COX-2, sugiriendo que ésta juega un papel en la resistencia a la radioterapia [398]. Se sabe que durante la radioterapia, NFκB puede ser regulado al alza debido a la liberación de especies reactivas de oxígeno y a la inflamación (PGE2) [399].

Sin embargo, la combinación de los inhibidores de COX-2 con la radioterapia puede llevar también a una reducción de la eficacia de esta última [311]. Se ha demostrado que el inhibidor selectivo de COX-2, nimesulide, disminuye la eficacia de la radiación en dos líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello, lo que sugiere que la sensibilización de las células tumorales a la radiación debe ser fuertemente dependiente del tipo de célula tumoral [400].

III. Materiales y Método

1. ANÁLISIS DE LA PATOLOGÍA ONCOLÓGICA DE LA GLÁNDULA MAMARIA DE LA ESPECIE CANINA EN EL PERÍODO COMPRENDIDO ENTRE 2008-2012.

SUJETOS DE ESTUDIO

Para la realización de esta parte del estudio se han recogido datos de las fichas clínicas de 858 pacientes hembras de la especie canina mayores de 5 años, que han sido atendidas en el Servicio de Cirugía del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Extremadura, durante el período de tiempo comprendido entre enero de 2008 y diciembre de 2012.

Como fuente de nuestros datos se ha utilizado la base de datos de la consulta del Servicio de Cirugía del Hospital Clínico Veterinario, así como su archivo de historias clínicas.

MÉTODO

Justificación del método.

Existen numerosos estudios en la bibliografía que avalan la importancia que tienen en las hembras de la especie canina los tumores mamarios, siendo éstos el mayor problema de salud para ellas [400] y mostrando así mismo una significativa tendencia hacia la malignidad en los últimos años. Por tanto, los tumores mamarios en esta especie han sido objetivo principal de intensas investigaciones por parte de oncólogos y patólogos veterinarios.

Con el fin de valorar la epidemiología, características de la enfermedad, influencia de los factores de riesgo en la evolución de las pacientes y, en general, la situación e importancia clínica

de la patología tumoral mamaria en la hembra adulta de la especie canina en nuestra región, hemos llevado a cabo este estudio.

Descripción de la muestra

Para llevar a cabo el estudio y obtener información precisa acerca del perfil de las pacientes, según la patología con la que acudieron a la consulta de nuestro hospital, se obtienen los datos epidemiológicos y clínicos de sus historiales clínicos. Para ello, se han formado cuatro grupos de pacientes:

- Grupo I: incluyen a todas las pacientes del estudio (nI=858). En este grupo se congregan los Grupos II y III descritos posteriormente.
- Grupo II: incluyen a las pacientes que acudieron a la consulta con una patología no tumoral (nII=482).
- Grupo III: en este grupo se incluyen a aquellas pacientes del grupo I que presentaban cualquier tipo de tumor (nIII=376).
- Grupo IV: a partir del grupo de pacientes con patología tumoral (Grupo III) se forma este grupo diferente en el que se incluyen aquellas pacientes con tumores mamarios (nIV=227).

Descripción de las variables de estudio:

Analizando el conjunto de los datos medidos a cada paciente se han seleccionado las siguientes variables para nuestro estudio:

1. Raza: cada una de las pacientes ha sido clasificada según los caracteres que hayan perpetuado a través de la herencia. Basándonos en la actual Nomenclatura de Razas de la Fédération Cynologique Internationale del año 2013, se han categorizado a dichas pacientes en

los siguientes grupos [401]:

- Grupo 1: Perro de Pastor y Perros Boyeros (excepto Perros Boyeros Suizos).
- Grupo 2: Perros Tipo Pinscher y Schnauzer - Molosoides - Perros Tipo de Montaña y Boyeros Suizos.
- Grupo 3: Terriers.
- Grupo 4: Teckels.
- Grupo 5: Perros Tipo Spitz y Tipo Primitivo.
- Grupo 6: Perros Tipo Sabueso, Perros de Rastro y Razas Semejantes.
- Grupo 7: Perros de Muestra.
- Grupo 8: Perros Cobradores de Caza - Perros Levantadores de Caza - Perros de Agua.
- Grupo 9: Perros de Compañía.
- Grupo 10: Lebreles.
- Grupo 11: Perros mestizos. Este grupo incluye a todas aquellas pacientes que no muestran caracteres propios de ninguna de las categorías anteriores por ser cruce de dos o más razas.

2. Mestizaje: se obtiene a partir de la variable “Raza”, considerando si su raza es pura o no. De esta manera la variable dicotómica “Mestizaje” toma los valores “Puros”, en el que se incluye a todas las pacientes pertenecientes a los Grupos del 1 al 10 de la variable “Raza”; y “Mestizos”, que incluye a aquellas pacientes mestizas o cruzadas (Grupo 11 de la variable “Raza”).

3. Edad: esta variable contiene las edades de todas las pacientes medidas en años. Solamente se han incluido en el estudio las pacientes con edades iguales o superiores a los 5 años (edad a partir de la cual comienza la aparición de tumores de tipo mamario en las pacientes de nuestro estudio).

4. Peso: en esta variable se recoge el peso real en kilogramos de cada paciente.

5. Tamaño: la variable “Peso” ha sido categorizada en función de los estándares

raciales [10]. De esta forma se ha creado la variable “Tamaño”, dividiendo a las pacientes en dos grupos:

- Grandes: > o igual a 25 Kg.
- Pequeños: < 25 Kg.

6. Tipo de patología: para esta variable se ha realizado la siguiente división de patologías, teniendo en cuenta sólo a aquellas que se tratan en la consulta del Servicio de Cirugía del Hospital Clínico Veterinario de la UEx:

- Traumatología.
- Oftalmología.
- Dermatología.
- Gastroenterología.
- Estomatología.
- Otorrinolaringología.
- Patología reproductiva.
- Neurología.
- Urología.
- Cardiorrespiratorio.
- Oncología.

Debido a las categorías de esta variable, “Tipo de patología”, sólo ha sido analizada en el Grupo I (Grupo general), ya que los Grupos II, III y IV solo incluyen a pacientes con una patología exclusivamente oncológica.

7. Tipo de tumor: esta variable sólo se ha contemplado en el grupo de pacientes con patología tumoral (Grupo III), ya que en el Grupo II ninguna de las pacientes presenta tumores y las pacientes del Grupo IV sólo manifiestan tumores de tipo mamario. Por la misma razón, tampoco se ha tenido en cuenta esta variable en el Grupo I, al estar comprendido por la unión de todos los grupos (II, III y IV), dos de los cuales ya hemos excluido. Se realiza una división en 2 grupos:

- Tumores de mama.
- Otros tipos de tumores.

8. Malignidad: para esta variable se tiene en cuenta únicamente si el tumor es maligno o benigno, en aquellos casos en los que haya

sido posible realizar un estudio citológico o histopatológico. Esta variable sólo se ha podido valorar en los grupos con patología tumoral (Grupos III y IV), porque en el Grupo II las pacientes no padecen ningún tipo de tumor y en el Grupo I, como ya se ha aclarado anteriormente, se encuentran incluidas todas las pacientes.

2. ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS PRONÓSTICO: CLÍNICOS, MORFOLÓGICOS E INMUNOHISTOQUÍMICOS EN CARCINOMAS MAMARIOS CANINOS DURANTE EL PERIODO COMPRENDIDO ENTRE 2008 Y 2012.

SUJETOS DE ESTUDIO

Esta parte del trabajo conforma el grueso de todo el estudio, en la cual se efectúa un análisis prospectivo de 78 pacientes a los que se les realiza el seguimiento desde que acuden a la consulta del Servicio de Cirugía del HCV de la Universidad de Extremadura para su diagnóstico hasta su evolución final, en el momento de finalización del estudio (Junio 2015).

MÉTODO

Justificación del método

A las clínicas veterinarias llegan diariamente pacientes que presentan tumores mamarios, en ellas es importante conocer diferentes factores que permitan establecer un pronóstico inicial y un adecuado tratamiento [8]. La predicción del comportamiento postquirúrgico es necesaria, pudiéndose emplear diversos parámetros clínicos y patológicos para establecer cual es la probabilidad de aparición de recidivas y/o metástasis [8].

En cuanto a factores clínicos que nos proporcionan información sobre el pronóstico, se ha estudiado la influencia de los diferentes tipos de razas sobre esta patología, así como el tamaño del individuo [10]. También se ha establecido una asociación entre la edad avanzada de la paciente con un período libre de

enfermedad y supervivencias más cortas [11, 12]. Sin duda, los factores pronósticos clínicos que nos permiten establecer un pronóstico adverso con mayor seguridad son un estadio avanzado mediante la clasificación TNM [13, 14], un tipo de crecimiento invasivo y rápido, así como la aparición de ulceración en la piel [8, 14].

Entre los parámetros morfológicos de utilidad pronóstica recomendados destacan la clasificación histológica [15], el grado de diferenciación nuclear [16], el índice mitótico [16] y la presencia de infiltrado inflamatorio en el tumor, que se considera una evidencia de actividad inmune contra el crecimiento neoplásico [21, 22]. Aunque en nuestro estudio se han valorado todos estos parámetros independientemente, se considera sólo el grado de malignidad tumoral como variable, aunando el grado de diferenciación nuclear junto con el porcentaje de formación tubular y el índice de mitosis.

Otros tipos de marcadores tumorales empleados en medicina veterinaria son los inmunohistoquímicos. Al igual que en el cáncer de mama de la mujer, una alta expresión de receptores de estrógenos se asocia a un mejor pronóstico, y la pérdida de estos receptores y de los receptores de progesterona a una progresión desfavorable de la enfermedad [23]. Además, el estado de estos receptores puede ser beneficioso para identificar aquellas pacientes que pueden responder a la terapia antiestrogénica [25]. En cuanto a la enzima ciclooxigenasa-2, se ha establecido una asociación entre unos niveles elevados y un mal pronóstico, correlacionándose con características clínicas de malignidad [26, 27]. La evaluación del estado de c-erbB-2 en los tumores de mama es muy importante, ya que diversos autores han establecido sobreexpresión de esta proteína en los procesos mamarios malignos, así como una correlación positiva entre éste y otros marcadores morfológicos, como el índice mitótico y el grado de diferenciación nuclear [28].

Con el conjunto de datos obtenidos se pretende establecer la gravedad de la enfermedad, el pronóstico de cada paciente y la evaluación de

los diferentes marcadores clínicos, morfológicos e inmunohistoquímicos.

Criterios de inclusión de pacientes en el estudio.

Las pacientes que se han incluido en este estudio han sido escogidas al azar entre todas aquellas que llegaron a la consulta para el diagnóstico de tumores mamarios en el período de tiempo comprendido entre enero de 2008 y diciembre de 2012. Posteriormente, tras la realización de la biopsia y obtención del diagnóstico histopatológico del tumor, se seleccionaron a aquellas pacientes con tumores mamarios de carácter maligno y con un diagnóstico de carcinoma a las que se les ha podido realizar seguimiento.

Por otra parte, también se han excluido del trabajo a aquellas pacientes que, previo diagnóstico de neoplasia maligna mamaria, sus propietarios optaran por establecer un tratamiento de quimioterapia adyuvante, para no interferir en el estudio de la evolución respecto al resto de pacientes.

Descripción de la muestra.

Al igual que en la primera parte del estudio, para obtener información más precisa del perfil de las pacientes, se han extraído datos clínicos y epidemiológicos de las fichas clínicas de cada una de ellas.

Tras realizar una primera exploración de la paciente en la consulta (Figuras 2-4), estableciendo un diagnóstico de patología mamaria, el veterinario clínico procede a la elaboración de un historial clínico más concreto mediante una ficha específica de dicha enfermedad (Anexo 1).

Posteriormente, se llevan a cabo todos los análisis y pruebas complementarias (Figura 5) previas a la elección y realización del tratamiento quirúrgico correspondiente.

Durante la intervención (Figuras 6 y 7) se han extirpado los ganglios linfáticos regionales inguinales, salvo en los casos en que ha sido posible por el tipo de técnica quirúrgica realizada a cada paciente.



Figura 2: Paciente con tumor mamario de rápido crecimiento.



Figura 3: Aspecto de una recidiva de un tumor mamario tras mastectomía simple de la glándula mamaria afectada.

Tras la extirpación quirúrgica, las biopsias son remitidas al Servicio de diagnóstico de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Veterinario de la UEx junto con la solicitud de estudio, en la que el cirujano refleja la historia clínica del paciente, el tratamiento aplicado, así como aquellos datos que este consideran de interés para el diagnóstico de la muestra.

En el laboratorio las muestras son valoradas macroscópicamente, recogiendo todos aquellos datos de utilidad diagnóstica. Se procede a la identificación de márgenes quirúrgicos de aquellas zonas seleccionadas por el cirujano o de interés diagnóstico para el patólogo, mediante el colorante Tissue Marking Dye (Blue) (Bio-Optica). Posteriormente, y según el tamaño de la biopsia, se procede a la sección de esta (Steril Surgical Blades. Braun) realizando en las neoplasias de medio a gran tamaño cortes

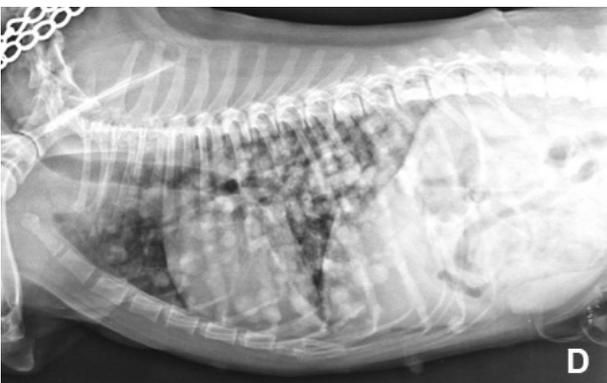


Figura 5: Radiografía lateral del tórax en una paciente con neoplasia mamaria en la que se aprecian metástasis pulmonares.



Figura 4: Imagen de un tumor mamario con presencia de ulceración en la piel.

paralelos a intervalos regulares, seleccionándose aquellas áreas representativas de la lesión, las cuales son introducidas en un tarro con tapa precintable (Deltalab) que contiene un volumen adecuado de una solución de formaldehído al 3,5-4,0% pH 7 (Scharlau). Tras su correcta fijación, las muestras son talladas dentro de una campana de extracción de gases (EUROAIRE TDI modelo FAGV80). Las neoplasias de pequeño tamaño son valoradas íntegramente, tallando estas según el denominado método radial.

Las piezas tisulares obtenidas se introducen en un casete de inclusión tisular (Scharlau) siendo procesadas en el procesador de tejidos Leica TP 1020. La primera etapa de este proceso corresponde a la Deshidratación o eliminación del agua del tejido a través de una cadena ascendente (70%, 96% y 100%) de etanol (Panreac). La segunda etapa es el Aclaramiento y en ella, gracias al empleo de xileno (Scharlau), se fomenta la penetración en el tejido del medio de inclusión. El procesado finaliza con la etapa de Inclusión, que corresponde a la fase de infiltración de la muestra con el medio de inclusión favoreciendo su dureza y facilitando la obtención de los posteriores cortes. El medio de inclusión empleado es parafina plástica de 52-54° C (Scharlau).

Tras finalizar el procesado se realizan los correspondientes bloques utilizando moldes metálicos precalentados (Estación DDM0065 Medim) y parafina plástica de 56-58° C (Scharlau) fundida y suministrada a través del dispensador de parafina P Selecta. Los



Figura 6: Mastectomía en bloque (resección de 3ª, 4ª y 5ª mamas) en una hembra que presenta afectación en la 4ª y 5ª glándulas mamarias simultáneamente.



Figura 7: Apariencia de la incisión quirúrgica en una paciente tras una mastectomía radical en cadena mamaria izquierda.

bloques solidifican mediante una estación de refrigeración (DDM0064 Medim). De los bloques obtenidos se realizan cortes de 5 μ m. de grosor (Microtomo Leica RM 2255/ Cuchillas Desechables Leica DB80 HS) que se extienden en un baño termostático (P Selecta), siendo recogidos posteriormente mediante portaobjetos de banda mate (Thermo scientific. Menzel-Gläser) y secados al aire para evitar su desprendimiento. Antes de su tinción los cortes se desparafinan en estufa a 60° C (Eurotherm). Las secciones son coloreadas con las técnicas histoquímicas de rutina necesarias para su diagnóstico, siendo protegidas mediante la colocación de un cubreobjetos de 24x60 mm. (Menzel-Gläser) previa deshidratación de los cortes en una cadena ascendente de etanol, y posterior aclarado en xilol, gracias al empleo del medio de montaje DPX (Scharlau)®.

La valoración microscópica y posterior captura de imágenes representativas de las alteraciones se ha efectuado mediante el fotomicroscopio Nikon Eclipse 80i con cámara fotográfica Nikon DS-Fi2, la unidad de control Nikon DS-U3 Capture Interface y el programa de captura de imágenes Nis-Elements.

En aquellas pacientes (n=2) cuyos propietarios, tras la pérdida de calidad de vida de su animal como consecuencia de la diseminación de la lesión cancerosa, toman la decisión de eutanasiarla en dependencias del Hospital Clínico Veterinario de la UEx y autorizan el estudio postmortem del cadáver, se lleva a cabo la necropsia siguiendo el método de evisceración de Roskitansky. Con dicho método se extraen las vísceras de las diversas cavidades corporales, permitiendo la valoración de los cambios macroscópicos y la

posterior toma de muestra para el correspondiente estudio histopatológico. Las muestras, fijadas en formaldehído tamponado, son manipuladas en el laboratorio tal y como se ha indicado anteriormente para las biopsias, hasta la obtención de las correspondientes preparaciones histopatológicas. Dichas preparaciones son nuevamente valoradas con el fotomicroscopio Nikon Eclipse Ci.

El estudio inmunohistoquímico se realiza sobre secciones de 5 μm . de grosor obtenidas de los bloques elaborados para el estudio histopatológico. Las secciones son recogidas mediante portaobjetos específicos para inmunohistoquímica (FLEX IHC Microscope Slides. Dako) y mantenidas en estufa (P Selecta) a 37° C durante toda la noche. La técnica inmunohistoquímica se desarrolla utilizando el sistema de visualización de alta sensibilidad EnVision™ FLEX Mini Kit, High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus. Dako). Para el pretratamiento de las muestras (desparafinación, rehidratación y recuperación antigénica) se utiliza el módulo PT Link (Dako) (Figura 2) junto con la dilución del correspondiente retrieval, según el anticuerpo utilizado (EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH/Low pH (50x). Dako), llevando las secciones hasta 95°C.

Tras enfriar las secciones estas se introducen



Figura 8: Módulo PT Link (Dako)

en dos tanques que contienen una solución al 5% de EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (Dako) (durante 5 y 20 minutos respectivamente). Posteriormente la reacción prosigue en una cámara humidificada procediéndose al bloqueo durante 5 minutos de la peroxidasa endógena (EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent) (Dako) y al lavado de los cortes con la solución EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (Dako).

El procedimiento continúa con la incubación de las secciones durante 30 minutos con el anticuerpo primario:

- Anti-Receptor de la Progesterona humano, anticuerpo monoclonal de ratón IO Path®. Clon PR10A9. Prediluido (Beckman Coulter).

- Anti-Receptor de Estrógeno α humano, anticuerpo monoclonal de ratón. Clon 1D5. Dilución 1:35 (Dako).

- Anti-COX-2 humano, anticuerpo monoclonal de ratón. Clon CX-294. Dilución 1:100 (Dako).

- Anti-c-erbB-2 humano, anticuerpo policlonal de conejo. Dilución 1:250 (Dako).

Para las diluciones se utiliza el diluyente EnVision™ FLEX Antibody Diluent (Dako).

Tras lavarlas preparaciones con la solución EnVision™ Flex Wash Buffer (20x) (Dako), la reacción prosigue incubando las secciones con la enzima EnVision™ FLEX/HRP durante veinte minutos y realizando después tres lavados con la solución EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (Dako). Los cortes se cubren con el sistema de visualización DAB durante diez minutos (EnVision™ FLEX Substrate Buffer. Dako (1 ml.)/ EnVision™ FLEX DAB+CHROMOGEN. Dako (1 gota)) y nuevamente se procede al lavado de los cortes con la solución EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x). El procedimiento finaliza contrastando las secciones con hematoxilina (EnVision™ FLEX Hematoxylin) durante 5 minutos, lavando las preparaciones con agua corriente y colocando un cubreobjetos de 24x60 mm. (Menzel-Gläser) previa deshidratación de las secciones en una cadena ascendente de etanol y aclarado en xilol, mediante el medio de montaje DPX (Scharlau)®.

El control negativo se desarrolla sobre secciones de las neoplasias valoradas, siguiendo el procedimiento ya indicado, sustituyendo el correspondiente anticuerpo primario por un control negativo de ratón (FLEX Negative Control Mouse) (Dako) y un control negativo de conejo (FLEX Negative Control Rabbit) (Dako). Para el control positivo, nuevamente se realiza la reacción inmunohistoquímica ya descrita utilizando los anticuerpos primarios seleccionados (Figuras 9-12). Dicha reacción se elabora sobre cortes tisulares de tejidos no alterados de la especie canina cuya inmunoreacción es ya conocida.

Se observa inmunoreacción en endometrio para los anticuerpos frente al receptor de la progesterona y al receptor de estrógeno α . Para el anticuerpo frente a la oncoproteína c-erbB-2 se valora la presencia de reacción sobre el propio tejido glandular mamario normal y en cuanto al anticuerpo anti-COX-2, el órgano control utilizado es glándula adrenal.

Indicar finalmente que durante un período de 2 a 7 años (desde Junio de 2008 a Junio de 2015), se ha efectuado un seguimiento de cada paciente individualmente. Este seguimiento comprende un período de tiempo que va desde los 6 meses posteriores a la cirugía hasta el momento en que

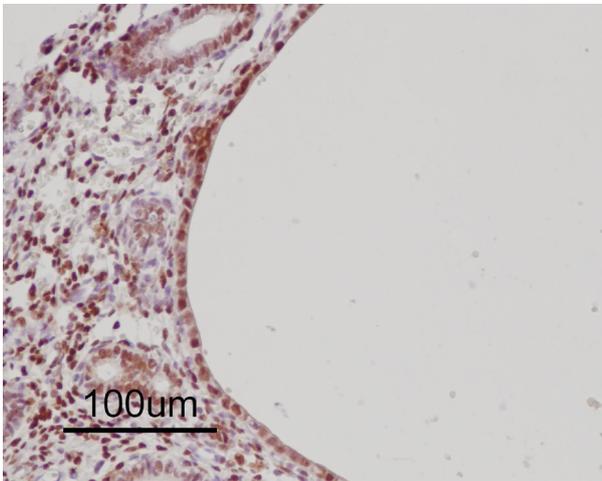


Figura 9: Reacción positiva para receptor de progesterona en endometrio de perra.

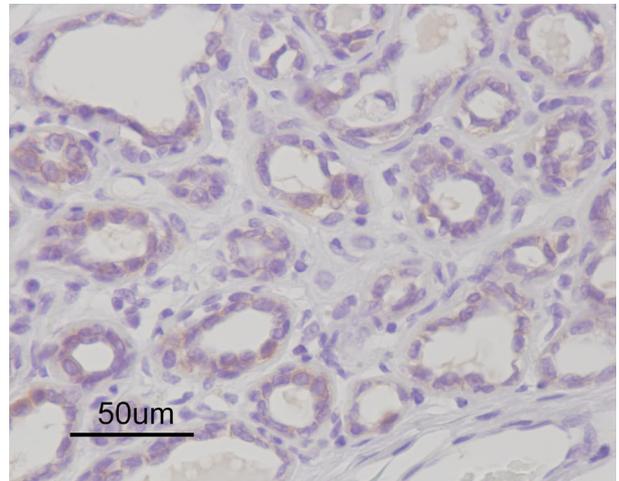


Figura 11: Débil reacción positiva para la oncoproteína c-erbB-2 en células glandulares normales de mama de perra.

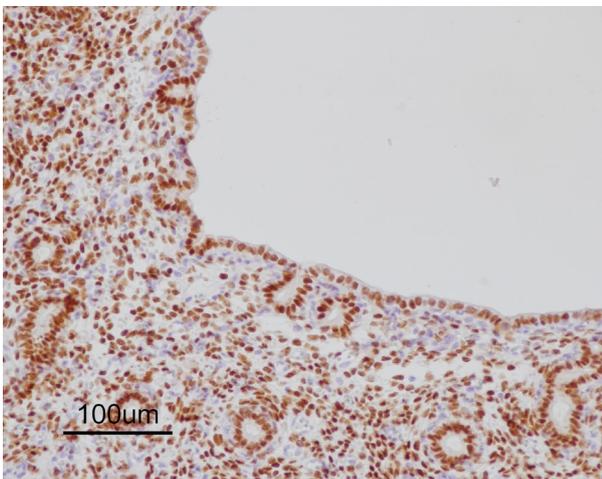


Figura 10: Reacción positiva para receptor α de estrógeno en endometrio de perra.

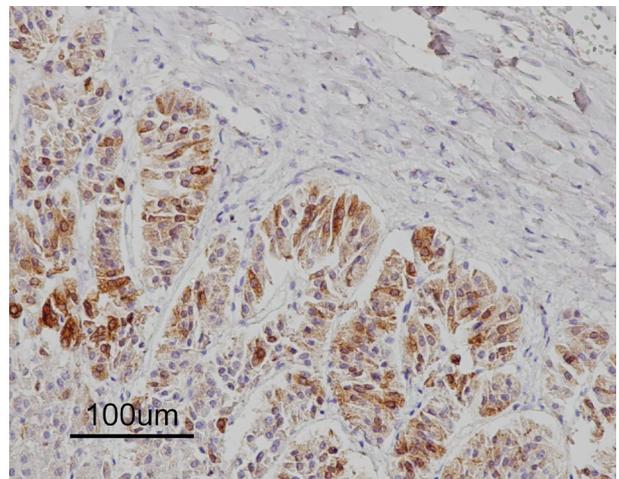


Figura 12: Reacción positiva para el anticuerpo COX-2 en células de corteza adrenal de perra.

la paciente fallece o se acaba el estudio (Junio de 2015). Dicho seguimiento se ha efectuado de dos maneras, una de ellas se basa en la revisión periódica de la paciente que ha acudido a nuestra consulta y la otra, a través del seguimiento telefónico de la evolución de la misma (cada 6 meses aproximadamente). En ambos casos, se han llevado a cabo pruebas de exploración física y de diagnóstico por la imagen, ya sea en nuestro centro o en la clínica veterinaria a la que acude el propietario asiduamente (principalmente en los casos de pacientes procedentes de lugares alejados del Hospital Clínico Veterinario UEx).

Descripción de las variables de estudio.

Para esta parte de nuestro trabajo se han seleccionado de las fichas clínicas de las pacientes las siguientes variables incluidas en el apartado 1:

1. Raza
2. Mestizaje
3. Edad
4. Peso
5. Tamaño

Así como las siguientes variables no recogidas anteriormente y que son consideradas relevantes para el estudio:

6. Castración previa: se anota si la paciente está castrada o no previamente al diagnóstico.

7. Edad de castración: en los casos en que se encuentre castrada se recoge el dato sobre la edad de la paciente en el momento en el que se produjo la intervención.

8. Número de gestaciones: esta variable refleja si la paciente es nulípara o si por el contrario ha estado gestante y, en caso afirmativo, en cuantas ocasiones. Estableciéndose las siguientes categorías [43]:

- Nulípara.
- Pocas gestaciones (1 – 4 gestaciones).
- Múltiples gestaciones (>4 gestaciones).

9. Número de pseudogestaciones: como en la anterior variable, se refleja si la paciente ha

sufrido o no pseudogestaciones y cuantas han padecido. Al igual que en la variable anterior (variable 9) se ha categorizado en:

- Ninguna pseudogestación.
- Pocas pseudogestaciones (1 – 4 pseudogestaciones).
- Múltiples pseudogestaciones (>4 pseudogestaciones).

10. Tratamientos hormonales: en este caso, al no disponer en la mayoría de las pacientes de datos precisos acerca del número exacto de veces en que se les ha administrado este tipo de tratamientos, se ha optado por categorizar esta variable en:

- No administración de ningún tratamiento hormonal.
- Administración de varios tratamientos hormonales (1 - 4 tratamientos).
- Administración de numerosos tratamientos hormonales (> 4 tratamientos).

11. Antecedentes tumorales: en esta variable se refleja si la paciente ha sido intervenida con anterioridad de tumores mamarios ya sea en nuestro hospital o en otra clínica veterinaria. En caso afirmativo se tiene en cuenta la malignidad del proceso. De esta manera, si se dispone de dicha información, tenemos la siguiente clasificación:

- No tiene antecedentes de tumores mamarios.
- Sí tiene antecedentes.

12. Localización de glándulas mamarias afectadas: se examina la presentación de tumores en cada una de las mamas.

13. Cadena mamaria afectada: en esta variable se valora si la paciente presenta afectada la cadena mamaria derecha, la cadena izquierda o ambas cadenas.

14. Tipo de afectación: se tiene en cuenta si solo existe un nódulo tumoral en cada mama afectada o, si por el contrario, en una sola glándula mamaria hay más de un nódulo.

15. Estudio radiológico de la cavidad

torácica: en esta variable sólo se valora si en las radiografías realizadas en el momento de la evaluación del paciente aparece una imagen compatible con metástasis en el pulmón o en los ganglios mediastínicos. En las pacientes se llevaron a cabo tres proyecciones radiográficas: lateral derecha, lateral izquierda y ventrodorsal o dorsoventral.

16. Estudio radiológico de la cavidad abdominal: al igual que en la variable anterior, se valora si se observa una imagen compatible con metástasis en algún órgano abdominal o ganglios ilíacos profundos. En las pacientes de nuestro estudio no siempre se realiza este diagnóstico, siendo su petición a criterio del clínico.

17. Estudio ecográfico de la cavidad abdominal: esta variable refleja si el estudio de diagnóstico por imagen se completa con una ecografía abdominal, reflejándose la aparición o no de imágenes compatibles con metástasis en esta cavidad. El estudio ecográfico se realiza en aquellas pacientes en las que se sospecha la presencia de una posible metástasis en abdomen mediante radiografía.

18. Tratamiento quirúrgico aplicado: la variable "Tratamiento" ha sido categorizada en función del tipo de cirugía que se lleva a cabo en cada paciente. Existe solo un caso en que la paciente muere antes de la intervención quirúrgica, procediéndose a la realización de la necropsia reglada con la toma de muestras para el análisis histopatológico. Se establecen las siguientes categorías:

- Nodulectomía.
- Mastectomía simple (sólo se extirpan las mamas afectadas).
- Mastectomía en bloque.
- Mastectomía radical de toda la cadena mamaria afectada.
- Mastectomía en bloque y simple contralateral.
- Mastectomía radical y simple contralateral.
- Mastectomía simples en ambas cadenas.

- Mastectomía en bloque en ambas cadenas.

- Necropsia con toma de muestras postmortem.

La última categoría (Necropsia con toma de muestras postmortem) se tiene en cuenta como tal para fines estadísticos, a pesar de no ser un tipo de técnica quirúrgica.

19. Ovariohisterectomía simultánea a tratamiento oncológico: se considera si en el momento de la intervención quirúrgica se ha efectuado también una ovariohisterectomía. Este tipo de protocolo sólo se practica en aquellas pacientes cuyos propietarios, previamente informados, aceptan.

20. Implantación o fijación de la neoplasia: aquí se distingue si el nódulo tumoral se encuentra adherido a tejidos subyacentes o no. Resaltamos cuatro categorías:

- Masa móvil (no adherida).
- Masa adherida a piel.
- Masa infiltrada en paredes musculares.
- Masa adherida a piel y paredes musculares.

21. Ulceración: se tiene en cuenta si la piel se encuentra ulcerada o intacta en el lugar de localización del nódulo tumoral.

22. Necrosis: se destaca la presencia de necrosis macroscópica, categorizándose este parámetro de la siguiente manera:

- Ausencia de necrosis.
- Pequeñas áreas de necrosis.
- Amplias áreas de necrosis.

23. Velocidad de crecimiento: esta variable es subjetiva, ya que depende de la valoración del propietario acerca de la velocidad de crecimiento del tumor; en función del tiempo que ha transcurrido desde la supuesta aparición de la masa y del tamaño que tuviera en el momento de la detección hasta el momento del diagnóstico en la consulta. Se han reflejado tres categorías:

- Crecimiento lento.

- Crecimiento medio o progresivo.
- Crecimiento rápido.
- Crecimiento muy rápido.

24. Características macroscópicas del tumor: esta variable se clasifica a criterio del anatomopatólogo según las propiedades de la masa tumoral en:

- Masa definida y consistente.
- Masa definida y no consistente.
- Masa no definida y consistente.
- Masa no definida y no consistente.

25. Diagnóstico del tumor: en esta variable se ha considerado, en caso de coexistir varios tumores con diferente diagnóstico histopatológico, aquellas neoplasias que presentan un estadio más alto o las que muestran un mayor grado histológico de malignidad. Al existir un elevado número de diagnósticos histológicos de los diferentes tumores mamarios se ha optado por categorizar esta variable en 13 categorías basándonos en la clasificación histológica propuesta en 2010 por Goldsmith, M. y col. [19] con el fin de obtener un número significativo:

1- Carcinoma simple: en este tipo de carcinoma se encuadran los carcinomas simple tubular, túbulo-papilar, quístico-papilar y cribiforme.

- 2- Carcinoma micropapilar invasivo.
- 3- Carcinoma sólido.
- 4- Comedocarcinoma.
- 5- Carcinoma anaplásico.
- 6- Carcinoma complejo.
- 7- Carcinoma mixto.
- 8- Carcinoma ductal.
- 9- Carcinoma papilar intraductal.

10- Tipos especiales de Neoplasias Epiteliales Malignas: se incluye en este apartado al carcinoma mucinoso, al carcinoma inflamatorio, al carcinoma adenoescamoso, al carcinoma de células escamosas y al carcinoma de células fusiformes.

11- Carcinosarcoma

26. Tamaño tumoral: en esta variable se anota el tamaño que presenta el tumor extirpado y se ha categorizado según los estándares utilizados en la clasificación TNM propuesta por la WHO [402]:

- 1- T1: < 3 cm de diámetro máximo.
- 2- T2: 3 – 5 cm de diámetro máximo.
- 3- T3: > 5 cm de diámetro máximo.

27. Estado de los ganglios linfáticos regionales: en esta variable se tiene en cuenta la valoración histológica de los ganglios linfáticos regionales extirpados durante el tratamiento quirúrgico. En todos los casos de nuestro estudio dichos ganglios corresponden a los ganglios linfáticos inguinales de la cadena mamaria correspondiente. Se han obtenido dos categorías a considerar:

- 0- N0: No aparición de metástasis.
- 1- N1: Aparición de metástasis.

28. Metástasis distantes: este parámetro se ha elaborado a partir de los datos obtenidos mediante las pruebas de diagnóstico por imagen (radiografía de tórax, radiografía de abdomen y ecografía abdominal), estableciéndose dos categorías:

- 0- M0: No aparición de metástasis distantes.
- 1- M1: Aparición de metástasis distantes.

29. Estadio tumoral: conforme al sistema de estadiaje modificado de la WHO [402], y en base a las tres variables anteriormente valoradas (variables 26, 27 y 28), se han considerado cinco categorías: I, II, III, IV y V.

- 1- Estadio I (T1 N0 M0)
- 2- Estadio II (T2 N0 M0)
- 3- Estadio III (T3 N0 M0)
- 4- Estadio IV (cualquier T N1 M0)
- 5- Estadio V (cualquier T cualquier N M1)

29. Formación tubular: para la categorización de esta variable se ha tenido en cuenta la clasificación utilizada por Peña, L. [403], obteniéndose tres categorías:

1- Formación tubular mayor al 75% de la muestra.

2- Moderada formación tubular (entre el 10-75% de la muestra) mezclada con áreas de crecimiento sólido.

3- Mínima formación tubular (<10% de la muestra) o ausencia de ésta.

30. Pleomorfismo nuclear: al igual que en la variable anterior se ha utilizado la clasificación descrita por Peña, L. [403], describiendo nuevamente tres categorías:

1- Núcleos pequeños de aspecto uniforme o regulares, con presencia de nucléolos ocasionales.

2- Moderado grado de variación de los núcleos en lo referente a su forma y tamaño, núcleos hipercromáticos y presencia generalizada de nucléolos, algunos de los cuales pueden ser prominentes.

3- Marcada variación del tamaño de los núcleos, núcleos hipercromáticos, con uno o más nucléolos prominentes.

31. Mitosis: al igual que con las variables anteriores (variables 29 y 30), también se establecen tres categorías según la clasificación seguida por Peña, L. [403]:

1- 0 – 9 mitosis/10 HPF.

2- 10 – 19 mitosis/10 HPF.

3- < 20 mitosis/10 HPF.

32. Suma de los puntos obtenidos en las variables morfológicas anteriores: esta variable es el resultado del sumatorio de las puntuaciones de las tres variables anteriores (variables 29, 30 y 31).

33. Grado de malignidad: se ha utilizado nuevamente el sistema de graduación propuesto por Peña, L. [403], en el que se obtiene el grado de malignidad tumoral a partir de la puntuación obtenida en la variable anterior (variable 32), resultando en:

- 3 - 5 puntos: Grado de malignidad I o bajo.

- 6 – 7 puntos: Grado de malignidad II o intermedio.

- 8 – 9 puntos: grado de malignidad III o

alto.

34. Invasión peritumoral: solo se tiene en cuenta si existe invasión de células neoplásicas en zonas peritumorales o no.

35. Invasión linfática: se considera si se ha observado durante el análisis histopatológico invasión linfática por células neoplásicas.

36. Reacción inflamatoria: para describir la presencia de reacción inflamatoria se establecen 4 categorías:

- Ausencia de reacción inflamatoria en los cortes valorados.

- Escasa reacción inflamatoria.

- Moderada reacción inflamatoria.

- Intensa reacción inflamatoria.

37. Vinculación de la reacción inflamatoria: esta variable se ha categorizado de la siguiente manera:

- Inflamación no vinculada a áreas de necrosis ni a zonas peritumorales.

- Inflamación vinculada a necrosis y zonas peritumorales.

- Inflamación vinculada solamente a áreas de necrosis.

- Inflamación vinculada solamente a zonas peritumorales.

38. Presentación del receptor de estrógeno α (PS): esta variable recoge el porcentaje de células teñidas y se ha categorizado según la guía recomendada por la Sociedad Americana de Oncología Clínica y el Colegio de Patólogos Americano (ASCO/CAP) para la valoración de los receptores de estrógenos y progesterona, con algunas variaciones específicas para la especie canina, descrita por Peña, L. y col. [8].

- 0: Ausencia de tinción.

- 1: < 1% (< 1/100).

- 2: 1% – 10% (1/100 – 1/10)

- 3: 10% - 33% (1/10 – 1/3)

- 4: 33% - 66% (1/3 – 2/3)

- 5: > 66% (> 2/3)

39. Intensidad de la tinción del receptor

de estrógeno α (IS): al igual que en la variable anterior (variable 39) se han formado varias categorías:

- 0: ausente
- 1: débil
- 2: moderada
- 3: fuerte

40. Puntuación final para el receptor α de estrógeno (TS): se corresponde a la suma de las variables anteriores (variables 39 y 40):

$$\text{- TS (puntuación final) = PS + IS}$$

41. Positividad del tumor al receptor α de estrógeno: según la puntuación final alcanzada en la variable 41. Comprobamos si un tumor es negativo o positivo para los receptores de estrógenos cuando los puntos obtenidos son:

- 0: tumor negativo.
- 2 – 8: tumor positivo.

42. Presentación de receptores de progesterona.

43. Intensidad de la tinción de receptores de progesterona.

44. Puntuación final de receptores de progesterona.

45. Positividad del tumor a receptores de progesterona.

Las variables 43, 44, 45 y 46 se han descrito del mismo modo que las variables 39, 40, 41 y 42, respectivamente, siguiendo la guía recomendada por la (ASCO/CAP) para la valoración de los receptores de estrógenos y progesterona, con las variaciones específicas para la especie canina, descrita por Peña, L. y col [8].

46. Positividad a receptores hormonales: para valorar si el tumor presenta uno o ambos tipos de receptores hormonales (de estrógenos y/o de progesterona) o, por el contrario, están ausentes, se establecieron las siguientes categorías:

- Negativo a ambos.
- Positivo a ambos.
- Positivo únicamente a receptores de estrógenos.

- Positivo únicamente a receptores de progesterona.

47. Puntuación final para la oncoproteína c-erbB-2: de acuerdo con la guía propuesta por la (ASCO/CAP) para la interpretación inmunohistoquímica de la sobreexpresión de c-erbB-2, se ha categorizado la variable en:

- 0 – 1: Ausencia de tinción (0) o tinción de la membrana débil e incompleta en cualquier porcentaje de células (1+)

- 2: Tinción de la membrana completa y fuerte en un porcentaje menor o igual al 30% de las células o tinción de la membrana heterogénea completa débil o moderada en al menos 10% de las células.

- 3: Tinción de la membrana homogénea completa y fuerte en más del 30% de las células.

48. Positividad para la oncoproteína c-erbB-2: basándonos en la variable anterior y considerando la guía recomendada por la ASCO/CAP para la valoración de HER-2 en humana [9], tenemos que sólo aquellos tumores 3+ son positivos a la sobreexpresión de c-erbB-2.

49. Presentación final para el anticuerpo COX-2: para cuantificar el porcentaje de células positivas se ha puntuado de la siguiente forma:

- 0: 0% de células teñidas
- 1: < 10% de células teñidas
- 2: 10 – 50% de células teñidas
- 3: 51 – 80% de células teñidas
- 4: > 80% de células teñidas

50. Intensidad de la tinción para el anticuerpo COX-2: la intensidad de la inmunoreacción se ha categorizado en:

- 0: negativa
- 1: débil
- 2: moderada
- 3: fuerte

51. Puntuación final para el anticuerpo COX-2: en esta variable se puntúa multiplicando el porcentaje de células positivas y la intensidad de la tinción, obteniéndose un resultado que varía entre 0 y 12.

52. Inmunorreactividad para el anticuerpo COX-2: esta variable se crea para poder separar los tumores con una expresión de COX-2 débil o fuerte y definir un punto de corte, establecido en 6 puntos, por lo que se puede categorizar de la siguiente manera:

- 0 – 6: Inmunorreactividad baja.
- > 6: Inmunorreactividad alta.

53. Desarrollo de tumores mamarios: con el fin de ver la evolución de las pacientes se ha tenido en cuenta si durante el seguimiento se produce la aparición de nuevos tumores mamarios en cualquiera de las restantes mamas no extirpadas de una o ambas cadenas mamarias.

54. Presencia o aparición de metástasis distantes: en este punto se valora si durante el período de seguimiento se detecta la aparición de metástasis distantes. Además, se ha tenido en cuenta, sin realizar distinciones, aquellas pacientes que ya presentaban metástasis en el momento del tratamiento.

55. Tiempo libre de enfermedad (nº meses): esta variable considera el número total de meses que la paciente no presenta enfermedad. Es decir, desde que se realiza el tratamiento quirúrgico hasta que reaparece el proceso.

En los casos de aquellas pacientes en las que se ha realizado el tratamiento quirúrgico a partir de Junio de 2011 el seguimiento no se ha podido completar hasta los 48 meses, así como el de todas las pacientes entre esa fecha y finales de 2012.

56. Tiempo de supervivencia total (nº meses): esta variable es indicativa del número de meses de supervivencia, hasta la finalización del seguimiento de las pacientes.

57. Evolución final de las pacientes: para su valoración se forman dos categorías:

- 1- La paciente sigue con vida al final del seguimiento realizado durante el estudio.
- 2- Muerte de la paciente.

58. Motivo del fallecimiento de las pacientes: con el fin de definir la evolución de cada una de las pacientes al final del estudio, se establecen

las siguientes categorías:

- 1- Muerte de la paciente por causas intrínsecas de la enfermedad.
- 2- Muerte de la paciente por causas ajenas a la patología tumoral mamaria.
- 3- Eutanasia de la paciente por causas intrínsecas de la enfermedad.
- 4- Eutanasia de la paciente por causas ajenas a la enfermedad.

Análisis estadístico:

Para llevar a cabo el estudio estadístico de esta primera parte se utilizó el programa informático Statistical Package for Social Sciences, versión 22.0 (SPSS, Chicago, Estados Unidos).

En este análisis de la patología oncológica general y de las neoplasias mamarias malignas en hembras de la especie canina entre 2008 y 2012 en el Hospital Clínico Veterinario de la UEx se han empleado:

- Técnicas de estudio y depuración de datos: recálculo de variables, análisis de datos atípicos, etc.
- Análisis descriptivo de variables.
- Contrastes de normalidad para una muestra: Shapiro Wilk y Kolmogorov-Smirnov.
- Contrastes no paramétricos para muestras independientes: Wilcoxon-Mann-Whitney (dos muestras) y Kruskal-Wallis (más de dos muestras).
- Prueba Chi-Cuadrado de Pearson (para comparar dos variables discretas).
- Contraste de correlación de Spearman (para comparar dos variables continuas).
- Análisis de supervivencia con datos censurados: Estimador de Kaplan-Meier.

IV. Resultados

1. ANÁLISIS DE LA PATOLOGÍA ONCOLÓGICA DE LA GLÁNDULA MAMARIA EN HEMBRAS DE LA ESPECIE CANINA EN EL PERIODO COMPRENDIDO ENTRE 2008-2012.

ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LAS VARIABLES

En el estudio se incluyen 858 pacientes, hembras de la especie canina con 5 o más años de edad, que han acudido a la consulta del Servicio de Cirugía del Hospital Clínico Universitario de la UEx con diversas patologías.

A- GRUPO I:

En este grupo se incluyen a todas las pacientes del estudio (nI=858).

- Raza:

En la Figura 13 se observa que el Grupo 8 (Perros Cobradores de Caza - Perros Levantadores de Caza - Perros de Agua) es el más numeroso con un 14,6%, seguido del Grupo 9 (Perros de Compañía) con un 12,6%; mientras que el que obtiene una menor representación, con un 1,049%, es el Grupo 6 (Perros tipo Sabueso – Perros de Rastreo y Razas semejantes).

- Mestizaje:

En la variable “Mestizaje” observamos que el 33,24% de las pacientes son mestizas, frente al 66,76%, más del doble de representación, que pertenecen a uno de los 10 grupos de razas puras, como se aprecia en la Figura 14.

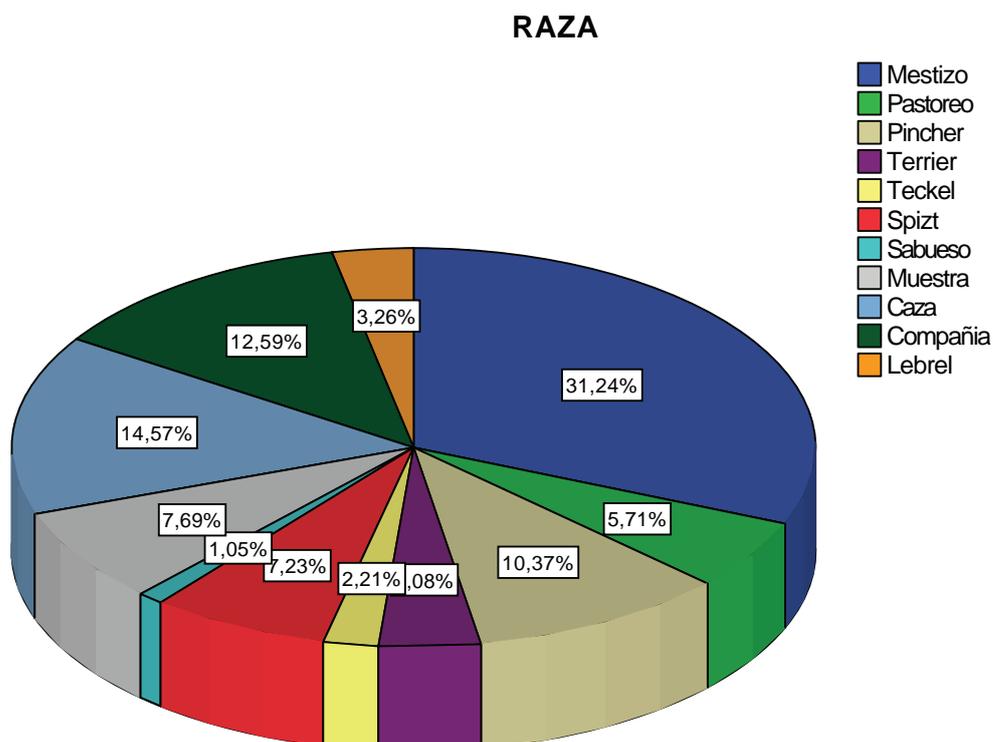


Figura 13: Distribución de los pacientes en función de la “Raza”.

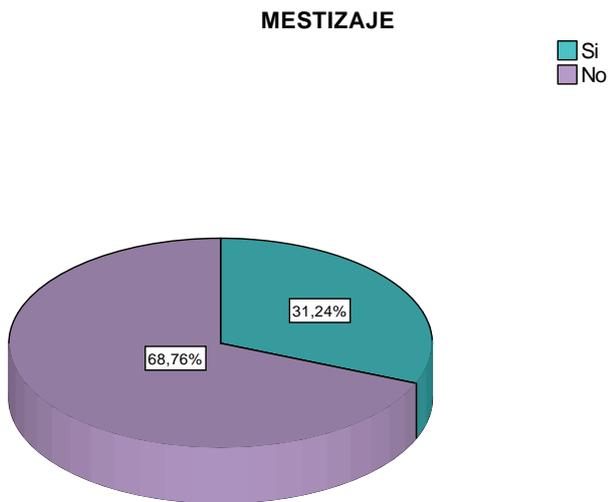


Figura 14: Distribución de las pacientes en función de la variable "Mestizaje".

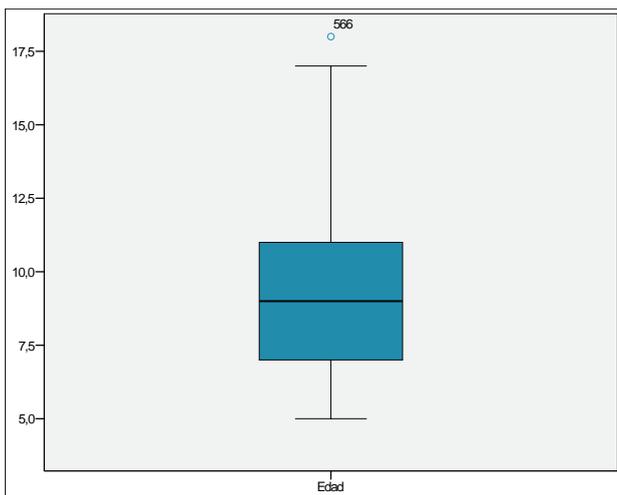


Figura 15: Diagrama de cajas de la variable "Edad".

- Edad:

En la Figura 15 se observa como para la variable "Edad" se presenta un valor atípico correspondiente a la paciente 566, aunque no es influyente, por lo que no desestimamos la información respecto a dicha paciente.

En el histograma de la variable "Edad", representado en la Figura 16, se observa que no parece que se pueda asumir la normalidad de la variable.

Al realizar las pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk obtenemos efectivamente unos valores de p iguales a 0,000, por lo que no se puede asumir

la normalidad de la variable "Edad". De esta manera, tomamos como valor promedio el valor de la mediana, 9 años, con un rango intercuartílico (IQR) de 4 años.

- Tamaño:

En cuanto al tamaño de las pacientes, se han clasificado en dos grupos: "Pequeños" y "Grandes", siendo el 59,31% de tamaño "Pequeño", frente a un 40,69% que son de tamaño "Grande" (Figura 17).

- Tipo de patología:

En la Figura 18 se observa la gran representación

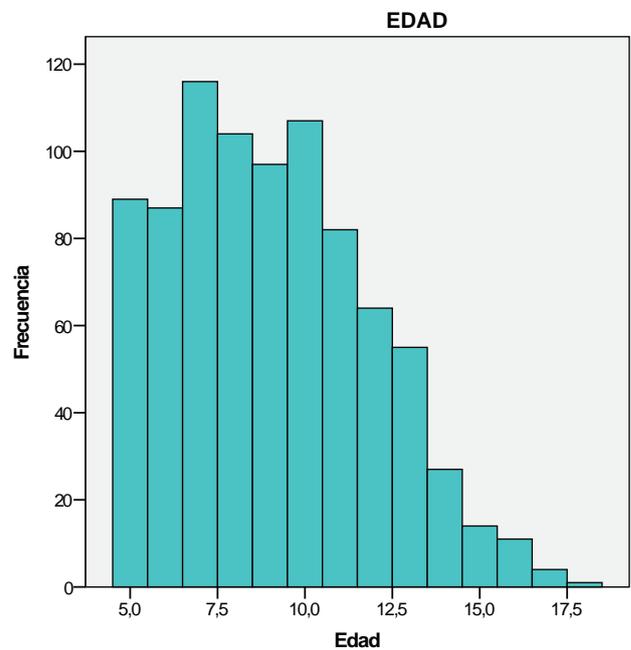


Figura 16: Histograma de la variable "Edad".

TAMAÑO

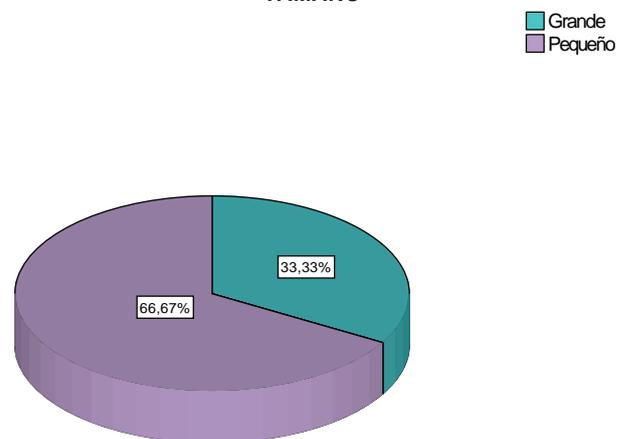


Figura 17: Distribución de las pacientes por Tamaño".

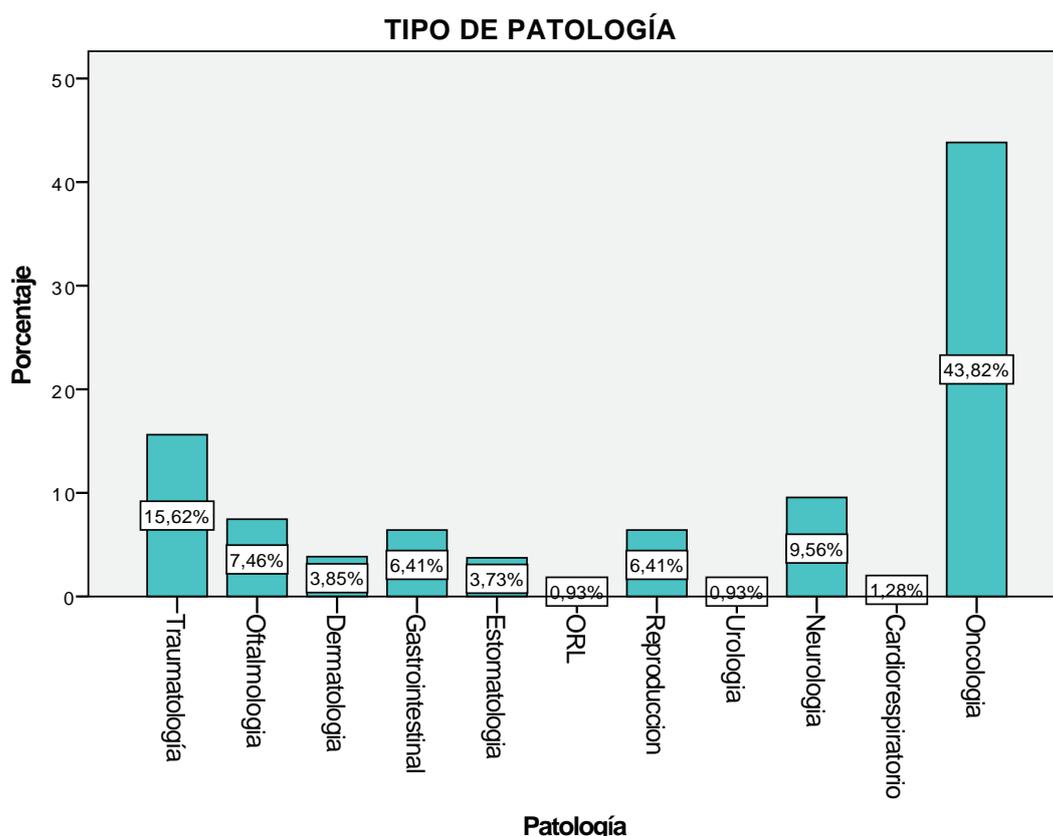


Figura 18: Distribución de las pacientes por el "Tipo de Patología".

que adquiere el bloque correspondiente a la patología oncológica (43,82%) frente al resto, siendo ésta casi tres veces superior al bloque de patología traumatológica (15,62%), el segundo que muestra un mayor porcentaje contabilizado.

Cabe destacar que la patología oncológica la padecen un porcentaje de pacientes ligeramente

más bajo que el correspondiente a la suma de los porcentajes de pacientes que se presentan con cualquier otra enfermedad, como se observa en el siguiente gráfico (Figura 19):

Podemos constatar que el conjunto de pacientes con patología no tumoral suma el 56,18% del total de procesos atendidos en el Servicio de Cirugía del Hospital Clínico Veterinario de la UEx, frente al grupo de pacientes con tumores que representa un 43,82% del conjunto de la población de estudio.

PATOLOGÍA ONCOLÓGICA

■ Si
■ No

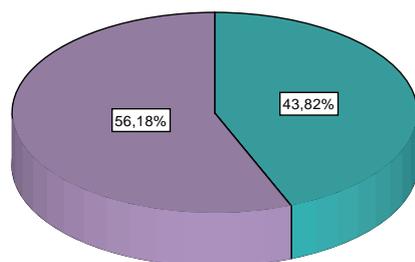


Figura 19: Distribución en función de la presencia o no de patología tumoral.

B- GRUPO II:

En este grupo se incluyen a las pacientes que acudieron a la consulta con una patología no tumoral (nII=482).

- Raza:

El grupo racial con una mayor representación de individuos es el de Perros de Compañía (Grupo 9), con un 16,39% del total de las pacientes de este segundo grupo de estudio, como se observa en la Figura 20.

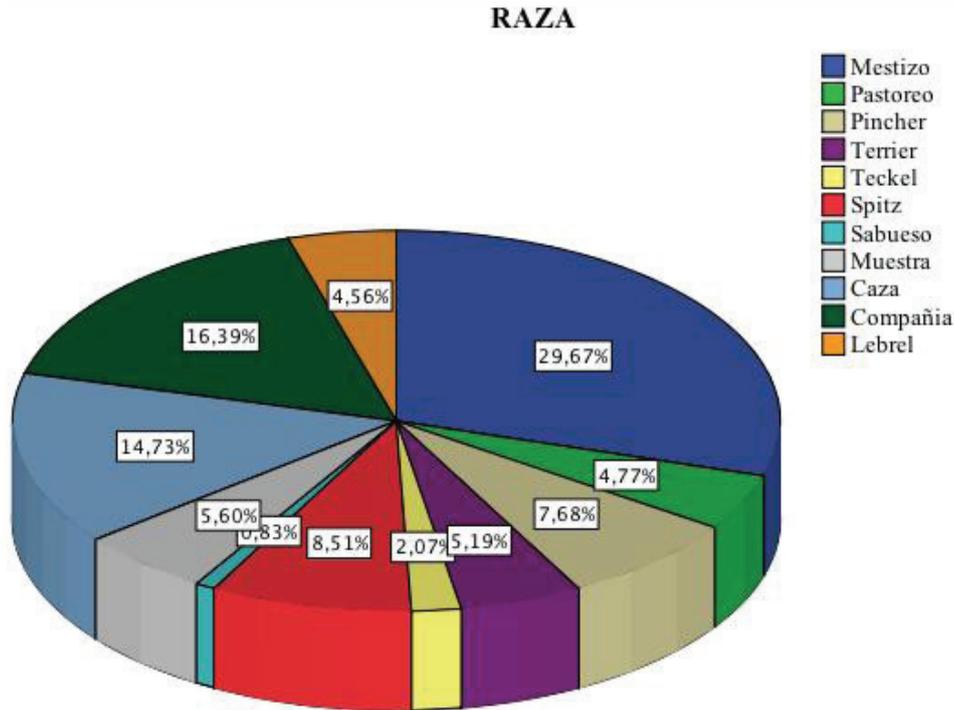


Figura 20: Distribución de los pacientes en función de la “Raza”.

- Mestizaje:

Como se observa en la Figura 21, en el grupo de pacientes sin patología tumoral (Grupo II), el 29,67% de las pacientes son mestizas frente al 70,33% que pertenecen a razas puras.

- Edad:

En la Figura 22 se aprecia que la distribución no parece ser normal para esta variable.

Para contrastar esta hipótesis nuevamente se llevan a cabo las pruebas de normalidad

de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk, obteniendo unos valores de p iguales a 0,000. Por tanto, no podemos asumir la normalidad de la variable “Edad”, tomando como valor promedio (la mediana) 8 años con un IQR de 4 años.

- Tamaño:

Con respecto al tamaño, hemos comprobado que el 72,41% son pacientes de tamaño “Pequeño”, siendo este porcentaje casi tres veces superior al de las pacientes de tamaño “Grande” (27,59%) (Figura 23).

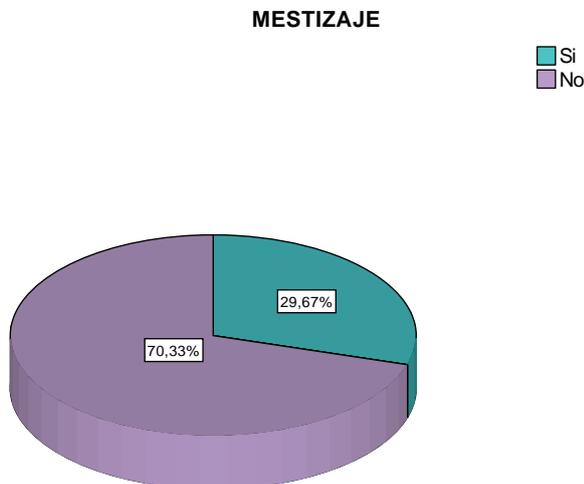


Figura 21: Distribución de las pacientes en función de la variable “Mestizaje”.

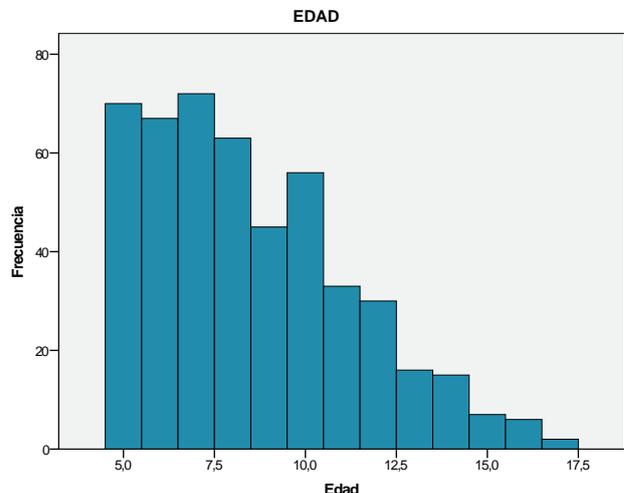


Figura 22: Histograma de la variable “Edad”

C- GRUPO III:

En este grupo se incluyen a aquellas pacientes del grupo I que presentaban cualquier tipo de tumor (nIII=376).

- Raza:

El grupo racial con mayor representación de pacientes en este tercer grupo es el de Perros de Compañía congregando al 16,39% del total de los individuos incluidos en este grupo, como se puede observar en la Figura 24.

- Mestizaje:

En la Figura 25 se observa que en el 29,67% son mestizas, mientras que el 70,33% de las pacientes restantes son de raza pura, lo que supone el doble de representación de este último grupo frente al de mestizas.

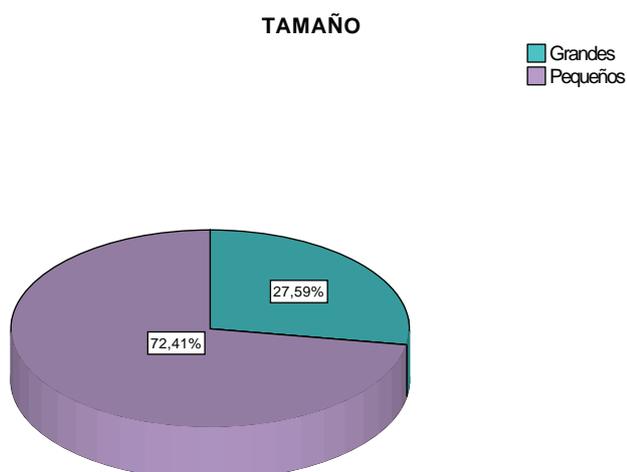


Figura 23: Distribución de las pacientes por "Tamaño".

RAZA

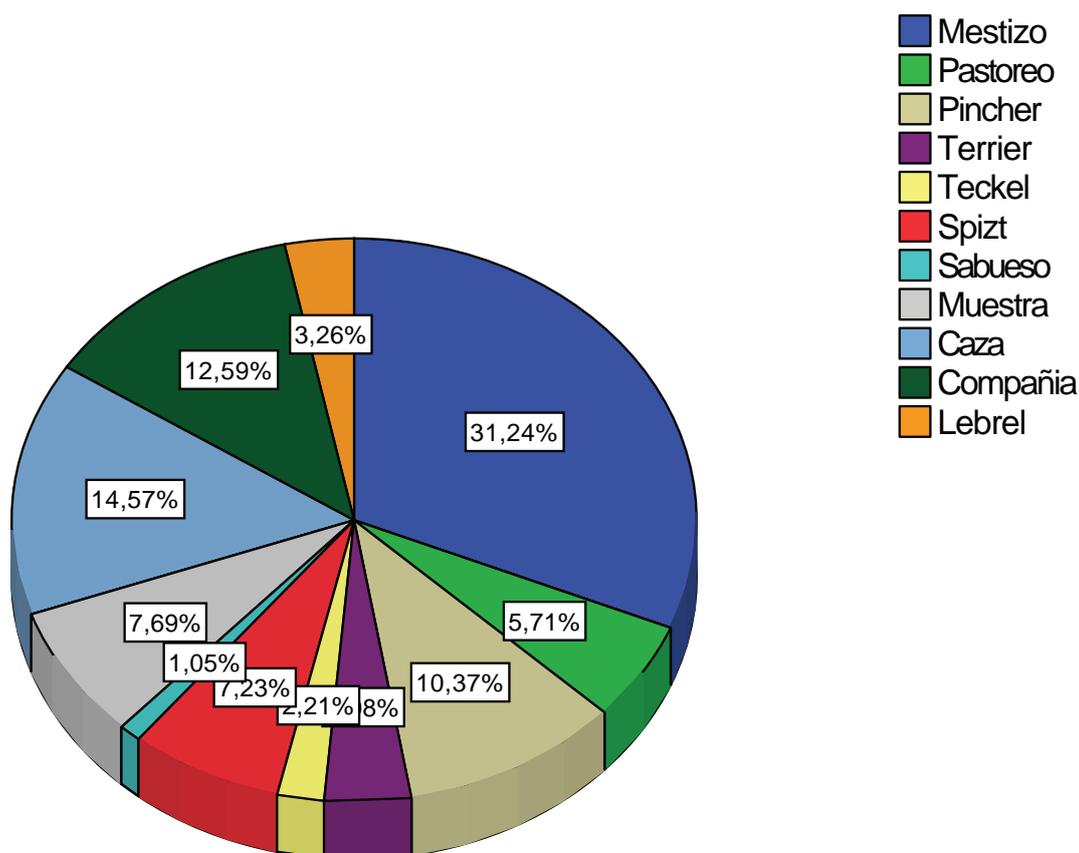


Figura 24: Distribución de los pacientes por "Razas".

- Edad:

Como en los grupos anteriores, en el histograma que se representa en la Figura 26, observamos nuevamente que parece no poder asumirse la normalidad de la variable “Edad”.

Así mismo, en este tercer grupo de pacientes no podemos asumir la normalidad de esta variable al haber obtenido unos valores de p iguales a 0,000 en las pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. Por este motivo, nuevamente tomamos como valor promedio el valor de la mediana 10 años, con un IQR de 4 años.

- Tamaño:

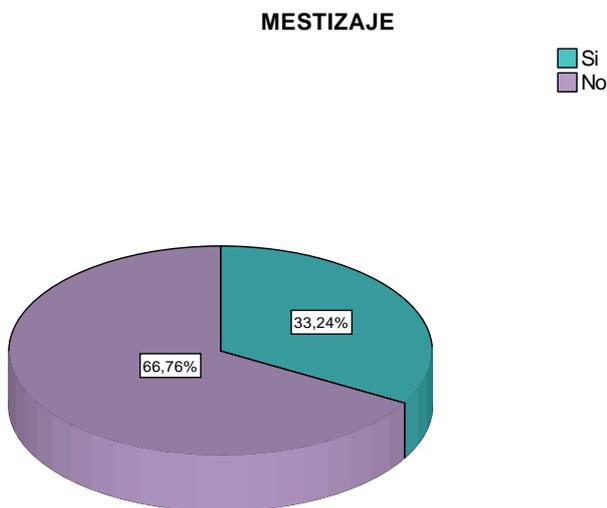


Figura 25: Distribución de las pacientes en función de la variable “Mestizaje”.

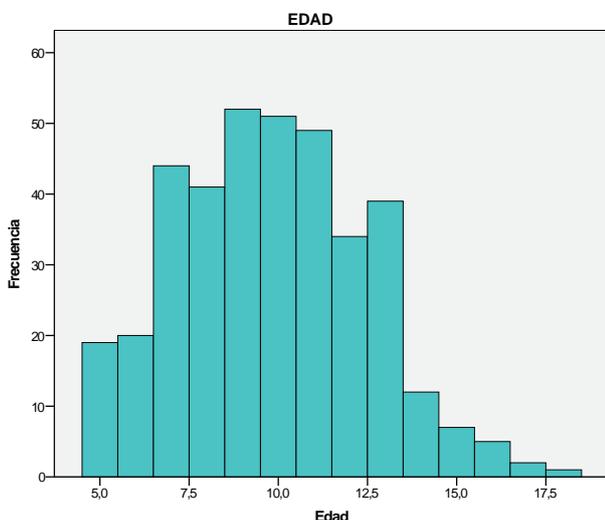


Figura 26: Histograma de la variable “Edad”

Las razas de tamaño “Pequeño” predominaron sobre las de tamaño “Grande”, con un 59,31% de representación frente al 40,69% de las pacientes pertenecientes al grupo de razas “Grandes”(Figura 27).

- Tipo de tumor:

La Figura 28 muestra que el 60,37% del total de procesos oncológicos que afectan a las hembras de la especie canina son tumores mamarios. Cabe destacar la gran diferencia respecto al segundo tipo de tumor con mayor representación (17,02%), que incumbe a los tumores de piel, casi cuatro veces inferior al primero. En el lado opuesto se encuentran los tumores de tipo endocrino, con un 0,53% de pacientes afectadas.

En la Figura 29 se advierte la importante representación que tienen los tumores de tipo mamario (60,37%) frente al resto de procesos oncológicos (39,63%), destacando que incluso la suma de todos los porcentajes de los restantes tipos de tumores solo alcanza dos tercios del porcentaje total de las hembras que padecen tumores mamarios.

- Malignidad:

Esta variable se ha podido valorar en el 56,1% de los casos (ya que sólo en estos casos se llevó a cabo un estudio citológico o histopatológico), observándose, como se refleja en la Figura 30, que el 72,51% de los tumores

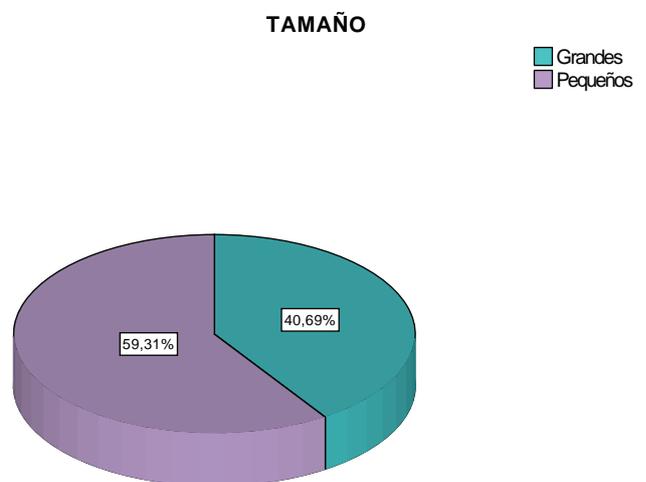


Figura 27: Distribución de las pacientes según su “Tamaño”.

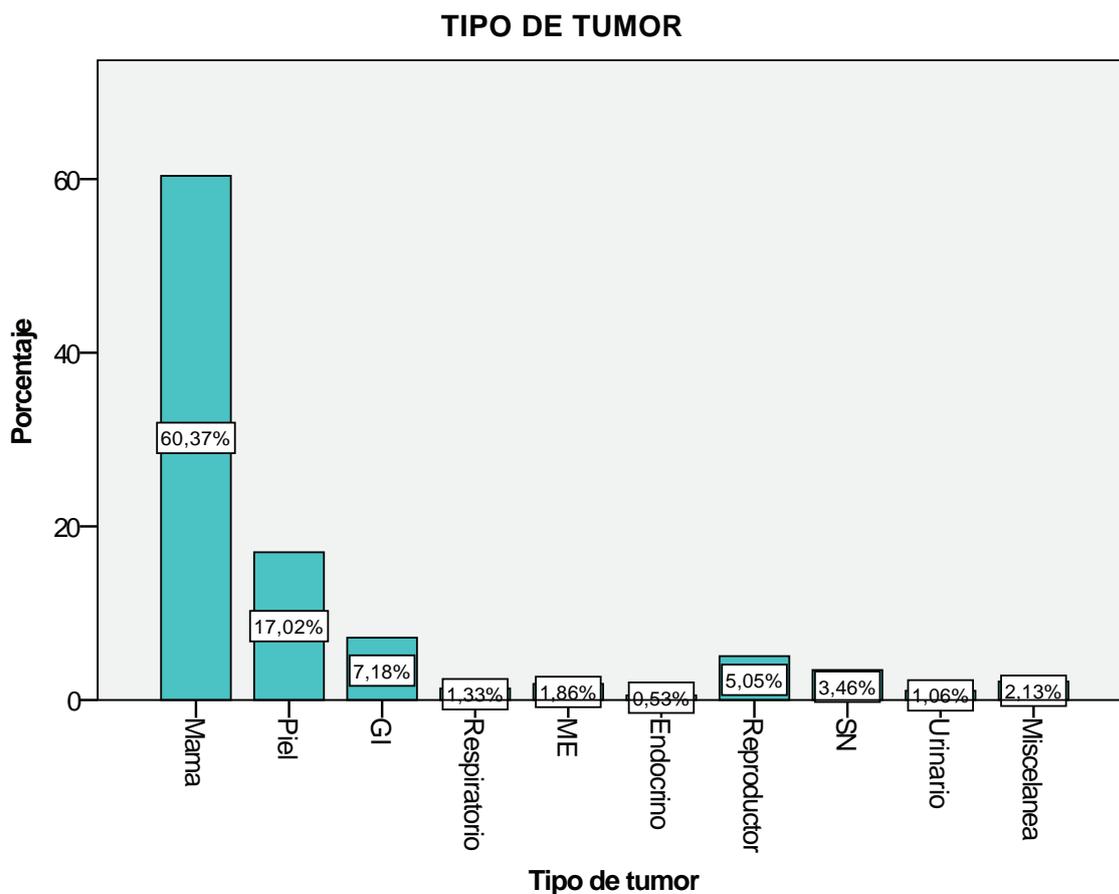


Figura 28: Distribución de las pacientes en función del “Tipo de tumor” que presentan.

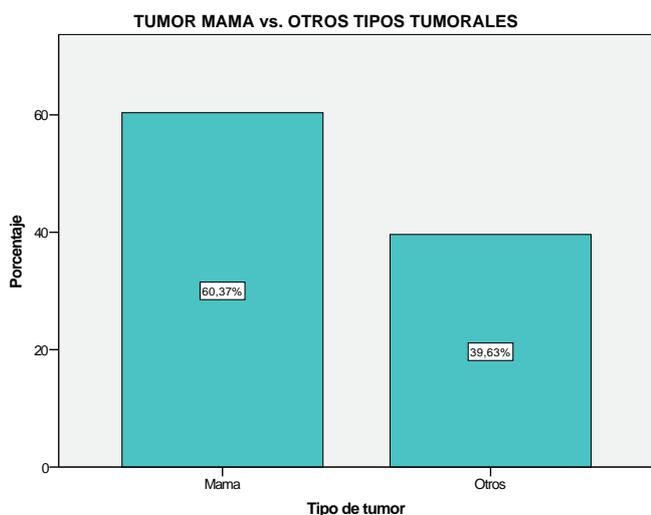


Figura 29: Tumores de mama frente a otros tipos de procesos tumorales.

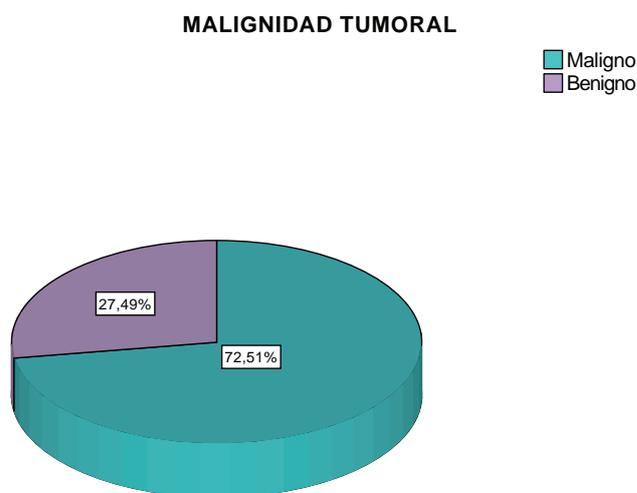


Figura 30: Distribución de pacientes según si el tumor que padecen es maligno o no.

estudiados son malignos, frente al 27,49% que son diagnosticados como procesos benignos.

D. GRUPO IV:

En este grupo se incluyen únicamente a aquellas pacientes con tumores mamarios (nIV=227).

- Raza:

El grupo de razas que en mayor porcentaje acude a la consulta por padecer tumores mamarios, como se contempla en la Figura 31, es el Grupo 8 (Perros Cobradores de Caza) con un 14,29% de incidencia.

- Mestizaje:

De todas las perras que se incluyen en este grupo, el 35,68% son mestizas frente al 64,32% que son de raza pura, como se evidencia en la Figura 32.

- Edad:

Como refleja el histograma representado en la Figura 33, no parece que se pueda asumir la normalidad de la variable “Edad”.

Al realizar las pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk comprobamos que, efectivamente, no se puede asumir la normalidad de la variable, puesto que se obtienen unos valores de p iguales a 0,000. En este cuarto grupo también debemos tomar como valor promedio de diagnóstico de la enfermedad 10 años, con un IQR de 4 años, siendo la edad más temprana de diagnóstico los 5 años.

- Tamaño:

Al analizar esta variable observamos que el 33,92% de las hembras pertenecen al grupo de razas “Grandes” y el 66,08% son animales de tamaño “Pequeño”; valores que se encuentran evidenciados en la Figura 34.

RAZA

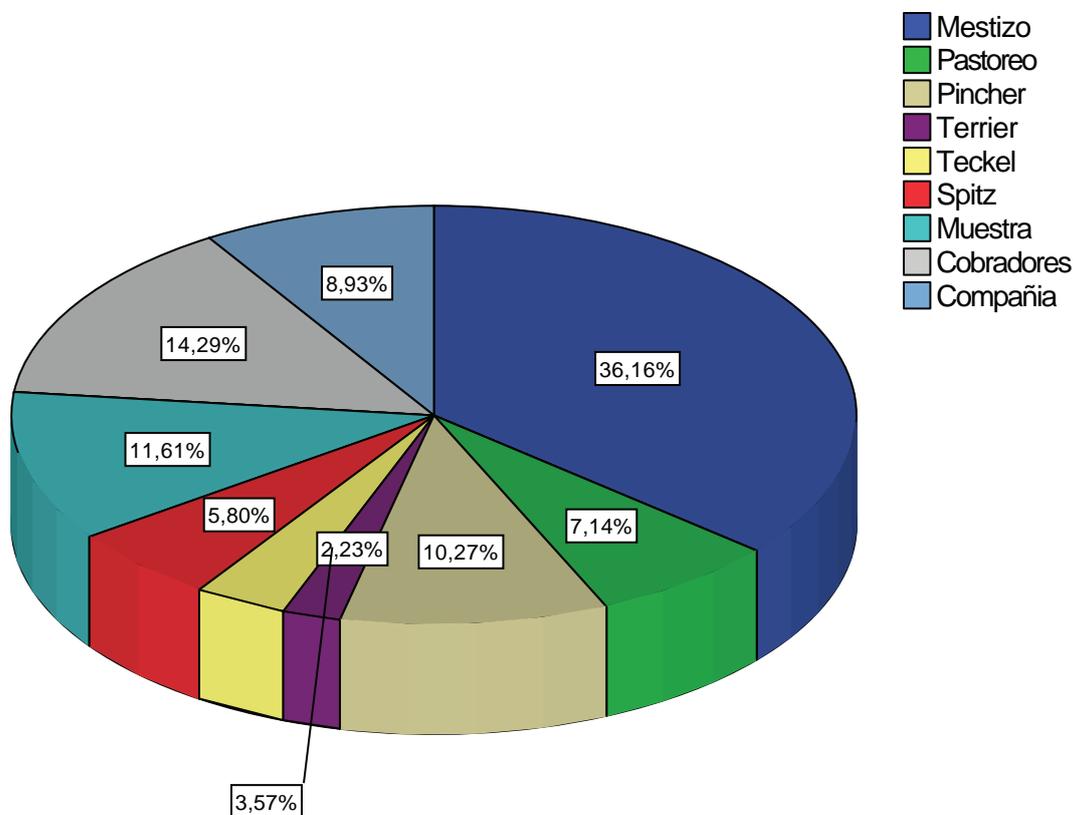


Figura 31: Distribución de los pacientes por “Razas”.

MESTIZAJE

■ Si
■ No

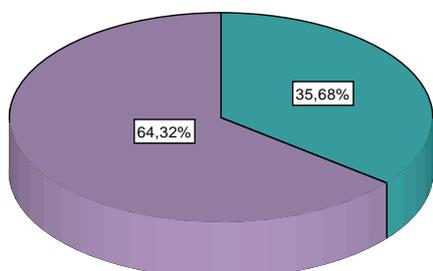


Figura 32: Distribución de las pacientes en función de la variable "Mestizaje".

EDAD

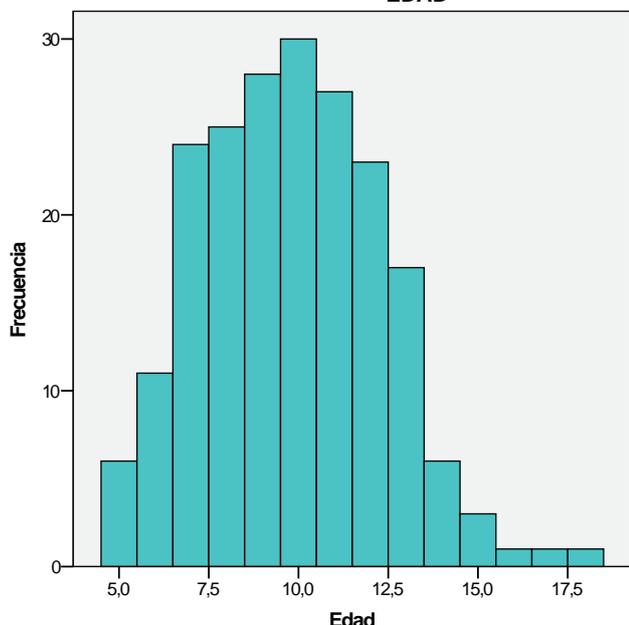


Figura 33: Histograma de la variable "Edad"

TAMAÑO

■ Grande
■ Pequeño

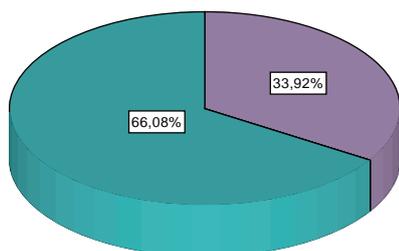


Figura 34: Distribución de las pacientes por su "Tamaño".

- Malignidad:

En lo referente a la malignidad de los tumores mamarios, se ha podido realizar el diagnóstico morfológico en el 55,5% de los casos, de los cuales el 88,1% han resultado ser malignos y el 11,9% benignos, apreciándose la distribución en la Figura 35.

PERFILES GENERALES DE LAS MUESTRAS

Realizado el análisis de las diferentes variables, hemos obtenido los perfiles generales para cada uno de los grupos que componen el estudio:

A. GRUPO I:

Para el grupo general de pacientes se obtiene como paciente promedio a una hembra mestiza, con una edad promedio de 9 años; con un tamaño pequeño y que acude a la consulta padeciendo una patología no tumoral.

B. GRUPO II:

Dentro del grupo de pacientes que no presentan patología tumoral encontramos, como paciente promedio, a una hembra de raza pura, perteneciente al grupo de Perros de Compañía (Grupo 9), con una edad promedio de 8 años y también de pequeño tamaño.

MALIGNIDAD TUMORAL

■ Maligno
■ Benigno

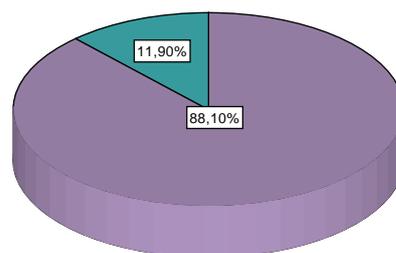


Figura 35: Distribución de las pacientes en función de la "Malignidad" de los tumores mamarios.

C. GRUPO III:

La paciente promedio perteneciente a este grupo es una hembra de raza pura, que se incluye en el grupo de Perros de Compañía (Grupo 9), con una edad promedio de 10 años y nuevamente de tamaño pequeño; el tipo de tumor predominante es mamario y de carácter maligno.

D. GRUPO IV:

En este último grupo de pacientes se obtiene un perfil correspondiente a una hembra de raza pura perteneciente al grupo de Perros Cobradores de Caza y Perros de Agua (Grupo 8), con una edad promedio de 10 años e igualmente de pequeño tamaño; el principal tumor mamario desarrollado es de tipo maligno.

COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS

Una vez realizado el análisis descriptivo de las variables individualmente y obtenidos los perfiles generales de las muestras de los diferentes grupos, pasamos a estudiar la posible relación existente entre las diferentes variables en los grupos de pacientes III (pacientes con patología tumoral) y IV (pacientes con tumores de tipo mamario), respectivamente. De este modo, valoramos las características de este grupo concreto de pacientes (Grupo IV) dentro del conjunto de hembras de la misma franja de edad que padecen cualquier otro tipo de tumor. Podremos así analizar la importancia que presentan los tumores mamarios en el marco de la clínica veterinaria.

- Mestizaje:

En la Figura 36 observamos que aparecen dos datos atípicos, correspondientes a las pacientes 259 y 170, aunque no son influyentes, por lo que no se desestima la información aportada por ellas.

Si analizamos la influencia de la variable “Mestizaje” en la variable “Edad” podemos asumir, tras la realización del Test de Wilcoxon-Mann-Whitney (valor de $p = 0,092$), que el hecho de que la paciente sea mestiza o de raza

pura no afecta a la edad a la que se produce el diagnóstico de un proceso tumoral. Similares resultados se obtienen en el grupo de aquellas pacientes con tumores mamarios (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney; valor de $p = 0,436$).

Al realizar el Test de Chi-cuadrado de Pearson (valor de $p = 0,000$) podemos asumir que el tipo de raza sí afecta a la malignidad de cualquier tipo de tumor. Calculando el Odds Ratio (OR) concluimos que es aproximadamente 1,47 veces más probable que el tumor sea maligno si la paciente es mestiza que si es de raza pura.

Después de realizar el Test de Chi-cuadrado de Pearson (valor de $p = 0,000$) deducimos que el mestizaje sí afecta al tipo de tumor que desarrollan las pacientes. A partir del OR concluimos que es aproximadamente 1,32 veces más probable padecer un tumor de tipo mamario, respecto a los demás tipos de procesos oncológicos, si las pacientes son mestizas que si son de raza pura. Por otra parte, el mestizaje afecta también a la malignidad de los tumores mamarios (Test Chi-cuadrado de Pearson; valor de $p = 0,000$), siendo aproximadamente 1,74 veces (OR) más probable que la neoplasia mamaria sea maligna en las pacientes mestizas que en las pacientes de raza pura.

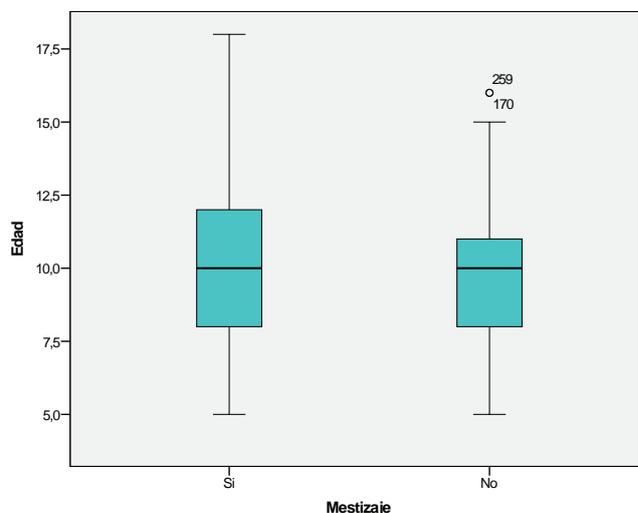


Figura 36: Inferencia “Mestizaje”- “Edad” para las pacientes pertenecientes al Grupo III.

Edad:

En la siguiente gráfica (Figura 37) se aprecian tres datos atípicos, no influyentes, correspondientes a las pacientes 5, 84, 170, por lo que tampoco se desestima la información respecto a estas pacientes.

Aplicando nuevamente el Test de Wilcoxon-Mann-Whitney (valor de $p = 0,703$) no podemos asumir que la edad a la que se realiza el diagnóstico afecte al hecho de que una paciente desarrolle un tumor de un tipo u otro.

En la Figura 38 se puede apreciar la presencia de cuatro valores atípicos, correspondientes a las pacientes 5, 84, 170 y 335. Puesto que estos valores no son influyentes, no se desestima la información que nos aportan.

Al analizar la influencia de la variable “Edad” en la malignidad de cualquier proceso oncológico mediante el Test de Wilcoxon-Mann-Whitney, obtenemos un valor de $p = 0,012$, por lo que podemos asumir que la edad de diagnóstico sí afecta a la variable “Malignidad”, de manera que según aumenta la edad de la paciente se incrementa la probabilidad de malignidad tumoral. Por el contrario, si consideramos sólo el grupo de las pacientes con tumores mamarios, se comprueba que la edad no afecta a esta variable (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney; valor de $p = 0,065$).

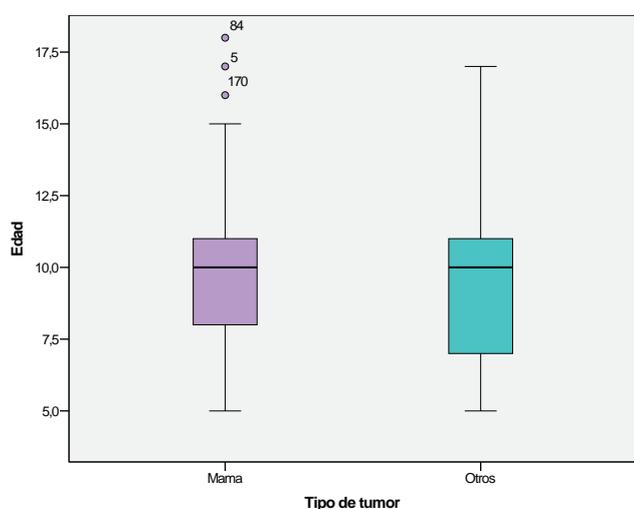


Figura 37: Inferencia “Edad”-“Tipo de tumor” (en “Otros” se excluyen los tumores mamarios).

Tamaño:

En lo referente al tamaño de la paciente, comprobamos que esta variable no afecta a la edad a la que se diagnostica un proceso tumoral, ya sea mamario o no (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney; valor de $p = 0,058$).

Sin embargo, a partir del Test de Chi-cuadrado (valor de $p = 0,000$), podemos asumir que el tamaño del animal sí afecta a la malignidad de los tumores, siendo aproximadamente 0,85 veces (OR) más probable padecer un tumor maligno si la paciente es de tamaño grande que si es pequeña. Obtenemos un resultado similar al analizar la influencia de la variable “Tamaño” sobre los tumores de tipo mamario (Test de Chi-cuadrado; valor de $p = 0,000$), apreciando en esta comparación que es 2,34 veces (OR) más probable que el tumor sea de carácter maligno cuando las pacientes son de tamaño “Grande”.

También se comprueba, tras llevar a cabo el Test de Chi-cuadrado (valor de $p = 0,000$), que la circunstancia de ser un individuo de tamaño grande o pequeño afecta al hecho de que la paciente desarrolle un tipo de neoplasia en concreto, siendo 0,49 veces (OR) más probable padecer un tumor mamario si la perra es de tamaño “Grande” que si es de tamaño “Pequeño”.

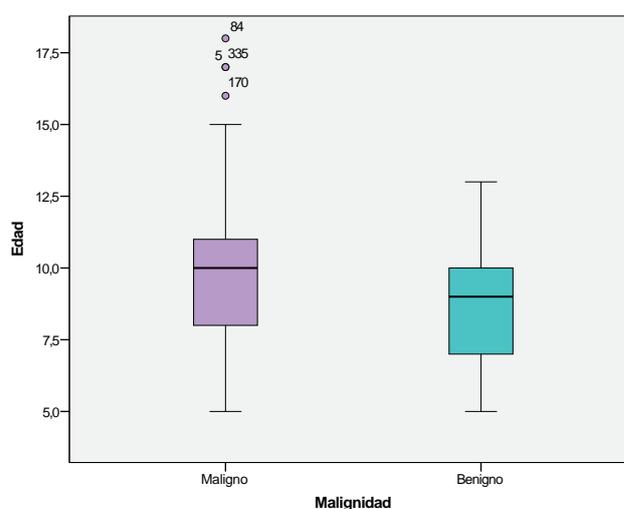


Figura 38: Diagrama de cajas para la inferencia “Edad”-“Malignidad”.

2. ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS PRONÓSTICO: CLÍNICOS, MORFOLÓGICOS E INMUNOHISTOQUÍMICOS EN CARCINOMAS MAMARIOS CANINOS DURANTE EL PERIODO COMPRENDIDO ENTRE 2008 Y 2012.

ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LAS VARIABLES

Se ha realizado el estudio descriptivo de las diferentes variables analizadas en un grupo de pacientes con carcinomas mamarios, que ha incluido a 77 individuos.

- Raza:

La distribución en función de la raza se muestra en la Figura 39, en la que podemos observar que el Grupo 7 (Perros de muestra) es el más numeroso con un 37,66%, siendo el Grupo 8 (Perros Cobradores de Caza – Perros Levantadores de Caza – Perros de Agua) el segundo más frecuente con un 15,58%, mientras

que los grupos con una menor representación son los Terriers (Grupo 3) y los Teckels (Grupo 4) con un 3,9%.

- Mestizaje:

En la Figura 40 se observa que el 37,66% de las pacientes de nuestro estudio son mestizas, frente al 62,34% de pacientes de raza pura, representando casi el doble que el grupo de pacientes mestizas.

- Edad:

La distribución en función de la edad se representa en la Figura 41, observándose que no se puede asumir la normalidad.

Al llevar a cabo las pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk se obtienen unos valores de p iguales a 0,000 y 0,035, respectivamente, por lo que no se puede asumir la normalidad de la variable “Edad”. De esta forma, se toma como valor promedio el valor de la mediana, 10 años, con un rango intercuartílico (IQR) de 4 años.

RAZA

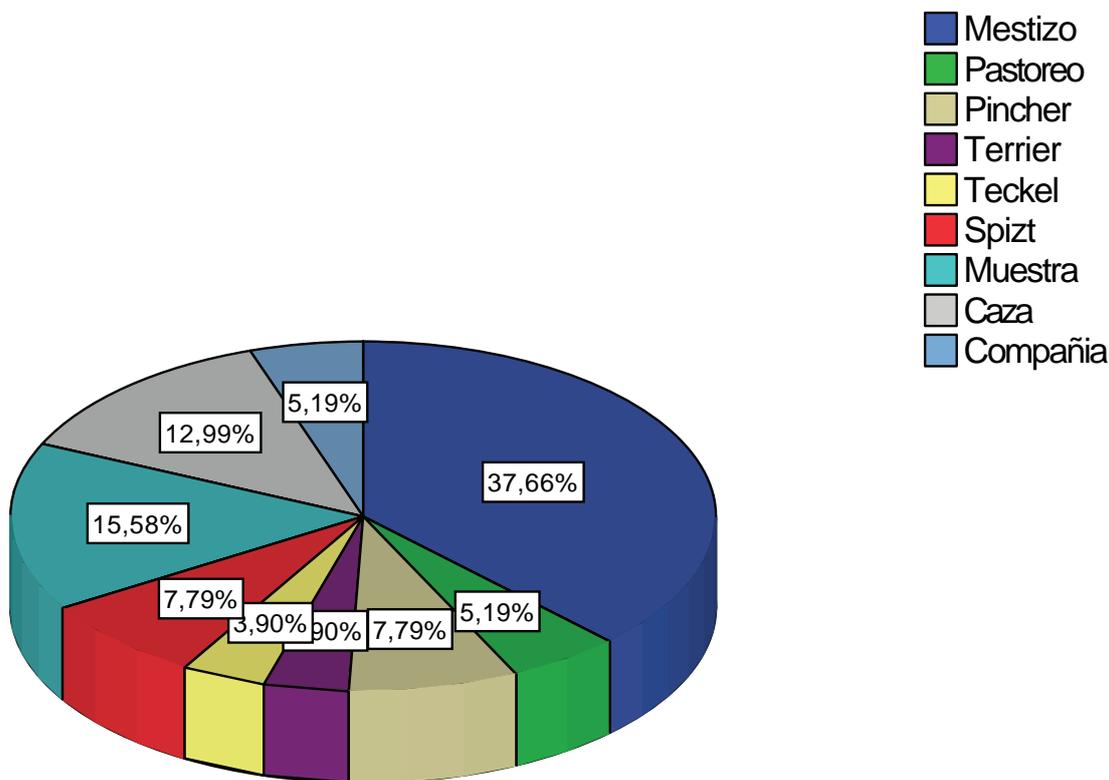


Figura 39: Distribución de las pacientes por Grupos de Razas.

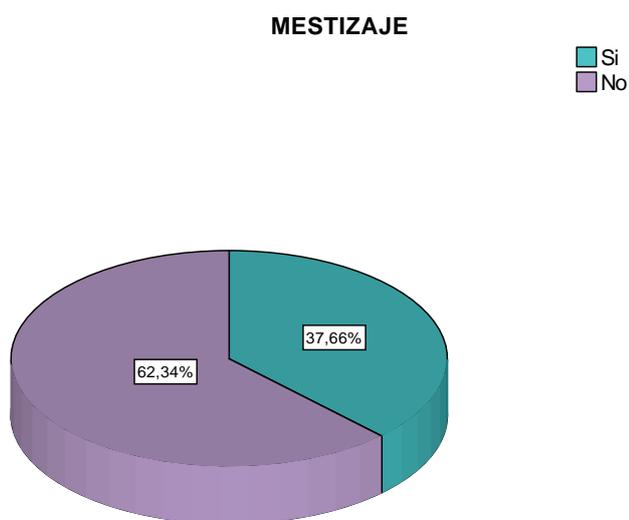


Figura 40: Distribución de pacientes en función de si son mestizas o de raza pura.

- Tamaño:

En la Figura 42 se observa que el 64,94% de las pacientes son de tamaño “Pequeño”, mientras que solo el 35,06% son de tamaño “Grande”.

- Castración previa:

En esta variable se valora si se ha llevado a cabo una ovariectomía previa al diagnóstico de la neoplasia, observándose que sólo se ha realizado ésta en un 11,69% de las pacientes, frente al 88,31% que no estaban castradas en ese momento (Figura 43).

- Edad de castración previa:

Pese a que los valores de p obtenidos al llevar a cabo las pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk son 0,200 y 0,979, respectivamente, no se puede rechazar

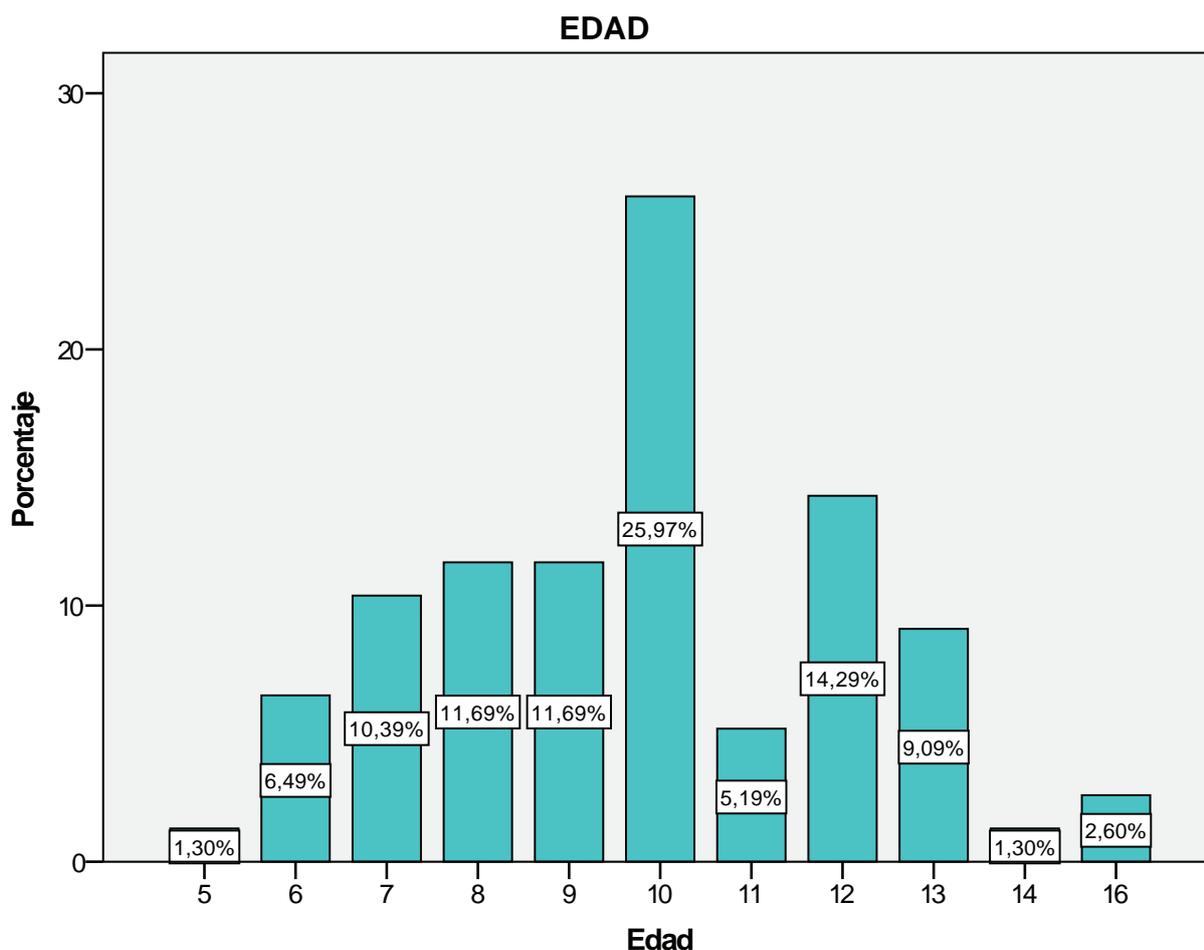


Figura 41: Histograma de la variable “Edad”.

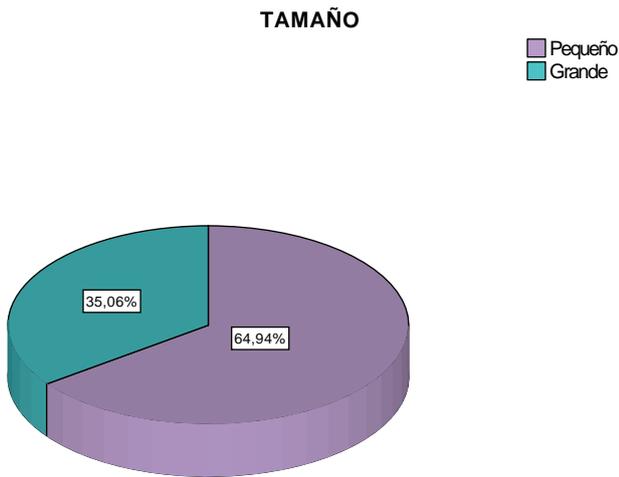


Figura 42: Distribución de pacientes según su "Tamaño".

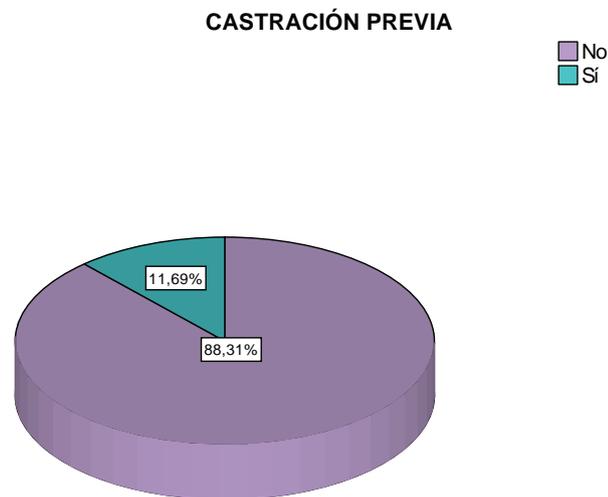


Figura 43: Distribución de pacientes en función de si están castradas o no.

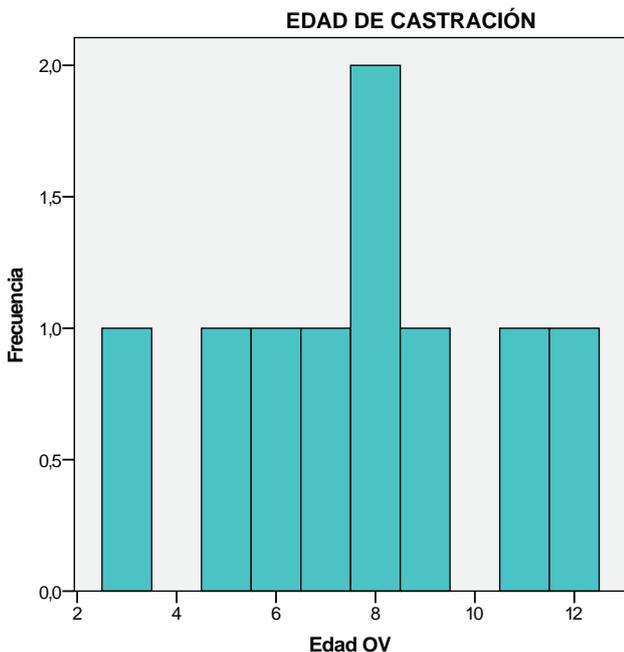


Figura 44: Histograma de la variable "Edad de castración previa"

la normalidad de la variable "Edad previa a la castración" (Figura 44), ya que la frecuencia es muy baja.

Esta variable sólo se ha podido valorar, como ya se ha señalado previamente, en el 11,7% de las pacientes, que son las que han sido castradas previamente al diagnóstico de la enfermedad, siendo la edad promedio de estos animales de 8 años, con un rango intercuartílico de 5 años.

- Número de gestaciones:

El análisis del número de gestaciones se ha realizado en 66 pacientes de las que se ha obtenido la siguiente información (Tabla 12). La Figura 45 muestra que el 74,2% de las pacientes no han estado nunca gestantes, frente al 18,2% de las hembras que han tenido una o varias gestaciones y al 7,6% de las pacientes que eran múltiparas.

- Número de pseudogestaciones:

Se observa que de 63 de las pacientes de las que se ha podido tener acceso a esta información, el 28,6% de las pacientes del estudio han presentado múltiples pseudogestaciones (Tabla 13), mientras que el 71,4% nunca las ha padecido, representando este grupo de hembras más del doble de las simbolizadas en el primer caso (Figura 46).

- Tratamientos hormonales:

La Figura 47 muestra que el 81,5% de las pacientes nunca han recibido tratamientos

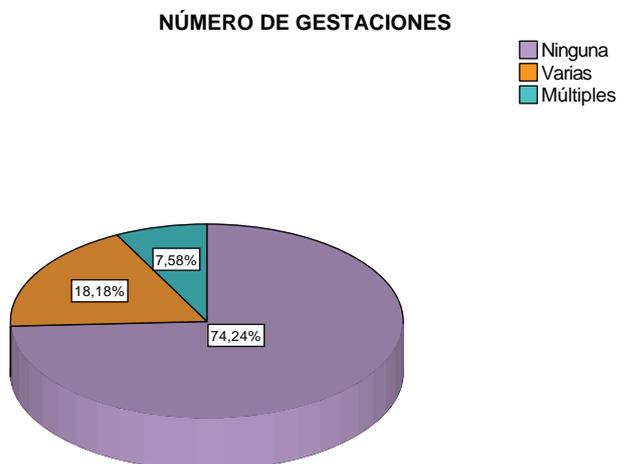


Figura 45: Distribución de pacientes según el "Número de gestaciones" que hayan tenido.

hormonales para la inhibición del celo, frente a tan sólo el 9,2% de las hembras a las que sí se les ha administrado en alguna ocasión y al 9,2% que lo han recibido en múltiples ocasiones (Tabla 14).

- Antecedentes tumorales:

Para esta variable epidemiológica detectamos que el 77,8% de las pacientes no han desarrollado

ningún tumor de mama con anterioridad al momento del diagnóstico, mientras que sólo una pequeña representación de pacientes, el 22,2%, sí han tenido una detección previa de dicha enfermedad (Figura 48).

- Cadena mamaria afectada:

La Figura 49 muestra que el 54,55% de las pacientes han presentado tumores en ambas

Tabla 12: Frecuencia y porcentajes de pacientes según la cantidad de gestaciones que han desarrollado.

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Ninguna	49	63,6	74,2	74,2
	Varias	12	15,6	18,2	92,4
	Múltiples	5	6,5	7,6	100,0
	Total	66	85,7	100,0	
Perdidos	Sistema	11	14,3		
Total		77	100,0		

Tabla 13: Frecuencia y porcentajes de pacientes según el número de pseudogestaciones que han padecido.

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Ninguna	45	58,4	71,4	71,4
	Múltiples	18	23,4	28,6	100,0
	Total	63	81,8	100,0	
Perdidos	Sistema	14	18,2		
Total		77	100,0		

NÚMERO DE PSEUDOGESTACIONES

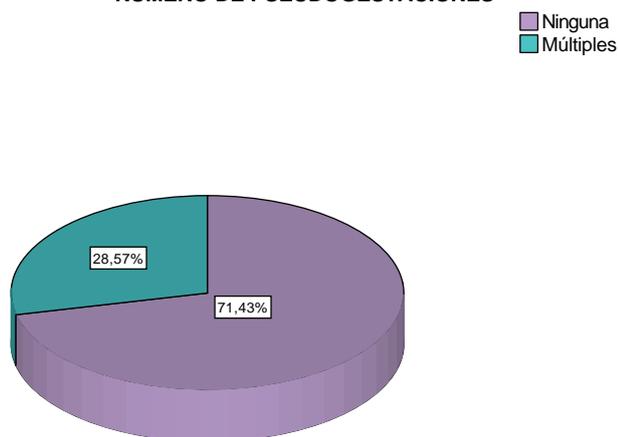


Figura 46: Distribución de pacientes en función de si ha padecido múltiples gestaciones o ninguna.

ANTECEDENTES TUMORALES

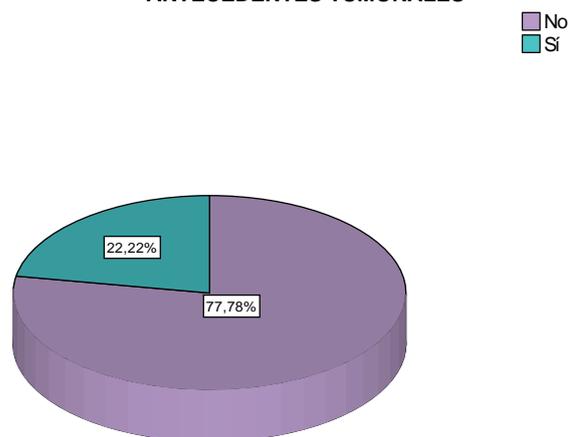


Figura 48: Distribución de pacientes según si han padecido algún proceso tumoral mamario previo a la detección de la enfermedad en nuestra consulta.

TRATAMIENTOS HORMONALES

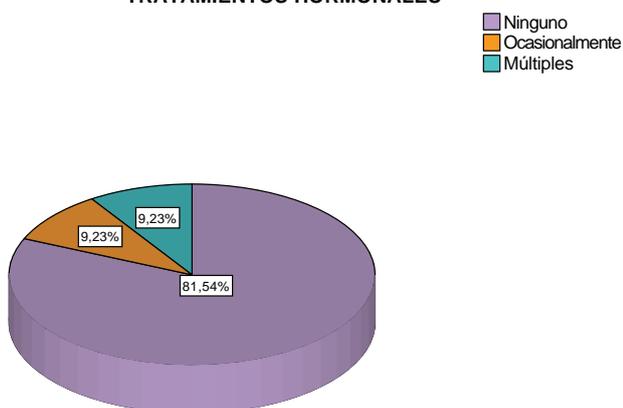


Figura 47: Distribución de pacientes en función de la cantidad de "Tratamientos hormonales" que se les haya administrado.

CADENA MAMARIA AFECTADA

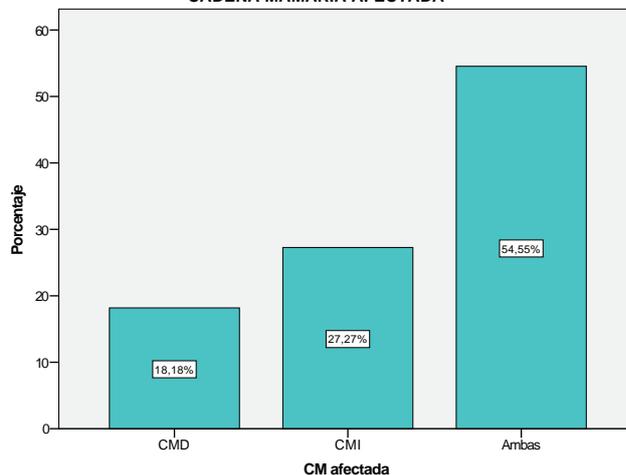


Figura 49: Distribución de pacientes en función de que cadena mamaria se encuentra afectada.

cadena mamarias, mientras que el 45,45% tienen afectada una sola cadena, siendo en el 18,18% la cadena mamaria derecha y en el 27,27% la cadena izquierda.

- Presentación del tumor en la glándula afectada:

El 76,6% de las pacientes presenta un único nódulo tumoral en las mamas afectadas, frente al 23,4% que han desarrollado más de un nódulo en la misma glándula mamaria (Figura 50).

- Estudio radiológico de la cavidad torácica:

La Figura 51 refleja que tan solo en el 5,2% de las pacientes se aprecian metástasis en el estudio radiológico de la cavidad torácica, ya sea en

pulmón o en ganglios linfáticos mediastínicos.

- Estudio radiológico de la cavidad abdominal:

Solo se han realizado radiografías de abdomen en el 23,4% de las pacientes del estudio (Tabla 15), tan solo en el 22,2% de ellas se ha evidenciado desarrollo de alguna metástasis en esta cavidad, mientras que el 77,8% no se ha detectado indicios de diseminación de la enfermedad (Figura 52).

- Estudio ecográfico de la cavidad abdominal:

En esta variable encontramos un número muy elevado de valores perdidos, como se aprecia en la siguiente tabla (Tabla 16), donde se muestra la frecuencia y porcentajes de pacientes a las que

Tabla 14: Frecuencia y porcentajes de pacientes según el número de tratamientos hormonales que se les ha administrado.

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Ninguno	53	68,8	81,5	81,5
	Ocasionalmente	6	7,8	9,2	90,8
	Múltiples	6	7,8	9,2	100,0
	Total	65	84,4	100,0	
Perdidos	Sistema	12	15,6		
Total		77	100,0		

Tabla 15: Estudio de la presencia de metástasis mediante radiografía abdominal

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	No metástasis	14	18,2	77,8	77,8
	Metástasis	4	5,2	22,2	100,0
	Total	18	23,4	100,0	
Perdidos	Sistema	59	76,6		
Total		77	100,0		

Tabla 16: Estudio de la presencia de metástasis mediante ecografía abdominal

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	No metástasis	5	6,5	83,3	83,3
	Metástasis	1	1,3	16,7	100,0
	Total	6	7,8	100,0	
Perdidos	Sistema	71	92,2		
Total		77	100,0		

PRESENTACIÓN DEL TUMOR EN LA GLÁNDULA AFECTADA

Única
Diversos

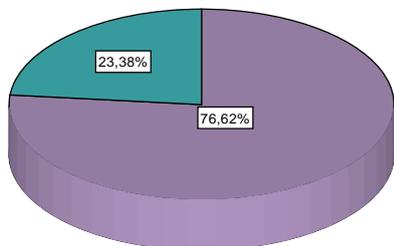


Figura 50: Distribución de pacientes dependiendo de si presenta uno o múltiples nódulos en la glándula mamaria afectada.

ESTUDIO RADIOLÓGICO DE LA CAVIDAD ABDOMINAL

No metástasis
Metástasis

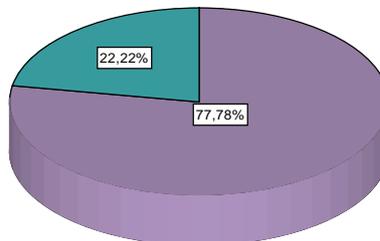


Figura 52: Distribución de las pacientes a las que se les realiza un estudio radiológico abdominal en función de si presentan o no metástasis en dicha cavidad.

ESTUDIO RADIOLÓGICO DE LA CAVIDAD TORÁCICA

No metástasis
Metástasis

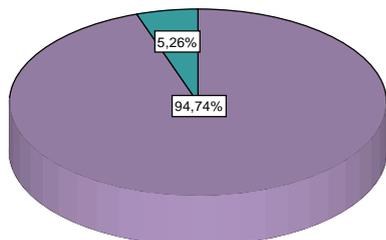


Figura 51: Distribución de pacientes en función de si presentan o no metástasis en tórax visualizadas en el estudio radiológico.

ESTUDIO ECOGRÁFICO DE LA CAVIDAD ABDOMINAL

No metástasis
Metastasis

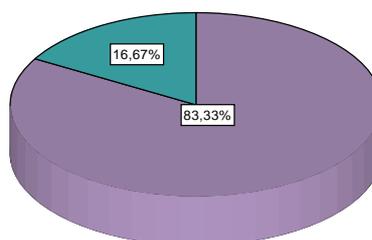


Figura 53: Distribución de las pacientes a las que se les realiza un estudio ecográfico abdominal en función de si presentan o no metástasis.

se les realizan ecografía abdominal (válidos), según presencia o ausencia de metástasis, frente a las que no se les hace dicha prueba (perdidos). Respecto a los porcentajes obtenidos de las pacientes en las que se lleva a cabo dicho estudio ecográfico (7,8% de las pacientes), se observa que sólo en el 16,7% de los casos se detecta la presencia de metástasis en la cavidad abdominal (Figura 53).

- Tratamiento quirúrgico aplicado:

Por lo que respecta al tipo de tratamiento quirúrgico llevado a cabo, la intervención más empleada es la mastectomía radical, realizada en un 46,8% de las pacientes, siendo la segunda

técnica más común la mastectomía en bloque, aplicada al 16,9% de las pacientes de nuestro estudio (Figura 54). Sólo hemos detectado un caso en el que la paciente muere antes de la intervención quirúrgica, procediéndose a la realización de la necropsia reglada con la toma de muestras para el análisis histopatológico. Con fines estadísticos esta paciente aparece recogida como “Biopsia postmortem” en la Figura 54.

- Ovariohisterectomía simultánea al tratamiento oncológico:

La castración en el momento de la intervención quirúrgica se ha llevado a cabo en el 16,0% de las pacientes, frente al 84,0% de ellas en las que

sólo se ha procedido a la realización de la cirugía oncológica (Figura 55).

- Implantación o fijación de la neoplasia:

La Figura 56 evidencia que en el 75,7% de los casos las masas tumorales son móviles, presentando el resto de los procesos fijación a las estructuras corporales adyacentes (24,4%), entre los cuales sólo el 6,8% se infiltra tanto en

tejidos adyacentes como en piel, otro 6,8% se fija únicamente en piel y el 10,8% se implanta en tejidos adyacentes (Tabla 17).

- Ulceración:

En esta variable destacamos que solamente en un 6,49% de los procesos tumorales mamarios se observa ulceración de la piel, frente al 93,51% en los que el tejido cutáneo está intacto (Figura 57).

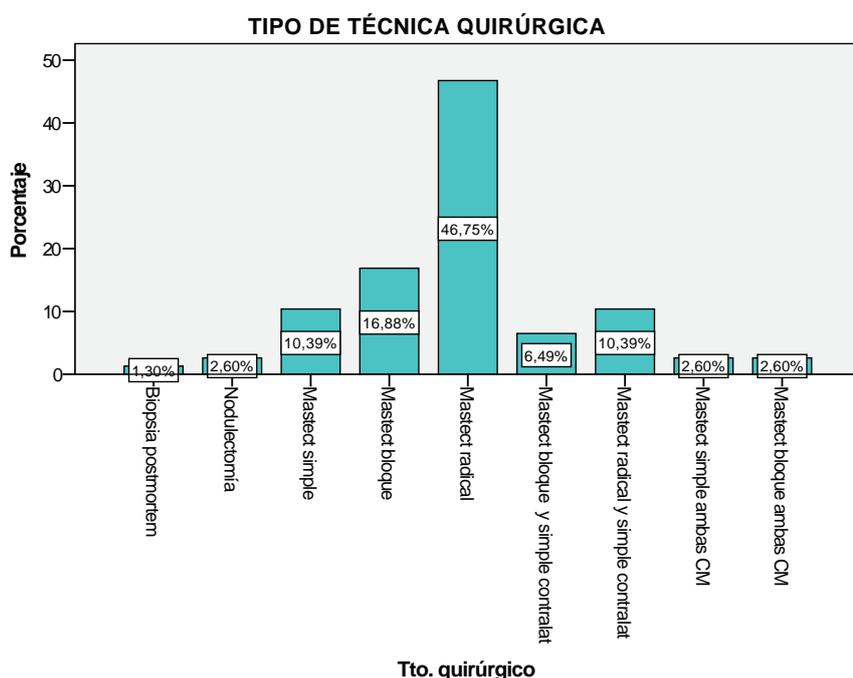


Figura 54: Distribución de las pacientes en función de la técnica quirúrgica empleada.

Tabla 17: Frecuencia y porcentajes de pacientes cuyas neoplasias presentan fijación a otras estructuras

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Móvil	56	72,7	75,7	75,7
	Adhesión Piel	5	6,5	6,8	82,4
	Adhesión Tejidos adyacentes	8	10,4	10,8	93,2
	Adhesión a piel y tejidos adyacentes	5	6,5	6,8	100,0
	Total	74	96,1	100,0	
Perdidos	Sistema	3	3,9		
Total		77	100,0		

- Necrosis:

En lo referente a la presencia de necrosis macroscópica se puede observar, como indica la Figura 58, que el 64,94% de las neoplasias no presentan necrosis, frente al 22,08% en el que se aprecian amplias áreas de necrosis. Un porcentaje intermedio se obtiene para aquellos tumores con algún foco puntual de necrosis.

- Velocidad de crecimiento:

Al analizar esta variable se muestra como en una tercera parte de los tumores analizados (37,7%), de los que se disponía de esta información (Tabla 18), se describe un crecimiento rápido del tumor, frente a otro tercio (34,4%) que presentan un crecimiento lento. El 21,3% de los procesos oncológicos mamarios han crecido de manera muy rápida, según criterio personal del propietario del animal (Figura 59).

- Características macroscópicas del tumor:

El análisis de las características macroscópicas muestra que casi dos tercios de los nódulos tumorales (64,94%) se observan como masas definidas (bien delimitadas) y consistentes (Figura 60), mientras que los restantes procesos se clasificaron en definidos y no consistentes, no definidos y consistentes, y no definidos y no consistentes.

- Diagnóstico histopatológico del tumor:

En cuanto al diagnóstico histopatológico de la neoplasia (Figura 61), destaca la mayor representación del carcinoma complejo (24,68%), seguido del carcinoma mixto (15,58%), resaltando la baja incidencia del carcinoma micropapilar invasivo (1,3%).

CASTRACIÓN SIMULTÁNEA AL TRATAMIENTO ONCOLÓGICO

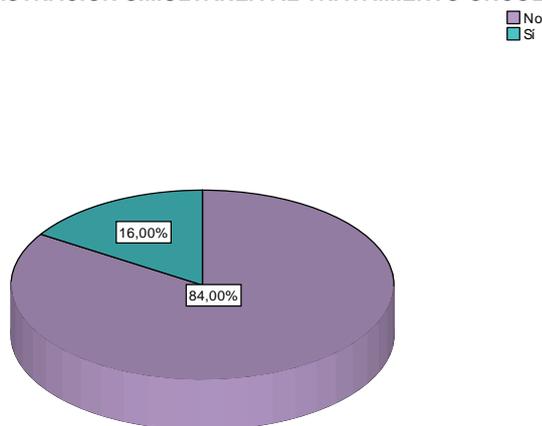


Figura 55: Distribución de las pacientes dependiendo de si se les ha practicado una ovariectomía simultánea al tratamiento quirúrgico.

ULCERACIÓN

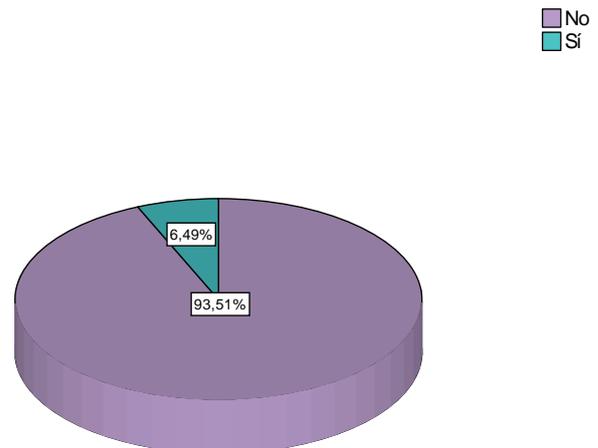


Figura 57: Distribución de pacientes en función de si el tumor primario que presentan está o no ulcerado.

IMPLANTACIÓN O FIJACIÓN

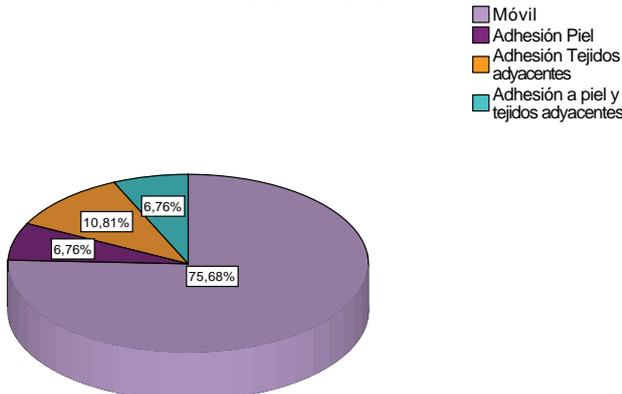


Figura 56: Fijación (adherencias).

NECROSIS

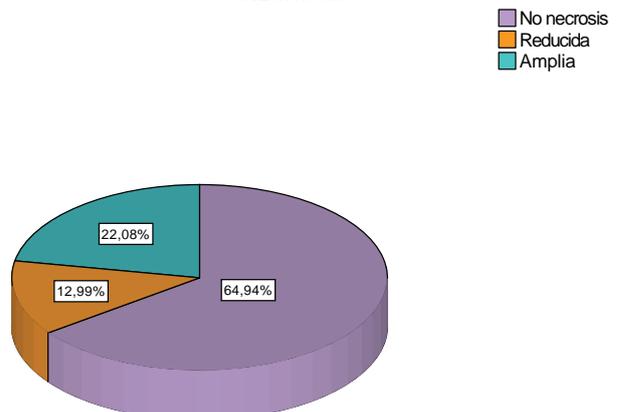


Figura 58: Distribución de pacientes en función de si su tumor primario presenta o no necrosis.

VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

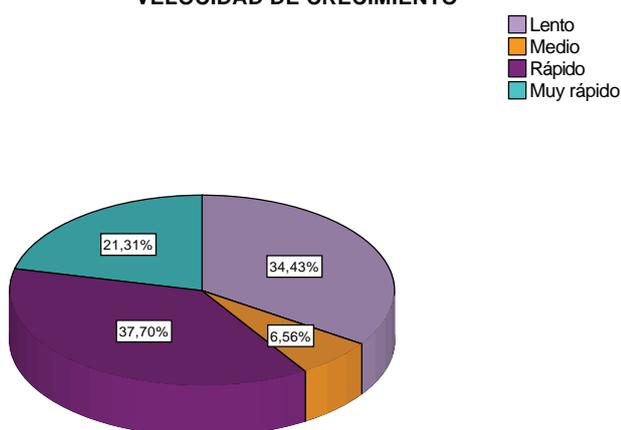


Figura 59: Distribución de pacientes en función de la velocidad de crecimiento del tumor primario.

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DEL TUMOR

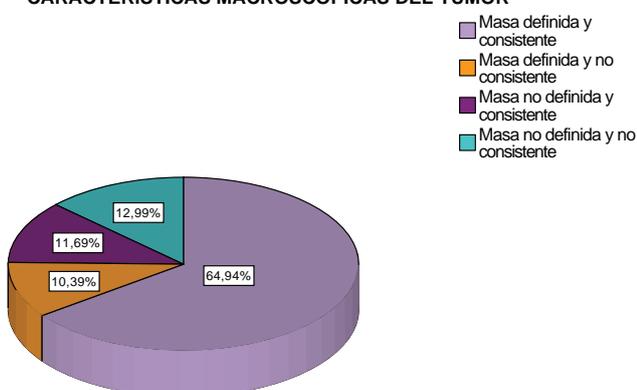


Figura 60: Distribución de pacientes según las "Características macroscópicas del tumor".

- Tamaño del tumor primario:

En el análisis de esta variable se aprecia que el 57,14% de los tumores exhiben un tamaño menor de 3 cm de diámetro máximo, frente al 33,77% que alcanzan un tamaño superior a 5 cm de diámetro (Figura 62).

- Estado de los ganglios linfáticos regionales:

La Figura 63 refleja el estado del ganglio linfático regional, mostrando que sólo el 14,71% de los ganglios linfáticos regionales extirpados presentan metástasis, mientras que el 85,29

- Metástasis distantes:

La Figura 64 muestra que el 88,31% de las pacientes del estudio no han desarrollado metástasis en zonas distantes, frente a tan sólo el 11,69% en las que si se ha hallado metástasis en cavidad torácica o abdominal.

- Estadaje tumoral:

Después de valorar las tres variables anteriores, se comprueba que casi la mitad de las pacientes se hallan en un estadio I (47,83%), seguido de aquellas que se encuentran en un estadio III (20,29%) (Figura 65).

Tabla 18: Frecuencia y porcentajes de pacientes en función de la velocidad de crecimiento del tumor

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	Lento	21	27,3	34,4	34,4
	Medio	4	5,2	6,6	41,0
	Rápido	23	29,9	37,7	78,7
	Muy rápido	13	16,9	21,3	100,0
	Total	61	79,2	100,0	
Perdidos	Sistema	16	20,8		
Total		77	100,0		

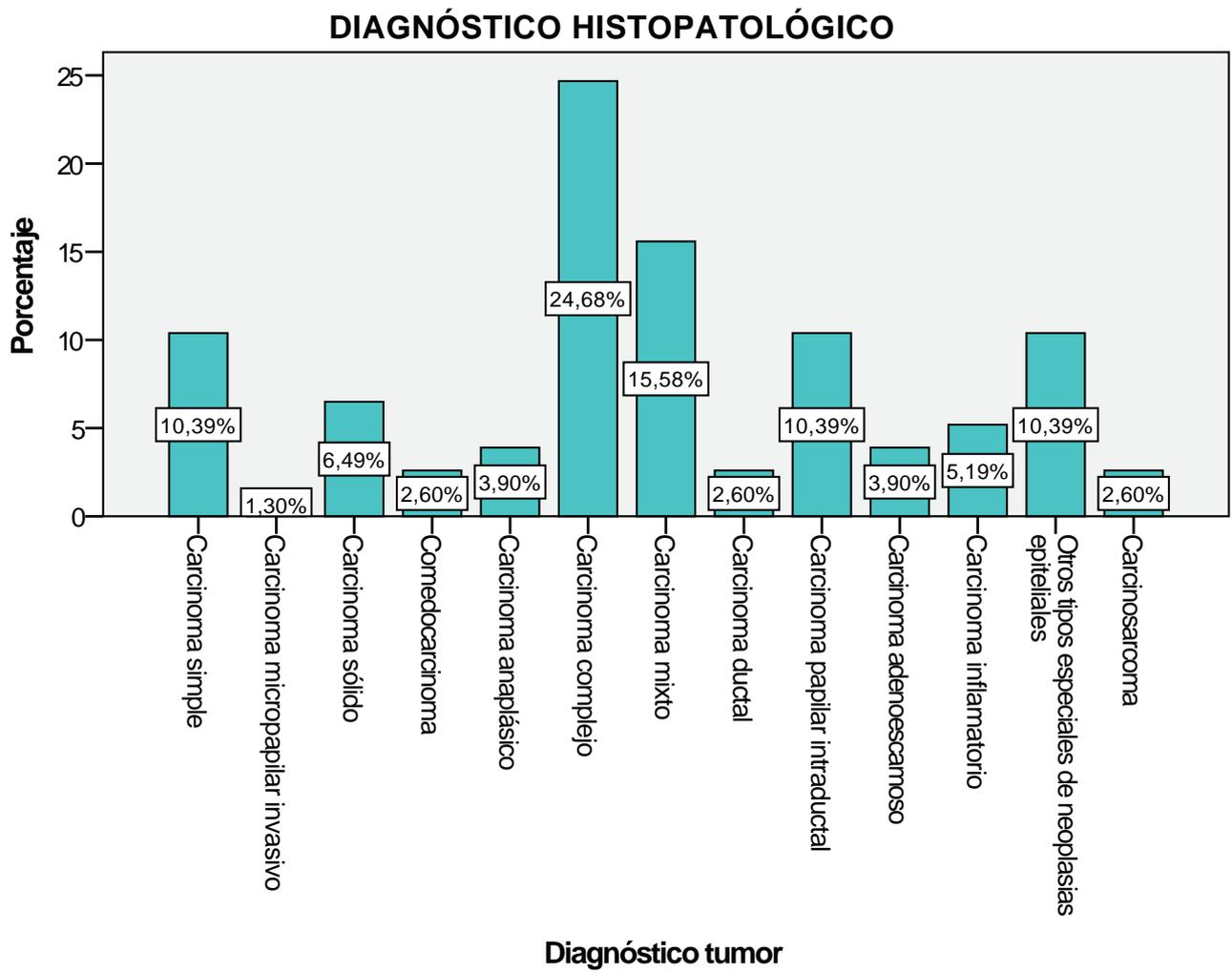


Figura 61: Diagnóstico histopatológico del tumor.

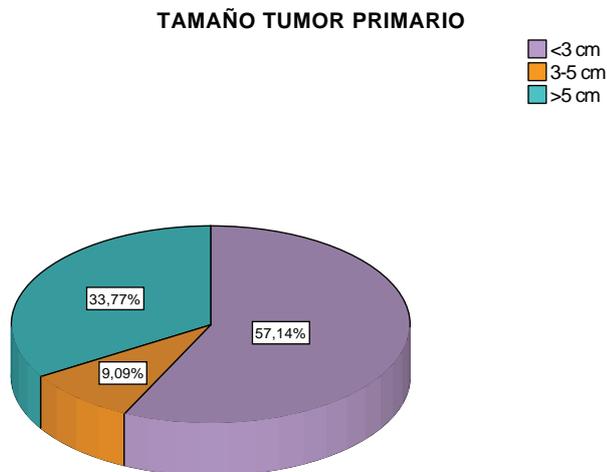


Figura 62: Distribución de pacientes en función del tamaño del tumor primario.

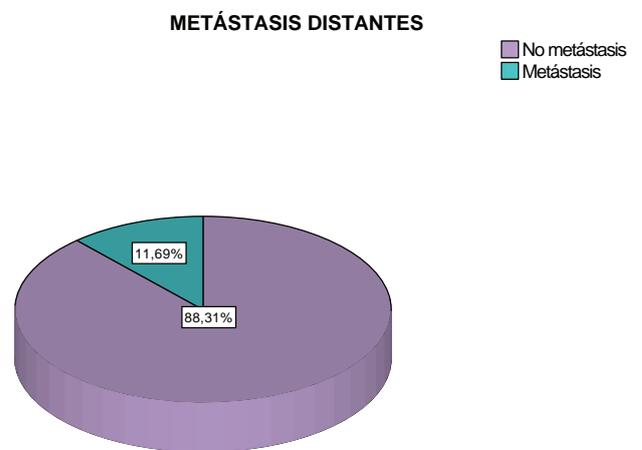


Figura 63: Distribución de pacientes en función de si presentan "Metástasis distantes" o no.

- Grado histológico de malignidad:

En esta variable se aprecia como la mayor parte de los tumores analizados (41,56%) presentan un grado de malignidad II o intermedio, respecto a los tumores con un grado de malignidad I o bajo, que representan un 32,47%, y los de grado III o alto, con un 25,97% de las pacientes (Figura 66).

- Invasión peritumoral:

En lo referente a la presencia de invasión peritumoral, esta se visualiza en un 33,77% de las pacientes de nuestro estudio, lo que supone sólo un tercio del total de tumores analizados (Figura 67).

- Invasión vascular:

En las muestras de los tumores analizados se observa invasión vascular por células neoplásicas en el 28,57% de los casos, frente al 71,43% en los que no se detecta invasión, casi tres cuartas partes de las muestras estudiadas (Figura 68).

- Reacción inflamatoria:

Al valorar la presencia de reacción inflamatoria en los tejidos se puede observar que tan sólo en el 10,39% de las muestras hay ausencia total de dicho proceso, mientras que en el restante 89,61% se evidencia esta lesión en diferentes grados de intensidad. En 33,77%

ESTADO DEL GANGLIO LINFÁTICO REGIONAL

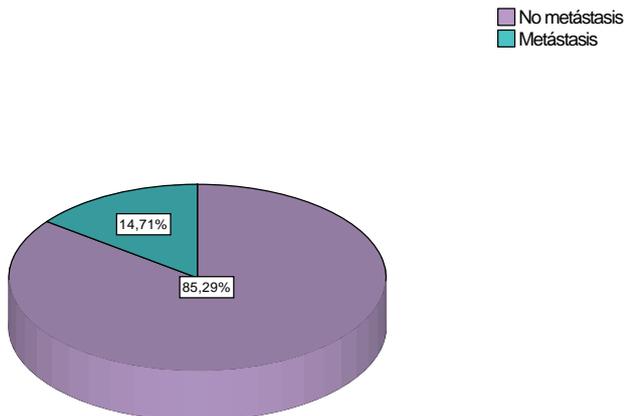


Figura 64: Distribución de pacientes según el "Estado del ganglio linfático regional".

GRADO DE MALIGNIDAD

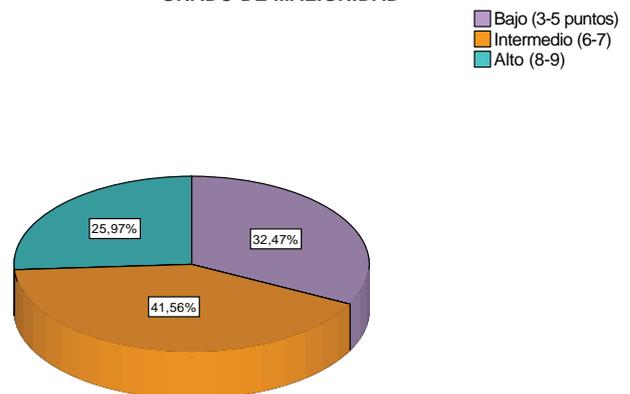


Figura 66: Distribución de los tumores según su "Grado de malignidad".

ESTADIAJE TUMORAL

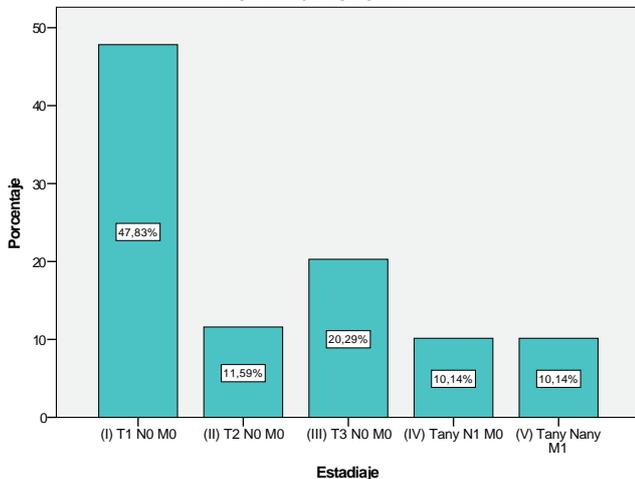


Figura 65: Distribución de pacientes según su estadio.

INVASIÓN PERITUMORAL

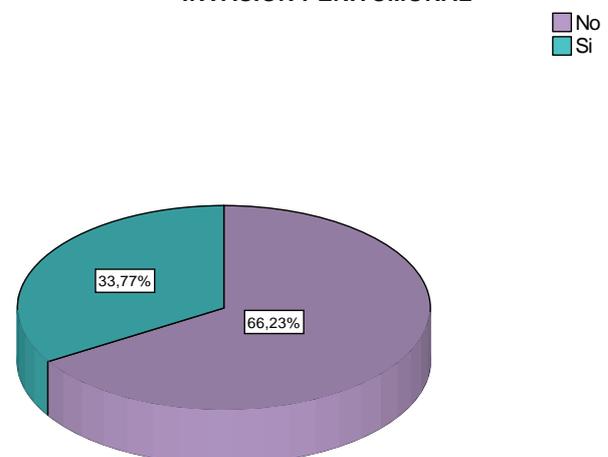


Figura 67: Presencia o ausencia de invasión peritumoral.

de las neoplasias la reacción inflamatoria es intensa, obteniéndose un porcentaje similar para las reacciones moderadas y un 22,08% para las inflamaciones leves (Figura 69).

- Vinculación de la reacción inflamatoria:

En el 85,7% de las muestras se ha observado reacción inflamatoria estando ésta vinculada a zonas peritumorales en el 75,8% (Tabla 19). Así mismo, es remarcable que sólo en el 3,0% de los tumores aparece vinculada a áreas de necrosis (Figura 70). Respecto a la zona donde se vincula la reacción inflamatoria,

- Puntuación final para el receptor de estrógeno α :

En el análisis de esta variable se debe destacar que el 68,83% de los tumores son negativos frente al ER α , mientras que aquellos cuya inmunotinción nuclear suma un total de 5 puntos representan un 13% del total de tumores valorados; las muestras con una puntuación más baja (3 puntos) y más alta (7 puntos) sólo simbolizan un 1,30% de las neoplasias para cada puntuación (Figura 71).

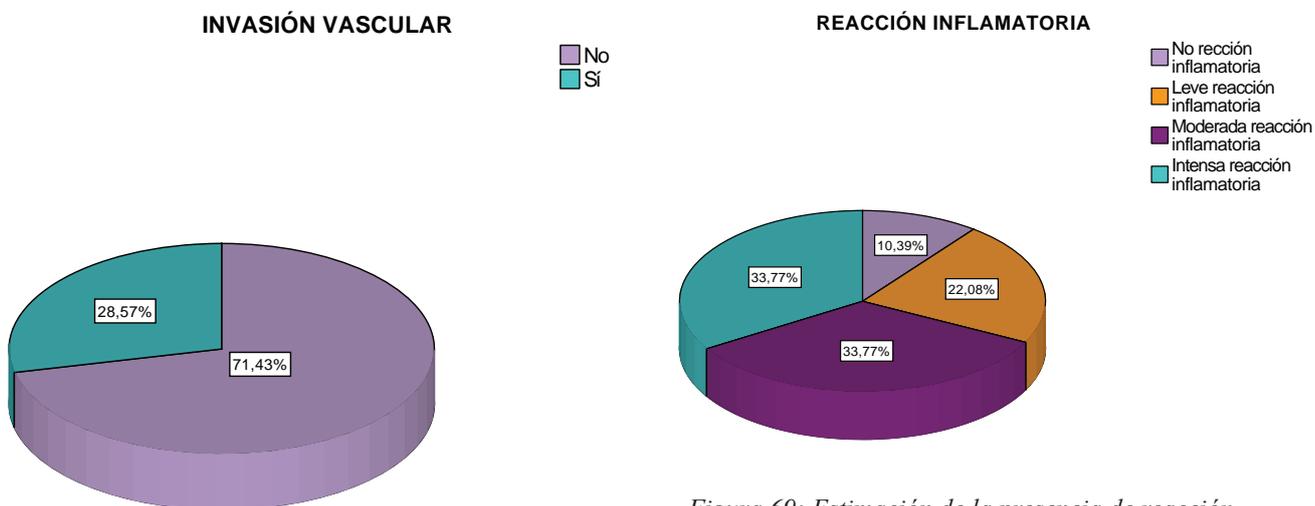


Figura 68: Presencia o ausencia de invasión vascular.

Figura 69: Estimación de la presencia de reacción inflamatoria.

Tabla 19: Localización de la reacción inflamatoria vinculada al tumor

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	No vinculada a áreas de necrosis ni zonas peritumorales	3	3,9	4,5	4,5
	Vinculada a áreas de necrosis y zonas peritumorales	11	14,3	16,7	21,2
	Vinculada a áreas de necrosis	2	2,6	3,0	24,2
	Vinculada a zonas peritumorales	50	64,9	75,8	100,0
	Total	66	85,7	100,0	
Perdidos	Sin reacción inflamatoria	11	14,3		
Total		77	100,0		

- Positividad para el receptor de estrógeno α :

Al analizar la positividad de los tumores en nuestro estudio, se aprecia que aproximadamente dos tercios del porcentaje total de estos (68,83%) son negativos al ER α , frente al 31,17% que son positivos (Figura 72).

- Puntuación final para el receptor de progesterona:

Para el receptor de progesterona se obtiene una inmunotinción nuclear con un mayor porcentaje de tumores con una puntuación final de 7 (32,47%), seguido de aquellos procesos con una puntuación final de 6 (19,48%). Este mismo porcentaje obtienen las neoplasias con una puntuación final de 0 (Figura 73).

- Positividad para el receptor de progesterona:

En la Figura 74 se observa que el 80,26% de los tumores son positivos a los PR, frente al 19,74% que resultan negativos.

- Positividad a receptores hormonales:

Aunando las variables anteriores de “Positividad para el receptor de estrógeno α ” y “Positividad para el receptor de progesterona”, hemos obtenido esta variable, que al ser analizada refleja que un 18,18% de las neoplasias son negativas frente ambos receptores hormonales, mientras que un 28,57% son positivos a los dos. Por otra parte, destacar que tan sólo un 1,30% de los procesos son positivos frente al ER α y un 51,95% son positivos solamente para el PR (Figura 75).

- Puntuación final para la oncoproteína c-erbB-2:

La gráfica que corresponde a la Figura 76 muestra el porcentaje de inmunotinción para la oncoproteína c-erbB-2, en ella se comprueba que en el 15,58% de las muestras tumorales no hay tinción de la membrana celular (0+), que en el

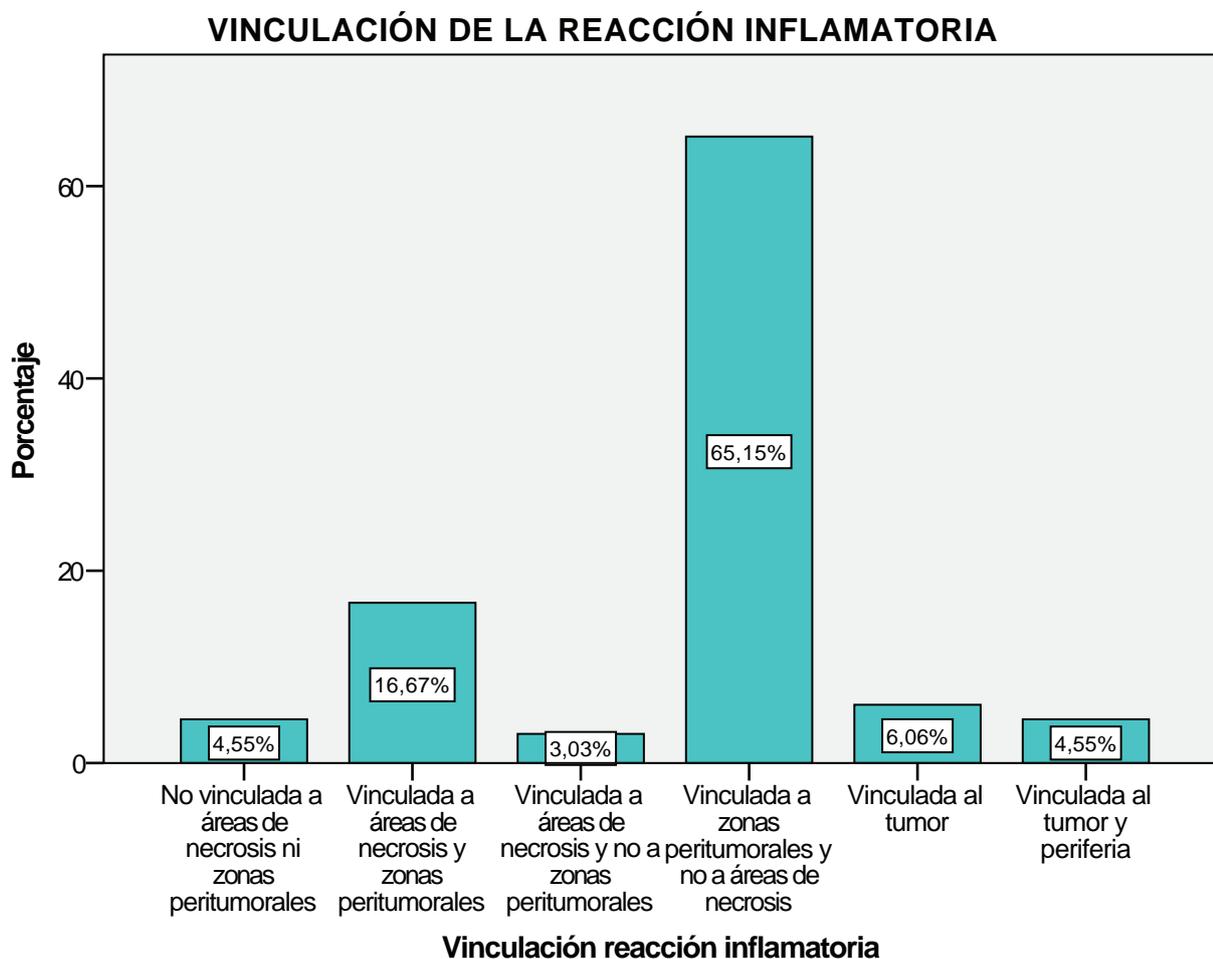


Figura 70: Distribución de las muestras en función de las distintas zonas a donde se vincula la reacción inflamatoria.

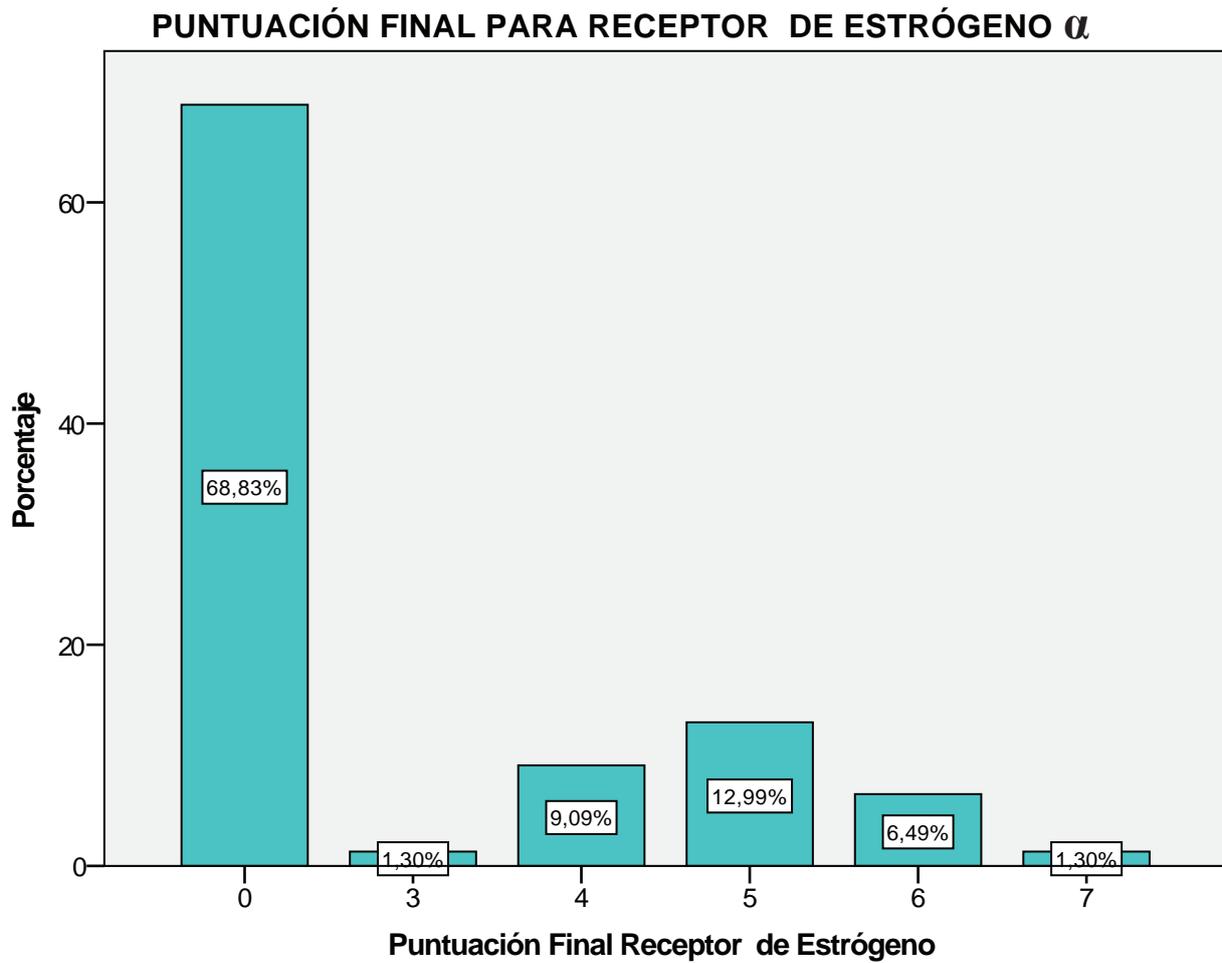


Figura 71: Distribución de pacientes en función de la puntuación final obtenida para la inmunotinción de los receptores de estrógenos.

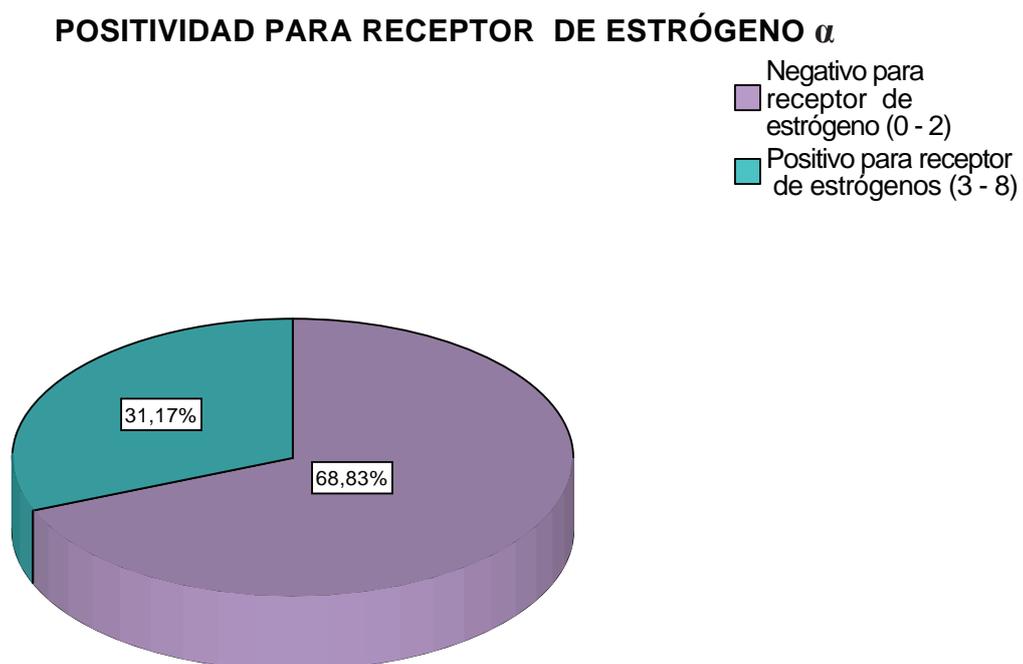


Figura 72: Distribución de pacientes según sean positivos o negativos a los receptores de estrógenos.

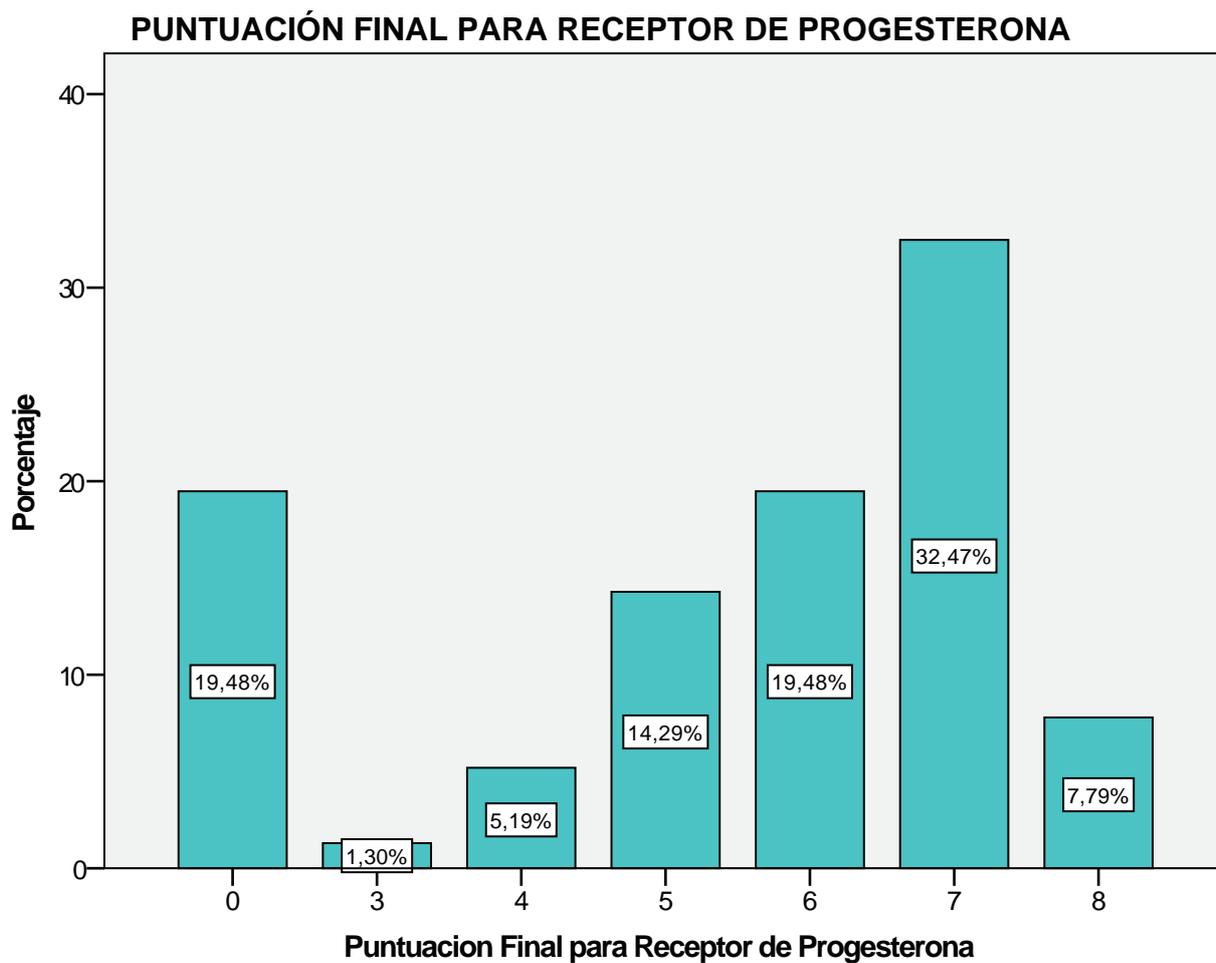


Figura 73: Distribución de los tumores en función de la puntuación obtenida al sumar la presentación a la intensidad de la tinción.

POSITIVIDAD PARA RECEPTOR DE PROGESTERONA

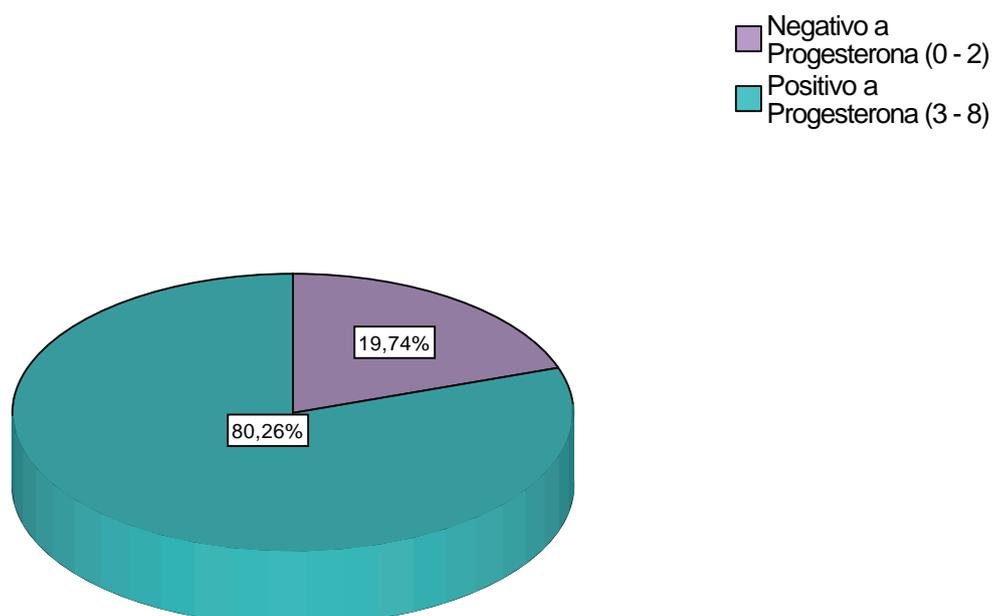


Figura 74: Distribución de los tumores en función de si resultan positivos o no a los receptores de progesterona.

PUNTUACIÓN FINAL PARA LA ONCOPROTEÍNA c-erbB-2

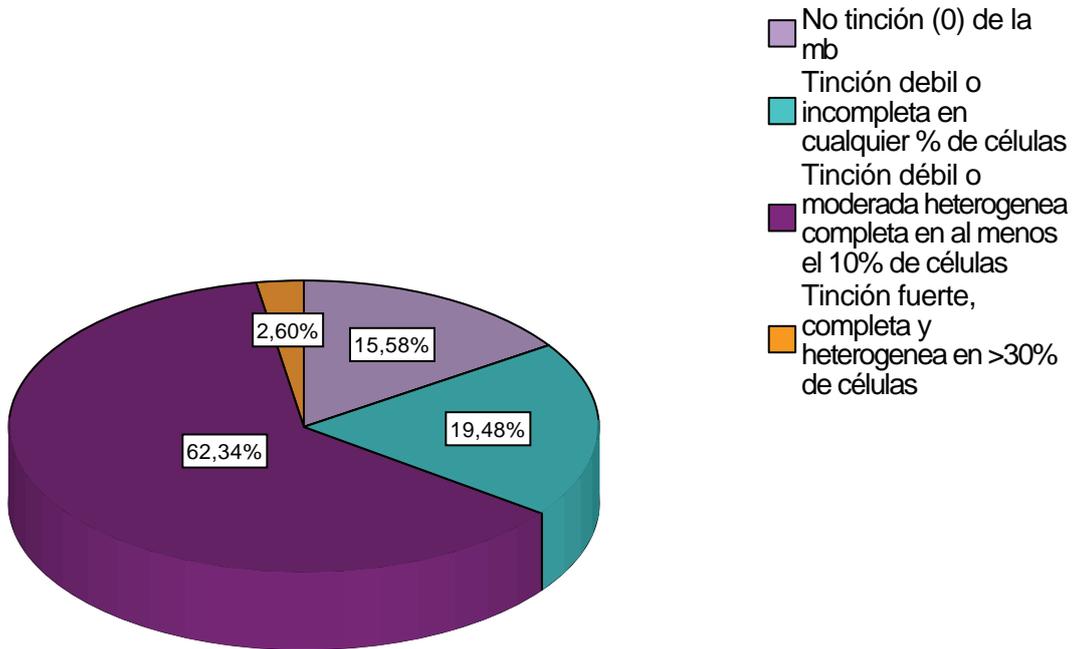


Figura 75: Distribución de los tumores según se positividad a los receptores hormonales.

POSITIVIDAD PARA LA ONCOPROTEÍNA c-erbB-2

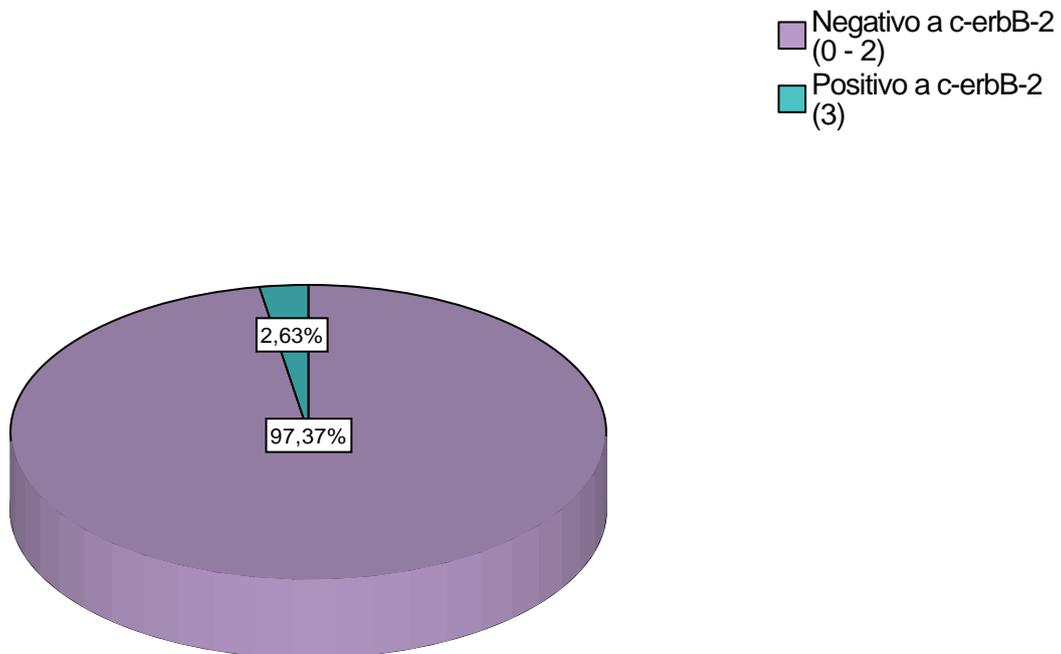


Figura 76: Distribución de los tumores según la expresión de la oncoproteína c-erbB-2.

19,48% de los procesos se presenta una tinción débil o incompleta en cualquier porcentaje de células (1+) y que la mayoría de las neoplasias valoradas, concretamente el 62,34% de tumores, evidencia una tinción débil o moderada completa en al menos el 10% de las células (2+). Destacar finalmente que solamente en el 2,60% de las lesiones se observa una tinción fuerte, completa y homogénea en más del 30% de las células (3+).

- Positividad para la oncoproteína c-erbB-2:

Tras la obtención de la puntuación final de la inmunotinción para la oncoproteína c-erbB-2 valoramos el porcentaje de tumores que resultan negativos (0+, 1+ y 2+) o positivos (3+) a la sobreexpresión de dicha proteína. Como se aprecia en la Figura 77, sólo el 2,63% de los tumores son positivos, mientras que 97,37% se valoran como negativos.

- Puntuación final para el anticuerpo COX-2:

La Figura 78 revela que el 48,05% de los tumores no muestra inmunorreacción (0 puntos), este porcentaje es seguido por aquellas neoplasias que alcanzan una valoración de 6 puntos (29,87%) y por aquellas que obtienen 3 puntos (15,58%).

- Inmunorreactividad para el anticuerpo anti-COX-2:

Al considerar esta variable (inmunotinción citoplasmática que suele evidenciar mayor intensidad a nivel perinuclear) apreciamos que casi todos las muestras analizadas (97,4%) presentan una baja inmunorreacción (0 – 6 puntos), mientras que solo el 2,60% de las neoplasias se cuantifican como de alta inmunorreacción (> 6 puntos) (Figura 79).

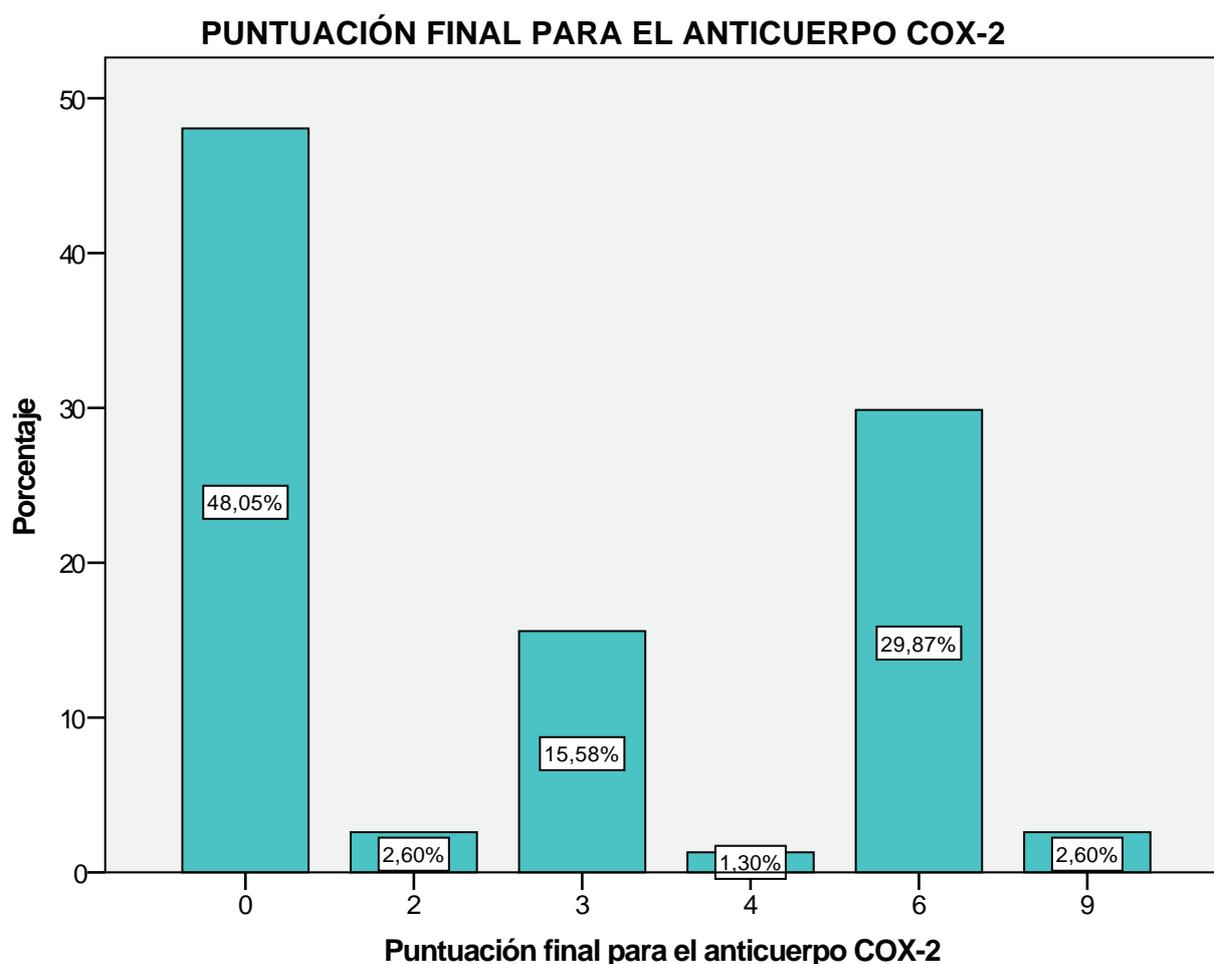


Figura 77: Distribución de los tumores en función de si resultan positivos o no a la sobreexpresión de la oncoproteína c-erbB-2.

En una gran parte de los procesos valorados, la inmunorreacción para el anticuerpo anti-COX-2 se ha asociado a células próximas a focos microscópicos de necrosis.

- Desarrollo de nuevos tumores mamarios:

La Figura 80 muestra que en el 81,82% de las pacientes del estudio no se diagnostican nuevos tumores mamarios, frente al 18,18% de los animales valorados en que sí aparecen nuevos procesos en otras mamas.

- Presencia o aparición de metástasis distantes:

Al valorar la presencia o aparición de metástasis distantes durante el período de

seguimiento, estos focos tumorales se detectan en el 40,26% de las pacientes, mientras que en el 59,74% de estas no se ha comprobado diseminación del proceso neoplásico (Figura 81).

- Tiempo de supervivencia libre de enfermedad (meses):

Tras valorar la Figura 82, verificamos que el mayor número de individuos (frecuencia absoluta) se concentra en el intervalo de tiempo de 0 a 15 meses (30 pacientes). El segundo bloque está compuesto por 27 pacientes que presentan un tiempo libre de enfermedad de entre 20 a 40 meses. La frecuencia absoluta decae drásticamente a partir de los 40 meses,

INMUNORREACTIVIDAD PARA EL ANTICUERPO COX-2

■ Baja (0-6)
■ Alta (7-12)

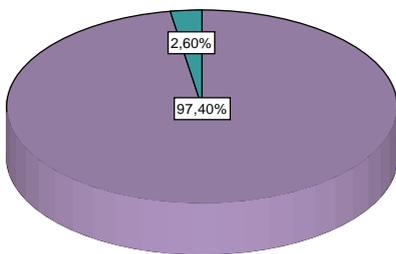


Figura 78: Distribución de las muestras tumorales según la suma de la presentación y la intensidad de la tinción.

DESARROLLO DE NUEVOS TUMORES MAMARIOS

■ No desarrollo de nuevos tumores
■ Aparición de nuevos tumores

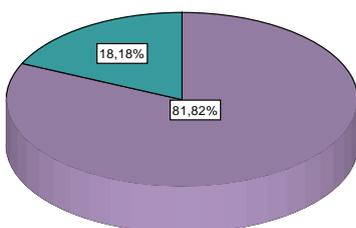


Figura 79: Distribución de los tumores en función de si muestran una baja o alta inmunoreactividad.

PRESENCIA O APARICIÓN DE METÁSTASIS DISTANTES

■ No aparición metástasis distantes
■ Aparición metástasis distantes

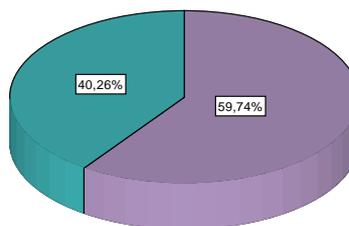


Figura 80: Distribución de las pacientes según hayan desarrollado nuevos tumores mamarios o no en el período de seguimiento.

TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD

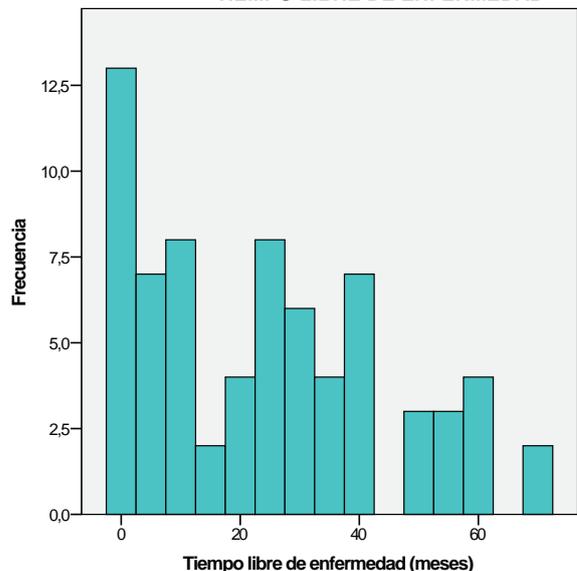


Figura 81: Distribución de pacientes en función de si presentaban o habían desarrollado metástasis distantes durante el seguimiento.

incluyéndose únicamente 10 pacientes en el intervalo de entre 40 a 60 meses. Finalmente, únicamente 2 pacientes presentan un tiempo libre de enfermedad superior a los 60 meses.

- Tiempo de supervivencia total (meses):

Para valorar el tiempo de supervivencia total de las pacientes del estudio se genera el siguiente gráfico (Figura 83), en el que se puede contemplar como las frecuencias más elevadas se sitúan en el intervalo de tiempo de 0 a 15 meses, con 30 pacientes incluidas en dicho intervalo. En el intervalo de 20 a 40 meses, con 28 pacientes, se sitúa un segundo pico de elevación de la frecuencia, concretamente entre los 25 a los 40 meses. A partir de ese momento decrece el tiempo de supervivencia (12 paciente en el intervalo de 40 a 60 meses), encontrando sólo 2 pacientes por encima de los 60 meses.

- Evolución final de las pacientes:

Cuando consideramos la evolución final de las pacientes, destaca que el 83,12% de ellas han fallecido a lo largo del periodo de seguimiento, frente al 16,88% que siguen vivas al finalizar nuestro estudio (Figura 84).

- Motivo del fallecimiento de las pacientes:

Dentro de esta variable se estiman las circunstancias que han conducido a la muerte

de aquellas pacientes fallecidas al final del estudio (Tabla 20). Se comprueba que el 32,8% de las pacientes han muerto a causa de la propia enfermedad, mientras que el 45,3% lo ha hecho por otras causas. El 15,6% de las pacientes son eutanasiadas por causas intrínsecas a la enfermedad y al 6,3% se les aplica la eutanasia por otras causas ajenas a la patología tumoral mamaria (Figura 85).

PERFIL GENERAL DE LA MUESTRA

Al analizar las diferentes variables de nuestro estudio se obtiene el perfil general de la muestra. La paciente promedio es una hembra de raza pura, perteneciente al Grupo 7 (Perros de Muestra), con una edad promedio de 10 años y de pequeño tamaño. Dicha paciente no está castrada, es nulípara, no ha padecido nunca pseudogestaciones, ni se le ha administrado tratamientos hormonales, además carece de antecedentes tumorales.

Esta paciente promedio presenta ambas cadenas mamarias afectadas, con un tipo de afectación simple y sin desarrollo de metástasis distantes según las pruebas de diagnóstico por imagen realizadas. El tratamiento de elección aplicado es una mastectomía radical.

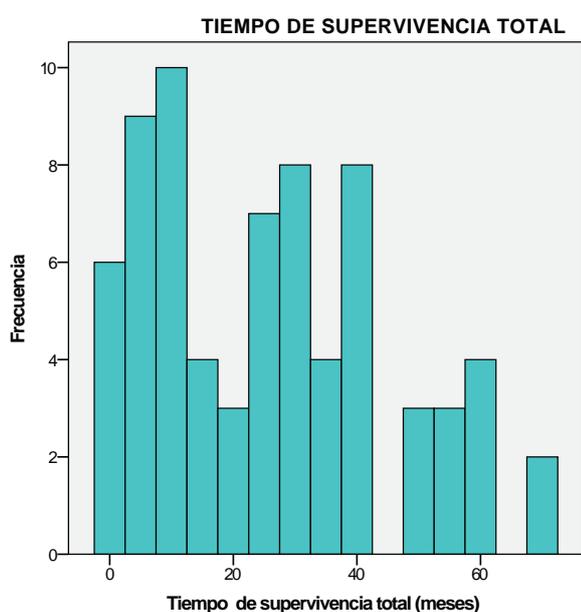


Figura 82: Frecuencia absoluta de pacientes en función del tiempo libre de enfermedad que han presentado.

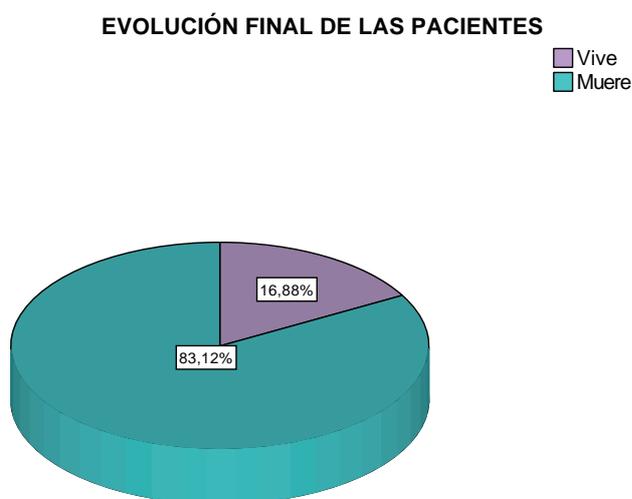


Figura 83: Frecuencia absoluta de pacientes en función del tiempo de supervivencia total para cada paciente.

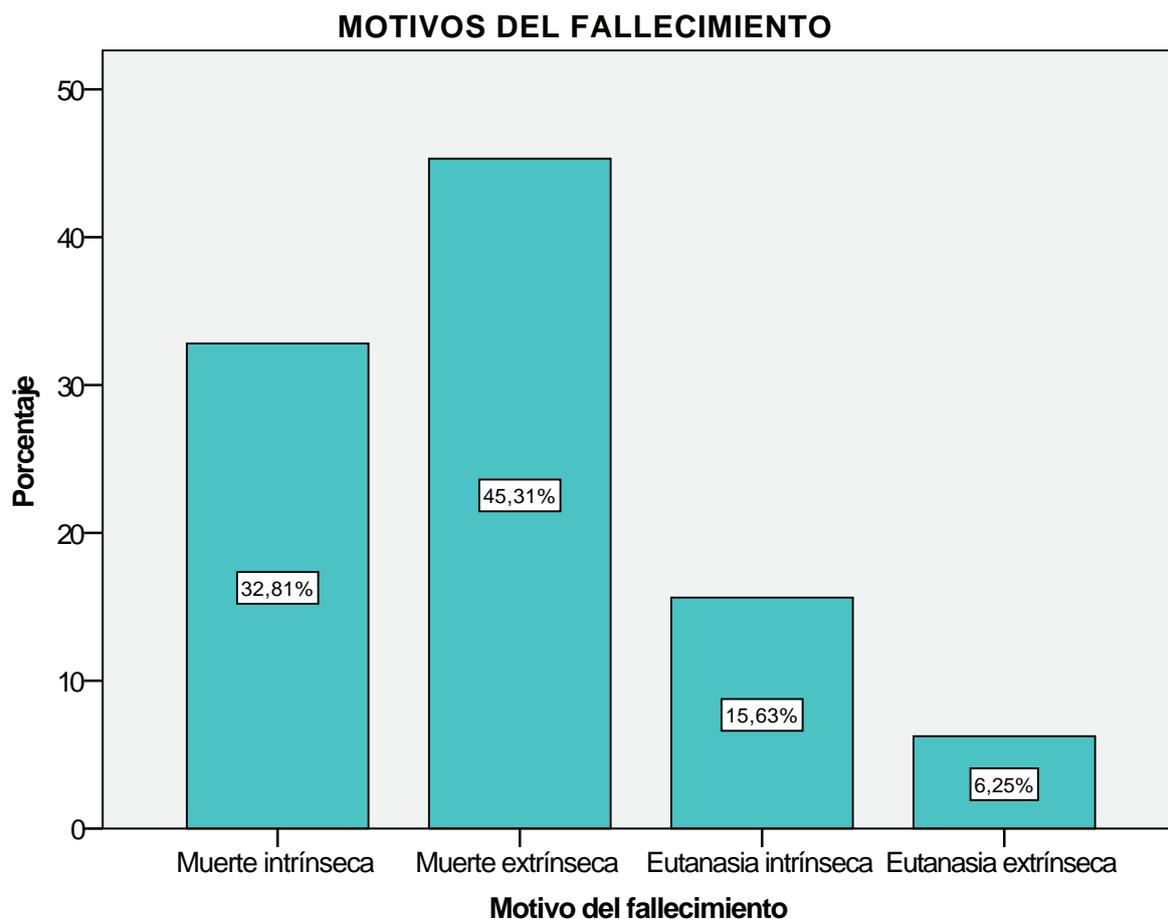


Figura 84: Distribución de pacientes en función de si han fallecido o no.

Tabla 20: Frecuencia y porcentajes de las pacientes que presentan el suceso (muerte) y aquellas que siguen vivas.

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	Muerte intrínseca	21	27,3	32,8	32,8
	Muerte extrínseca	29	37,7	45,3	78,1
	Eutanasia intrínseca	10	13,0	15,6	93,8
	Eutanasia extrínseca	4	5,2	6,3	100,0
	Total	64	83,1	100,0	
Perdidos	Pacientes vivas	13	16,9		
Total		77	100,0		

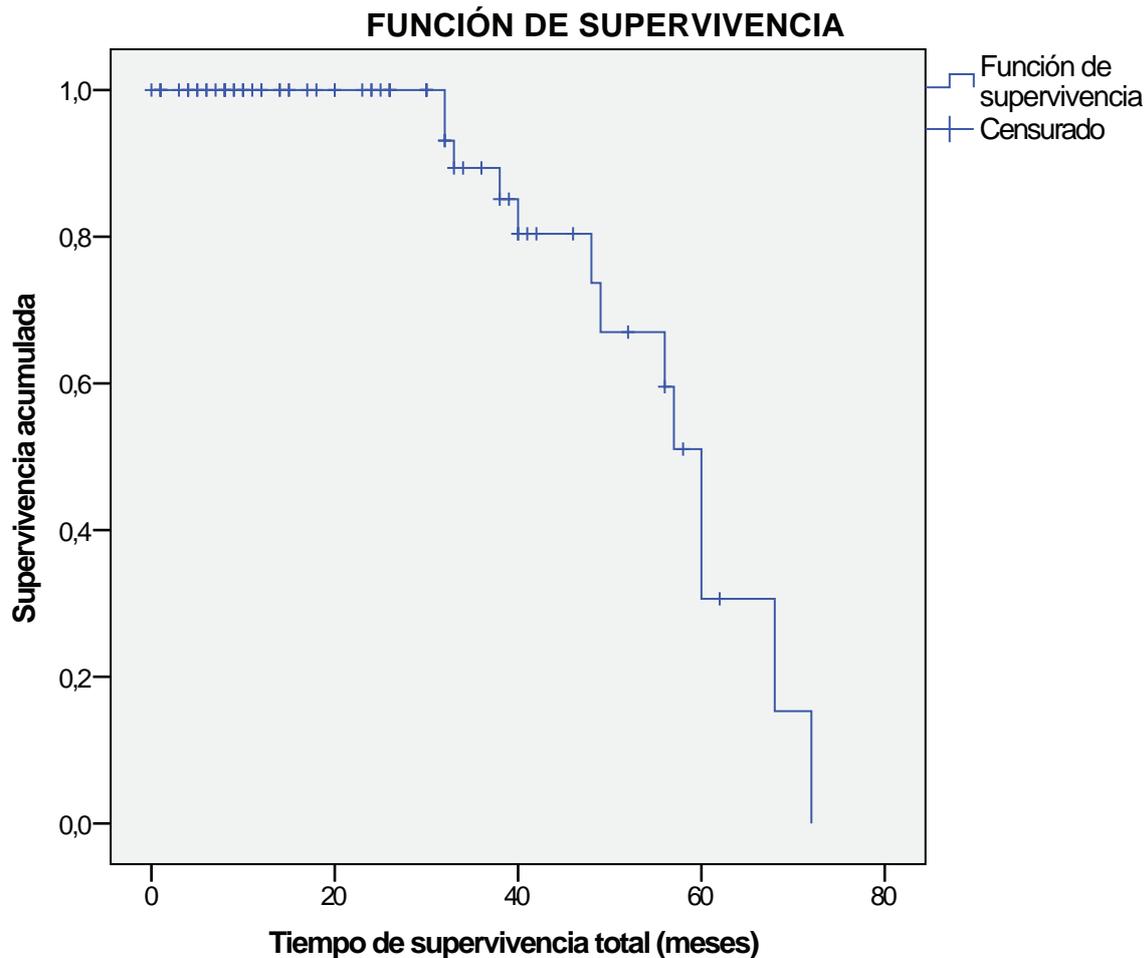


Figura 85: Tiempo de supervivencia (en meses) frente a la probabilidad de supervivencia acumulada.

En lo referente a las características morfológicas del tumor primario que presenta, la paciente se ve afectada por una masa móvil (sin implantación o fijación a los tejidos adyacentes), no ulcerada y sin necrosis, de crecimiento rápido, así como de contorno definido y consistente a la palpación.

La paciente muestra un carcinoma complejo, en un estadio I y con un grado histológico de malignidad II o intermedio, sin invasión peritumoral ni vascular y con una moderada reacción inflamatoria vinculada a zonas peritumorales.

En el análisis inmunohistoquímico la paciente evidencia un tumor primario negativo para el receptor de estrógeno α y positivo para el receptor de progesterona, con una puntuación para la inmunotinción de la oncoproteína c-erbB-2 de 2+ (negativo) y con 0 puntos para

la sobreexpresión de la enzima COX-2 (ausencia de inmunorreacción).

Al valorar la evolución de la paciente se comprueba que no ha desarrollado más tumores mamarios ni metástasis distantes y que, finalmente, fallece por otras causas ajenas al proceso oncológico mamario, tras un período de tiempo libre de enfermedad y de supervivencia total que oscila en un intervalo de 0 a 15 meses.

COMPARACIÓN ENTRE VARIABLES

Una vez llevado a cabo el análisis descriptivo de las variables y obtenido el perfil general de la muestra, estudiamos la relación entre todas las variables expuestas, con el fin de analizar la influencia de los distintos factores clínicos, histopatológicos e inmunohistoquímicos en la evolución y pronóstico de las pacientes.

En esta parte de nuestra investigación sólo se ha podido realizar las comparaciones entre algunas de las variables de interés en cada caso (principalmente, las variables que representan tanto los marcadores inmunohistoquímicos como las variables de evolución).

- Edad:

Al analizar la influencia de la variable “Edad” en los diferentes factores histopatológicos se aprecia que, en la variable “Diagnóstico histopatológico” podemos asumir, tras realizar el Test de Kruskal-Wallis (valor de $p = 0,121$), que la edad no afecta al tipo de tumor mamario diagnosticado.

En lo referente a la clasificación TNM, se obtiene un valor de $p = 0,553$ al realizar el Test de Kruskal-Wallis al valorar la influencia de la edad en el tamaño del tumor primario, por lo que podemos asumir que la edad no afecta al tamaño de la masa tumoral.

Sin embargo, cuando analizamos la influencia de esta variable (“Edad”) en el estado de los ganglios linfáticos regionales, hay evidencia en los datos en contra de la hipótesis nula, con un valor de $p = 0,011$ en el Test de Wilcoxon-Mann-Whitney. Con este valor se asume que la edad de la paciente sí influye en la aparición o no de metástasis en los ganglios linfáticos regionales, de manera que la edad mediana (promedio) en las pacientes con metástasis en ganglios linfáticos regionales es superior que en aquellas en las que no la presentan.

Después de obtener un p -valor = 0,547 en el Test de Wilcoxon-Mann-Whitney, se puede asumir que la “Edad” no afecta a la aparición de metástasis distantes; así mismo, tampoco tiene influencia sobre el estadio del tumor (p -valor = 0,096), ni sobre el grado histológico de malignidad (Test de Kruskal Wallis; valor de $p = 0,462$).

Al considerar las variables referentes al estudio inmunohistoquímico, se confirma realizando el Test de Wilcoxon-Mann-Whitney que la variable “Edad” no afecta a la positividad para el ER α (valor de $p = 0,515$), ni a la positividad para el PR (valor de $p = 0,932$), ni para la

oncoproteína c-erbB-2 (p -valor = 0,599). De igual modo y tras analizar esta influencia sobre la inmunorreactividad del anticuerpo anti-COX-2 podemos concluir que la “Edad” tampoco tiene influencia sobre ella (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney; valor de $p = 0,427$).

Para concluir la valoración de la influencia de la variable “Edad” sobre el resto de las variables consideradas, analizamos si esta afecta o no a las diferentes variables de evolución, comprobándose que la “Edad” no afecta al desarrollo de nuevos tumores mamarios (valor de $p = 0,388$) ni a la aparición de metástasis distantes (valor de $p = 0,275$), al llevar a cabo el Test de Wilcoxon-Mann-Whitney en ambos casos.

Aplicando el Coeficiente de correlación de Spearman se verifica que la “Edad” no afecta al “Tiempo libre de enfermedad” (valor de $p = 0,143$), pero sí influye sobre el “Tiempo de supervivencia total” (p -valor = 0,032).

En cuanto a la “Evolución final” de cada paciente deducimos, tras realizar el Test de Wilcoxon-Mann-Whitney, que la edad sí afecta al hecho de que una paciente viva o muera (valor de $p = 0,000$), pudiendo asumir que la edad promedio de las pacientes que mueren es superior a la de los individuos que viven al final del estudio; mientras que esta variable no afectaría al tipo de muerte que los animales del estudio han tenido (Test de Kruskal-Wallis; valor de $p = 0,829$).

- Mestizaje:

En lo relativo a la influencia de la variable “Mestizaje” sobre las variables referentes al estudio inmunohistoquímico, podemos asumir que no afecta a la positividad para el ER α (valor de $p = 0,626$), ni para el PR (valor de $p = 0,668$), resultados obtenidos mediante el Test de la Chi-cuadrado de Pearson.

Para las variables de evolución se observa, después de realizar el Test de la Chi-cuadrado de Pearson, que el mestizaje no afecta ni al desarrollo de nuevos tumores mamarios (valor de $p = 0,438$) ni a la aparición de metástasis (valor de $p = 0,172$). Del mismo modo, tampoco

afecta al “Tiempo libre de enfermedad” ni al “Tiempo de supervivencia total”, según el Test de Wilcoxon-Mann-Whitney, con unos valores de p de 0,492 y 0,458, respectivamente.

- Tamaño:

Tras llevar a cabo el Test de la Chi-cuadrado, se concluye que la variable “Tamaño” no afecta a la positividad para el ER α (valor de p = 0,763) ni para el PR (valor de p = 0,314).

Se comprueba también, gracias al Test de Chi-cuadrado, que el hecho de que una paciente sea de tamaño pequeño o grande no afecta a la aparición de metástasis distantes (valor de p = 0,488). Así mismo, tampoco afecta al “Tiempo libre de enfermedad” ni al “Tiempo de supervivencia total” (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney; valores de p = 0,546 y 0,411, respectivamente).

- Número de gestaciones:

Al llevar a cabo el Test de Kruskal-Wallis, comprobamos que esta variable no influye sobre el “Tiempo libre de enfermedad” (p -valor = 0,644) ni sobre el “Tiempo de supervivencia total” (valor de p = 0,973).

- Número de pseudogestaciones:

Esta variable tampoco influye sobre la positividad para receptor de estrógeno α (Test de Chi-cuadrado de Pearson; valor de p = 0,171).

En cuanto a su influencia en las variables de evolución de igual manera no afecta a la presencia de metástasis (Test de Chi-cuadrado de Pearson; valor de p = 0,830), ni al “Tiempo libre de enfermedad” (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney; valor de p = 0,075), ni al “Tiempo de supervivencia total” (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney; valor de p = 0,140).

- Tratamientos hormonales:

Para esta variable se asume, al realizar el Test de Kruskal-Wallis, que no afecta al “Tiempo libre de enfermedad” (valor de p = 0,397) ni al “Tiempo de supervivencia total” (valor de p = 0,344).

- Antecedentes tumorales:

Al considerar esta variable, se considera que el hecho de que una paciente tenga o no

antecedentes tumorales previos al diagnóstico de la enfermedad no afecta a la positividad para el ER α (Test de Chi-cuadrado de Pearson; valor de p = 0,499).

Si pasamos a analizar la influencia de esta variable sobre las variables evolutivas tenemos que la circunstancia de haber padecido tumores previamente no afecta al hecho de la presencia de metástasis distantes (Test de Chi-cuadrado de Pearson; valor de p = 0,533), ni al “Tiempo libre de enfermedad” (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney; valor de p = 0,742) ni al “Tiempo de supervivencia total” (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney; valor de p = 0,887).

- Presentación de tumor en la glándula afectada:

Respecto a la influencia del tipo de afectación sobre los factores inmunohistoquímicos se evidencia que esta variable no influye en la positividad para el ER α (Test de Chi-cuadrado de Pearson; valor de p = 0,723), no pudiéndose estudiar dicha influencia para los otros marcadores.

Si examinamos ahora la relación con las variables de evolución de las pacientes se comprueba que el hecho de que en una misma glándula mamaria haya uno o más nódulos tumorales no afecta a las variables “Presencia de metástasis” (Test de Chi-cuadrado de Pearson; valor de p = 0,910), “Tiempo libre de enfermedad” (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney; valor de p = 0,355) y “Tiempo de supervivencia total” (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney; valor de p = 0,852).

- Tratamiento quirúrgico aplicado:

Al llevar a cabo el Test de Kruskal-Wallis percibimos que la técnica quirúrgica empleada no influye en el “Tiempo libre de enfermedad” (valor de p = 0,313) ni tampoco afecta al “Tiempo de supervivencia total” (valor de p = 0,311).

- Ovariohisterectomía simultánea al tratamiento oncológico:

Examinando la influencia de la variable “Ovariohisterectomía simultánea al tratamiento quirúrgico” sobre la evolución de las pacientes se

concluye que ésta no afecta ni al “Tiempo libre de enfermedad” (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney; valor de $p = 0,511$) y ni tampoco al “Tiempo de supervivencia total” (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney; valor de $p = 0,862$).

- Implantación o fijación de la neoplasia:

Para estudiar de qué manera influyen las variables morfológicas en la evolución de las pacientes, empezamos con el análisis de la variable “Implantación o Fijación” del tumor a los tejidos adyacentes, apreciándose que el hecho de que la masa tumoral se encuentre o no adherida a los tejidos circundantes sí influye sobre el “Tiempo libre de enfermedad” (Test de Kruskal-Wallis; valor de $p = 0,005$) y sobre el “Tiempo de supervivencia total” (Test de Kruskal-Wallis; valor de $p = 0,003$). A pesar de asumir dicha influencia, no podemos conocer de qué manera influye esta variable sobre dichos tiempos de evolución por la baja frecuencia en algunas categorías de la variable.

- Ulceración:

Al analizar la influencia de la variable “Ulceración” se concluye que esta no afecta sobre el “Tiempo libre de enfermedad” (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney; valor de $p = 0,851$) ni sobre el “Tiempo de supervivencia total” (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney; valor de $p = 0,796$).

- Necrosis:

En este caso se aprecia que el hecho de que aparezca o no necrosis macroscópica afecta al “Tiempo libre de enfermedad” (Test de Kruskal-Wallis; valor de $p = 0,000$) y al “Tiempo de supervivencia total” (Test de Kruskal-Wallis; valor de $p = 0,000$); aunque, al haber mucha diferencia en las frecuencias entre las categorías, no se puede realizar ningún test que nos permita conocer de qué forma influye esta variable sobre las otras.

- Velocidad de crecimiento:

Al realizar el Test de Kruskal-Wallis, se comprueba que la variable “Velocidad de crecimiento” sí influye en el “Tiempo libre de enfermedad” (valor de $p = 0,007$) y en el “Tiempo de supervivencia total” (valor de p

$= 0,002$). Se constata que ambos tiempos de evolución son mayores o iguales en los tumores con un crecimiento lento y medio, sin embargo, dichos tiempos son menores cuando la velocidad de crecimiento del tumor es rápida o muy rápida.

- Características macroscópicas:

La variable “Características macroscópicas” de la masa tumoral tiene influencia sobre el “Tiempo libre de enfermedad” (Test de Kruskal-Wallis; valor de $p = 0,001$) y sobre el “Tiempo de supervivencia total” (Test de Kruskal-Wallis; valor de $p = 0,000$), aunque no se ha podido establecer estadísticamente de qué forma influyen las características macroscópicas sobre dichos tiempos de evolución.

- Diagnóstico histopatológico:

Se comprueba al llevar a cabo el Test de Kruskal-Wallis, que el diagnóstico del proceso tumoral mamario no afecta al “Tiempo libre de enfermedad” (valor de $p = 0,063$), pero sí al “Tiempo de supervivencia total” (valor de $p = 0,022$), no pudiéndose determinar cuál es la asociación.

- Tamaño del tumor primario:

En esta variable no ha sido posible establecer una relación estadísticamente significativa con ninguna otra variable de interés, como son la positividad a los receptores hormonales, a la oncoproteína c-erbB-2 o a COX-2, así como tampoco con ninguna variable que describa la evolución de las pacientes.

- Estado del ganglio linfático regional:

En la Figura 86, observamos que aparece un dato atípico, que corresponde a la paciente 58, aunque al no ser influyente, no se desestima la información aportada por esta paciente.

Sólo se ha podido realizar el análisis de la inferencia del estado del ganglio linfático regional respecto al “Tiempo de supervivencia total”, rechazando la hipótesis nula, con un valor de $p = 0,000$; Por lo tanto, podemos asumir que el tiempo de supervivencia en pacientes sin metástasis es mayor que el de aquellas que sí padecían metástasis.

- Estadiaje:

Comprobamos al analizar esta variable, que el estadio en el que se encuentra la paciente sí que afecta a su evolución, de forma que influye sobre el “Tiempo libre de enfermedad” (Test de Kruskal-Wallis; valor de $p = 0,002$) y el “Tiempo de supervivencia total” (Test de Kruskal-Wallis; valor de $p = 0,008$). Sin embargo, no se pudo establecer estadísticamente el carácter de dicha influencia.

- Grado histológico de malignidad:

Al estudiar esta variable se observa que esta tiene influencia sobre la “Invasión peritumoral” (Test de Chi-cuadrado de Pearson; valor de $p = 0,000$) y sobre la “Invasión linfática” (Test de Chi-cuadrado de Pearson; valor de $p = 0,000$) del tumor. Se comprueba en este caso que tanto la invasión peritumoral como la linfática son mayores en pacientes con un grado de malignidad más alto. También se evidencia que dicha variable afecta a la positividad para el ER α (Test de Chi-cuadrado de Pearson; valor de $p = 0,009$).

En cuanto a su influencia sobre la evolución de las pacientes, podemos concluir que afecta tanto a la “Presencia de metástasis” (Test de Chi-cuadrado de Pearson; valor de $p = 0,003$), como al “Tiempo libre de enfermedad” (Test de Chi-cuadrado de Pearson; valor de $p = 0,000$) y al “Tiempo de supervivencia total” (Test de Chi-cuadrado de Pearson; valor de $p = 0,000$).

- Invasión peritumoral:

Para esta variable se constata, tras realizar el Test de Chi-cuadrado de Pearson, que esta tiene influencia sobre la positividad para el ER α (valor de $p = 0,033$) y no para el PR (valor de $p = 0,081$).

Por otra parte, la variable también afecta a la “Presencia de metástasis” (Test de Chi-cuadrado de Pearson; valor de $p = 0,000$), al “Tiempo libre de enfermedad” (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney; valor de $p = 0,000$) y al “Tiempo de supervivencia total” (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney; valor de $p = 0,000$), pudiendo asumir que tanto un tiempo como otro es mayor en pacientes que no presentan invasión peritumoral.

- Invasión linfática:

Como para la variable anterior se comprueba, después de llevar a cabo el Test de Chi-cuadrado de Pearson y obtener un valor de $p = 0,036$, que ésta afecta a la positividad para el ER α .

Se corrobora que también influye sobre la “Presencia de metástasis” (Test de Chi-cuadrado de Pearson; valor de $p = 0,007$), el “Tiempo libre de enfermedad” (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney; valor de $p = 0,000$) y el “Tiempo de supervivencia total” (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney; valor de $p = 0,000$). Para esta variable únicamente se puede analizar de que forma influye la invasión linfática sobre los tiempos de evolución, así se asume que ambos tiempos son mayores en las pacientes que no la presentan.

- Reacción inflamatoria:

Para esta variable solo se ha podido realizar el estudio respecto al “Tiempo libre de enfermedad” y al “Tiempo de supervivencia total”, comprobándose que la presencia de reacción inflamatoria afecta a ambas variables (Test de Kruskal-Wallis; valor de $p = 0,030$ y valor de $p = 0,050$, respectivamente), de manera que cuanto más amplia es la presencia de reacción inflamatoria menor son los tiempos libre de enfermedad y de supervivencia total.

- Vinculación de la reacción inflamatoria:

Al igual que en la variable anterior sólo se puede comparar esta con el “Tiempo libre de enfermedad” y el “Tiempo de supervivencia total”, no afectando a ninguna de las dos variables (Test de Kruskal-Wallis; valor de $p = 0,526$ y valor de $p = 0,292$, respectivamente).

- Positividad para el receptor de estrógeno α

Si analizamos la influencia de esta variable sobre la evolución de las pacientes del estudio, vemos que esta variable no afecta a la “Presencia de metástasis” (Test de Chi-cuadrado de Pearson; valor de $p = 0,102$), pero sí influye sobre el “Tiempo libre de enfermedad” (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney; valor de $p = 0,005$) y el “Tiempo de supervivencia total” (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney; valor de $p = 0,012$).

- Positividad para el receptor de progesterona:

Esta variable no influye sobre la “Presencia de metástasis” (Test de Chi-cuadrado de Pearson; valor de $p = 0,962$), ni sobre el “Tiempo libre de enfermedad” (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney; valor de $p = 0,060$), ni sobre el “Tiempo de supervivencia total” (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney; valor de $p = 0,222$).

- Positividad para la oncoproteína c-erbB-2:

Para esta variable solo se ha podido analizar su influencia sobre el “Tiempo libre de enfermedad” y el “Tiempo de supervivencia total”, concluyendo que la sobreexpresión (3+) para esta oncoproteína no afecta a ninguna de las dos variables (Test de Kruskal-Wallis; valor de $p = 0,085$ y valor de $p = 0,235$, respectivamente).

Al analizar los datos considerando la expresión 2+ como positiva, apreciamos igualmente que las variables evolutivas (“Aparición de metástasis distantes”, “Tiempo libre de enfermedad” y “Tiempo de supervivencia total”) no se ven afectadas (Chi-cuadrado de Pearson; valor de $p = 0,766$, valor de $p = 0,372$ y valor de $p = 0,329$, respectivamente), ni se evidencia ninguna relación significativa con el resto de las variables inmunohistoquímicas.

- Inmunorreactividad para COX-2:

Como en la variable anterior, sólo se ha podido realizar su análisis respecto al “Tiempo libre de enfermedad” y al “Tiempo de supervivencia total”, concluyendo que esta variable no influye sobre las dos variables mencionadas (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney; p -valor = $0,158$ y p -valor = $0,075$, respectivamente).

Si realizamos el análisis partiendo de 6 puntos como “Inmunorreactividad alta” se comprueba que influye sobre la positividad para el ER α (Test de Chi-cuadrado de Pearson; valor de $p = 0,046$), siendo 0,3048 (OR) veces más probable obtener una inmunorreacción elevada si el tumor es positivo al ER α . Sin embargo, no afecta a la expresión de la oncoproteína c-erbB-2 (Test de Chi-cuadrado de Pearson; valor de $p = 0,108$). Así mismo, no se relaciona con la aparición de metástasis distantes (Test de Chi-cuadrado de Pearson; valor de $p = 0,134$), pero sí influye

negativamente sobre los tiempos libre de enfermedad y de supervivencia total (Test de Chi-cuadrado de Pearson; valor de $p = 0,022$ y valor de $p = 0,042$, respectivamente).

ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA

Si se asume que el evento terminal es independiente para cada paciente, las probabilidades de sobrevivir de un tiempo “ t ” determinado, se calculan gracias a una ley multiplicativa de probabilidades. En este caso, disponemos de datos censurados, pertenecientes a pacientes que siguen sin presentar el suceso (muerte) al final del período de seguimiento.

La tendencia observada en la Figura 87 es que a mayor número de meses transcurridos, menor probabilidad de supervivencia a la enfermedad. Analizando con detalle la gráfica podemos concluir que hasta los 32 meses la probabilidad de sobrevivir es 1. Entre los 32 y los 40 meses la probabilidad de supervivencia va descendiendo, de tal manera que la probabilidad alcanzada a los 40 meses es del 0,804, disminución que no es demasiado acusada. Entre los 40 y los 60 meses se produce la mayor disminución en la función de supervivencia acumulada, descendiendo esta a un 0,306 a los 60 meses de evolución. Finalmente, se puede apreciar que este valor sigue decreciendo hasta los 72 meses, donde la probabilidad de supervivencia es nula.

V. Discusión

1. ANÁLISIS DE LA PATOLOGÍA ONCOLÓGICA DE LA GLÁNDULA MAMARIA EN HEMBRAS DE LA ESPECIE CANINA EN EL PERIODO COMPRENDIDO ENTRE 2008-2012.

En esta parte de nuestro estudio se ha desarrollado el análisis de ocho variables (raza, mestizaje, edad, peso, tamaño, tipo de patología, tipo de tumor y malignidad tumoral), con el fin de evaluar la relevancia de los tumores mamarios en la clínica veterinaria actual así como determinar la influencia de diferentes parámetros (edad, mestizaje y tamaño del animal) sobre el tipo de tumor que desarrollan las pacientes y sobre el comportamiento benigno o maligno de éste.

No existen muchos registros sobre el cáncer en la especie canina, y aún menos, centrados únicamente en hembras adultas [7], pero nuestros resultados avalan la importancia de la patología oncológica en la clínica actual con una prevalencia del 43,8% de las pacientes que acuden a nuestra consulta, de las cuales el 60,4% presentan tumores mamarios. Estos resultados son coincidentes con los hallados en otros estudios [9, 35], en los que el tipo tumoral más común en la hembra de esta especie corresponde a las neoplasias de la glándula mamaria. Como destacan diversos autores [33, 36, 404], el hecho de que los tumores mamarios junto con los tumores de piel sean los más frecuentes en las consultas veterinarias, puede estar influenciado en gran manera porque ambas localizaciones son de fácil acceso y observación tanto por parte del propietario y como del veterinario clínico.

En cuanto a los factores de riesgo que favorecen la aparición de los diferentes tipos de tumores que se diagnostican en las perras, observamos que la edad de aparición de la

enfermedad no afecta al tipo de tumor que padecen estas pacientes, siendo la edad promedio de 10 años. En el caso concreto de los tumores de mama, esta afirmación es coincidente con las aportadas por diversos autores los cuales señalan un notable incremento de procesos neoplásicos entre los 6 y los 10 años, edad en la cual se alcanza un pico de presentación seguido de un marcado descenso [7, 9, 20]. Por otra parte, en el grupo de pacientes que presentan procesos oncológicos (Grupo III) se confirma que la edad de diagnóstico no afecta al tipo de tumor que desarrollan éstas, pero sí se comprueba que se vincula con la malignidad de dicho proceso. Por el contrario, para el grupo de pacientes con tumores mamarios (Grupo IV) la edad no afecta a esta última variable (“Malignidad”). Estos datos no concuerdan con los descritos por Sorenmo K.U. y col. (2009), que señalan que las pacientes con tumores benignos tienen una edad media de 8,5 años, mientras que aquellas cuyos tumores son malignos presentan mayor edad (9,5 años de edad media) apreciándose diferencias estadísticamente significativas [38]. Estas discrepancias pueden ser debidas al menor tamaño de nuestra muestra y al bajo porcentaje de tumores mamarios benignos diagnosticados.

Se ha analizado la relación entre la edad de aparición de los tumores mamarios y el tamaño de los individuos afectados. Algunos autores observan que las pacientes de razas de gran tamaño son significativamente más jóvenes cuando desarrollan estos procesos en la glándula mamaria que las de pequeño tamaño [39]. Sin embargo, en nuestro trabajo no hemos hallado esta vinculación ni para las neoplasias mamarias, ni para cualquier otro tipo de proceso oncológico diagnosticado. Aunque lo esperable hubiera sido confirmar las observaciones realizadas por

los autores arriba citados, ya que los animales de razas de mayor tamaño tienen, por su propia naturaleza, una vida más corta, con un envejecimiento más rápido que los animales de razas de tamaño inferior y, por lo tanto, es habitual que presenten neoplasias a una edad más temprana; en nuestro estudio, como ya hemos mencionado, esta evidencia no se ha confirmado.

En cuanto a la predisposición de las diferentes razas a padecer procesos oncológicos observamos como las razas puras se hallan más predisuestas, con un 66,8% de los casos analizados, siendo el grupo racial más representativo el de Perros Cobradores de Caza y Perros de Agua (Grupo 8). Se da la misma situación al analizar en particular al grupo de pacientes con tumores mamarios, siendo el 64,3% de los individuos afectados de raza pura y, de los cuales, el grupo racial número 8 representa el 14,29% del total de razas puras. Estudios previos describen la mayor predisposición de diferentes grupos raciales a padecer neoplasias mamarias, así tenemos que Perez Alenza M.D. y col. (2000) observan resultados similares a los nuestros [8], mientras que otros investigadores describen un mayor riesgo en grupos como Teckels y Molosoides [6], de Pastoreo [40, 41] y en perros de compañía [9]. Esta predisposición detectada en nuestro estudio puede ser debida a la importante presencia de este grupo racial en nuestra región, en la que la caza tiene un relevante papel en la economía de la zona. El hecho de que el 14,6% del total de los pacientes atendidos en la consulta de cirugía del Hospital Clínico Veterinario de la UEx pertenezcan a este grupo, permite ratificar nuestra deducción. La evidencia de la mayor susceptibilidad de las razas puras frente a los animales mestizos a padecer tumores de mama se halla en concordancia con los resultados aportados en otros estudios [8, 40, 43], aunque Karayannopoulou, M. y col. (1989) observaron con anterioridad el hecho contrario [44]. Perez Alenza, M.D. y col. (2000), atribuyen la falta de unanimidad entre los diversos autores a las distintas poblaciones utilizadas en cada estudio [8].

Al analizar la influencia que tiene la raza sobre la variable “Malignidad” apreciamos que

la malignidad de los tumores mamarios sí se ve afectada por pertenecer a grupos de raza pura o ser individuos mestizos, siendo más probable que el tumor sea maligno en el último caso. Nosotros relacionamos estos hallazgos con el hecho de que los propietarios de animales de razas puras, por lo general, y debido en muchas ocasiones al valor económico de éstos, se muestran más receptivos a aceptar el coste que supone el tratamiento de los procesos tumorales que los propietarios de los perros mestizos y acudiendo con mayor celeridad a las consultas veterinarias cuando detectan pequeñas lesiones neoplásicas.

Al igual que describen Itoh T. y col. (2005), comprobamos que las razas de pequeño tamaño presentan una incidencia de malignidad más baja que aquellas con un tamaño grande [10], tanto en tumores de la glándula mamaria como en neoplasias en cualquier otra localización.

En cuanto a la incidencia de malignidad dentro del grupo de pacientes que presentan tumores de mama (Grupo IV), se detecta una gran proporción de neoplasias histológicamente malignas (88,1%) frente a los procesos considerados como benignos (11,9%). Sin embargo, en la literatura consultada encontramos porcentajes muy inferiores de malignidad histológica, habiendo autores que señalan una incidencia entre el 41% y el 53% [78, 79, 400] e incluso de un 30% según Misdorp y col. [20]. Consideramos que esta desproporción en el porcentaje de presentación de las neoplasias malignas que hemos apreciado respecto a lo señalado en la bibliografía puede relacionarse con el interés de los propietarios. De manera que en muchos procesos mamarios, donde éstos presentan una lenta evolución, pudiendo relacionarse con un comportamiento benigno, pueden los dueños decidir no acudir al Hospital para su valoración y tratamiento, sobre todo considerando la situación económica en nuestra región; propietarios con más recursos e interés o con animales afectados por un proceso con una rápida evolución, que pueda vincularse con un comportamiento más agresivo, pueden acudir al centro hospitalario más frecuentemente, para que sus mascotas reciban asistencia sanitaria [20].

2. ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS PRONÓSTICO: CLÍNICOS, MORFOLÓGICOS E INMUNOHISTOQUÍMICOS EN CARCINOMAS MAMARIOS CANINOS DURANTE EL PERIODO COMPRENDIDO ENTRE 2008 Y 2012.

En este trabajo se han analizado factores clínicos, morfológicos e inmunohistoquímicos de los carcinomas mamarios en hembras de la especie canina. El estudio incluye un total de 59 variables que contemplan los factores ya señalados para cada paciente del estudio (77 pacientes), con el propósito de evaluar el pronóstico y la evolución final de las mismas. De esta manera, pretendemos determinar el valor predictivo de dichas variables para aportar información sobre el desarrollo de la enfermedad y de los posibles tratamientos.

En la literatura científica existen numerosos estudios en los que se valora la predisposición de las diferentes razas a padecer esta patología [6, 8, 9, 40, 41]. En nuestro estudio se ha realizado un análisis por grupos de razas, observándose que el grupo más afectado es el Grupo 7 (Perros de Muestra). Aunque el Grupo 8 (Perros Cobradores de Caza – Perros Levantadores de Caza – Perros de Agua) es el que presenta una mayor tasa de pacientes afectadas por tumores mamarios (benignos y malignos); tras el estudio histopatológico es el Grupo 7, como ya hemos señalado, el más sensible a padecer neoplasias mamarias malignas. A este grupo le sigue el Grupo 8. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Pérez Alenza M.D. y col. (2000) [8], que señalan que son las razas de caza (Grupos 7 y 8) las que presentan mayor incidencia de padecer esta patología. Sin embargo, nuestras observaciones difieren de los resultados expuestos por Moe L. (2001) [6], que encuentra un mayor riesgo de padecer este tipo de tumores en razas como el Teckel y el Bóxer. En nuestro estudio, el Teckel (Grupo 4) destaca por mostrar una baja incidencia de esta patología tumoral. También discrepamos de los estudios de otros autores, que evidencian la mayor incidencia en el Pastor Alemán (Grupo 1) [40, 41], o en

razas como el Chihuahua [8] y el Caniche [9], ambos pertenecientes al Grupo 9 de la FCI.

En lo referente al mestizaje de las pacientes, evidenciamos mayor incidencia en individuos de razas puras que en individuos mestizos, al igual que lo señalado por diversos autores [8, 40, 43]. Por el contrario, Karayannopoulou, M. y col. (1989) [44] obtienen resultados diferentes, ya que en el estudio realizado por estos autores son los mestizos los más predispuestos, diagnosticándose en ellos un mayor número de carcinomas. En nuestro estudio, si se analiza la relación de esta variable con las variables de evolución de las pacientes, se comprueba que ésta no tiene influencia sobre ninguna de ellas (“Desarrollo de nuevos tumores”, “Aparición de metástasis”, “Tiempo libre de enfermedad” y “Tiempo de supervivencia total”).

La edad mediana de aparición de los tumores de mama detectada en nuestro estudio está en consonancia con la señalada en diferentes publicaciones [7, 9, 20], siendo la edad promedio de 10 años.

A pesar de que existe controversia entre los distintos autores acerca de si la edad se debe considerar un factor pronóstico, cuando analizamos la influencia de la edad sobre las diferentes variables analizadas, tanto morfológicas como histopatológicas, observamos que la variable “Edad” no afecta al diagnóstico histopatológico, así como tampoco al estadiaje tumoral ni al grado histológico de malignidad. Sin embargo, existe una evidencia en los datos para asumir que sí influye en la aparición de metástasis en los ganglios linfáticos regionales, no así en las metástasis distantes, siendo la edad promedio de las pacientes que presentan metástasis en ganglios linfáticos regionales mayor que la edad de las pacientes que no la han desarrollado. Se podría pensar que la relación entre estas dos variables (“Edad” y la “Aparición de metástasis en ganglios linfáticos regionales”) se debe a que normalmente se asocia la edad avanzada a un peor pronóstico por la inmunosenescencia asociada a la edad que afecta a la inmunovigilancia del cáncer [405].

Varios investigadores describen la edad como un factor independiente y fuertemente relacionado con un mal pronóstico en las perras con cáncer de mama, asociándose una edad avanzada a un período libre de enfermedad y una supervivencia más corta tras la cirugía [11, 12, 15]. En nuestro trabajo sólo hemos hallado influencia sobre la evolución de la paciente en el hecho de que viva o muera, siendo estadísticamente superior la edad promedio de las pacientes que fallecen. Sin embargo, no hemos detectado su influencia sobre los tiempos libres de enfermedad y de supervivencia total, ni al tipo de muerte, en el caso de que esta se produzca, coincidiendo estos datos con los expuestos por Philibert J.C. y col. (2003), los cuales no hallan influencia de la edad en la supervivencia [106]. Como es obvio, los animales de edad más avanzada se encuentran próximos a la finalización de su vida, sea exclusivamente por causas naturales (el propio envejecimiento) o por estar la edad asociada al desarrollo de diferentes patologías como las oncológicas; en nuestro estudio las mamas.

Como ya hemos comentado anteriormente, al considerar el tamaño de las pacientes, se comprueba que el 64,9% de estas corresponden a animales de pequeño tamaño, contrariamente a lo descrito por Itoh T. y col. (2005), que señalan que son las razas de pequeño tamaño las que presentan un índice de malignidad más bajo en comparación con las razas de gran tamaño [10]. Posiblemente, nuestros resultados están condicionados a las preferencias de los propietarios por ciertas razas caninas, destacando en nuestra zona las razas para la actividad cinegética, como las incluidas en el Grupo 8 (Perros Cobradores de Caza – Perros Levantadores de Caza – Perros de Agua) de la FCI, en donde se incluyen muchas razas de pequeño tamaño. Por otra parte, al considerar la variable “Tamaño” del animal no hemos observado ninguna influencia estadísticamente significativa sobre la aparición de metástasis distantes en el período de seguimiento del estudio, ni en los tiempos libre de enfermedad y de supervivencia total. Diferentes estudios como el de Itoh T. y col. (2005) muestran que las razas de pequeño tamaño con tumores mamaros

malignos evidencian una supervivencia más larga que las de gran tamaño [10].

El 74,2% de las pacientes de este estudio no han estado nunca gestantes, porcentaje similar al evidenciado en otros trabajos consultados [37, 43]. En nuestro análisis hemos podido determinar que el hecho de que la paciente sea nulípara, que haya tenido pocas camadas o por el contrario muchas, no afecta a la evolución de estas, en lo referente al tiempo libre de enfermedad y al tiempo de supervivencia, pudiendo concluir que el desarrollo o no de gestaciones y el número de estas no ayuda a establecer un pronóstico.

Algunos autores han demostrado que factores reproductivos, entre los que destaca la pseudogestación, no incrementan el riesgo de desarrollo de neoplasias [37, 52]; en nuestro trabajo se evidencia que el 71,4% de las hembras no han presentado nunca pseudogestaciones, mientras que en aquellas pacientes que las han padecido, esta variable no afecta al tiempo libre de enfermedad ni al tiempo de supervivencia, por lo que nuestros resultados son coincidentes con los obtenidos en un trabajo anterior por Veronesi M.C. y col. (2003) [52]. Pese a que hay alguna referencia bibliográfica en la que se describe que el tratamiento con progestágenos induce una mayor secreción de hormona del crecimiento ejerciendo un efecto directo en la carcinogénesis mamaria [55], en nuestro estudio tampoco hemos encontrado influencia sobre las variables de evolución antes señaladas, en las pacientes en las que se les ha administrado tratamientos hormonales respecto a aquellas que no lo han recibido.

Al considerar los antecedentes de las pacientes, respecto al desarrollo de tumores mamaros previos al momento del diagnóstico de la enfermedad, comprobamos que el 72,7% de estas nunca habían desarrollado tumores en esta localización y, en aquellas que sí los habían presentado, esta variable no afecta a la evolución del animal en cuanto a la aparición de metástasis distantes, al tiempo libre de enfermedad y al tiempo de supervivencia total. Cabe destacar que todas las pacientes que tenían antecedentes de neoplasia mamaria habían sido sometidas a

diferentes técnicas quirúrgicas, y sólo en un caso se produjo la recidiva después de la mastectomía.

En nuestro estudio la mayoría de las hembras (54,5%) muestran neoplasias en ambas cadenas mamarias, aunque no se ha podido establecer una asociación entre la localización de las masas tumorales con la evolución de la paciente, como si se ha establecido en un trabajo anterior [64], en el que se describe un carácter predictivo para esta variable. Hemos evidenciado que las glándulas más afectadas en ambas cadenas mamarias han sido la cuarta y la quinta, por lo que coincide con los anteriores estudios, que describen una mayor afectación en esta ubicación por haber un mayor volumen de tejido mamario a este nivel, sin embargo, nosotros hemos obtenido unos porcentajes de afectación inferiores a los descritos previamente (65-70%) [9, 63].

En la bibliografía se reseña que los tumores mamarios se manifiestan en más de la mitad de los casos como múltiples nódulos dentro de una misma glándula mamaria [9]; en nuestro examen, por el contrario, encontramos que en el 76,6% de los procesos las mamas afectadas presentan una única masa; similares resultados han sido descritos por Philibert J.C. y col. (2003) [106]. Por otra parte, no se ha hallado ninguna asociación entre ésta variable y el resto de variables analizadas (“Presencia de metástasis”, “Tiempo libre de enfermedad” y “Tiempo de supervivencia total”).

La cirugía sigue siendo el tratamiento de elección para eliminar los tumores mamarios [9]. En nuestra investigación todas las pacientes han sido sometidas sólo a tratamiento quirúrgico utilizando diferentes técnicas según la extensión de la enfermedad y teniendo en cuenta la recuperación y calidad de vida de la paciente, como se indica en la bibliografía [9, 87]. Se ha practicado en mayor porcentaje (46,8%) la mastectomía radical, seguido de la mastectomía en bloque en un 16,9% de los animales afectados por este proceso mamario. A pesar de la gran controversia que existe acerca del empleo de cirugías más o menos radicales, hemos comprobado que el tipo de técnica empleada no afecta ni al tiempo libre de enfermedad ni al de

supervivencia total, constatando lo ya descrito por diferentes autores [84, 88], aunque no se ha podido relacionar estadísticamente esta variable con la tasa de recurrencia de la enfermedad.

No se ha demostrado que la realización de una ovariectomía simultánea al tratamiento quirúrgico de la neoplasia mamaria aporte grandes beneficios para la paciente, ya que la mayor parte de las metástasis no poseen receptores hormonales, ni tampoco parece tener un gran efecto sobre el pronóstico del individuo [9, 89]. En nuestro caso, solamente se llevó a cabo la ovariectomía simultánea a la mastectomía en el 16% de las pacientes, comprobándose que en ellas no se ha producido un efecto sobre el tiempo libre de enfermedad ni el de supervivencia, corroborando lo descrito en estas publicaciones.

Las características morfológicas: crecimiento infiltrativo del tumor hacia tejidos adyacentes [20, 37], velocidad de crecimiento rápida [20, 77], aparición de úlceras en piel [9, 20], y presencia de áreas de necrosis [20] son consideradas criterios de malignidad y factores pronóstico de la enfermedad. En este trabajo no hemos hallado implantación o fijación en el 75,7% de las neoplasias y sólo un 6,5% de los procesos están ulcerados. Casi un tercio de los tumores presenta una velocidad de crecimiento lento (34,4%), siendo este porcentaje muy similar al de los tumores que han desarrollado una velocidad de crecimiento rápido (37,7%). Tampoco se aprecia un porcentaje elevado de lesiones con áreas de necrosis (35,06% frente al 64,9% en donde no se evidencia este cambio). Mientras que la velocidad de crecimiento tumoral sí que parece afectar al tiempo libre de enfermedad y de supervivencia total de las pacientes, como se describe en algunos artículos [20, 77], de forma que las pacientes con tumores de crecimiento más rápido tienen tasas de supervivencia menores que aquellos con crecimiento más lento, en el caso de la presencia de necrosis hemos detectado que afecta a la supervivencia, y aunque estadísticamente no podemos determinar en que sentido, observando los datos de nuestras muestras se aprecia que aquellas pacientes con tumores que presentan amplias áreas de

necrosis macroscópica han alcanzado tiempos de supervivencia total más cortos que aquellas en cuyos tumores existe ausencia de necrosis. También hemos comprobado que un crecimiento infiltrativo hacia tejidos adyacentes sí influye sobre estas variables evolutivas (sin conocer el carácter de dicha influencia). Sin embargo, la ulceración no influye estadísticamente en la evolución de las pacientes, contrariamente a lo que opinan otros autores [8, 11, 12, 46]

A pesar de que son los tumores benignos los que suelen ser de pequeño tamaño, están bien circunscritos y presentan una consistencia firme [9, 64], en nuestro estudio observamos que el 64,9% de las lesiones tumorales se muestran como masas definidas y consistentes, alcanzando el 57,14% de las neoplasias un tamaño menor de 3 cm. Al estudiar la relación de las características macroscópicas de estos procesos, observamos que estas sí afectan a los tiempos libres de enfermedad y de supervivencia total, aunque no podemos saber en que forma influye estadísticamente ya que hay categorías con frecuencias muy bajas. Sin embargo, observando los datos de la muestra se contempla como casi la totalidad de las pacientes que consiguen un tiempo de supervivencia más elevado presentan masas definidas y consistentes, mientras que aquellas con masas no definidas y no consistentes alcanzan tiempos de supervivencia total mucho más cortos.

En lo concerniente al diagnóstico histopatológico, se contempla en nuestras pacientes una mayor representación de los carcinomas complejos, con un 24,68%, seguido del carcinoma mixto (15,58%). Cabe destacar que aquellos más agresivos, como el carcinoma inflamatorio (5,19%) y el carcinoma anaplásico (3,9%) lo han padecido una tasa muy baja de pacientes. En las publicaciones se describe a los sarcomas como las neoplasias con peor pronóstico [15, 105], mientras que los carcinomas sólidos se relacionan con una menor supervivencia que los carcinomas tubulares o papilares, así mismo, los carcinomas mixtos malignos y los de células escamosas se consideran tumores con un mal pronóstico [130]. Algunos autores consideran que los tipos histológicos con mejor

pronóstico son los carcinomas complejos, seguido de los simples, y los carcinomas in situ [15, 105]. En nuestro caso, sólo se ha hallado una relación estadísticamente significativa entre el diagnóstico histopatológico de los tumores y la evolución de las pacientes, apreciándose que sólo influye sobre el tiempo de supervivencia total, aunque no se determina cual es su relación.

Sin embargo, si realizamos un estudio observacional de la población, apreciamos que los tumores con una menor tasa de supervivencia en general, teniendo en cuenta que no se han incluido neoplasias de origen mesenquimal, son los incluidos en el grupo de tipos especiales de neoplasias epiteliales, como el carcinoma inflamatorio y el carcinoma de células escamosas, también ha tenido una menor tasa de supervivencia el carcinoma anaplásico. Estas observaciones son coincidentes con las descritas en la literatura por diversos autores [15, 105, 106]. Las pacientes que han presentado carcinomas simples han tenido un tiempo de supervivencia total menor a las que han desarrollado carcinomas complejos.

Uno de los factores clínicos más importantes para determinar el pronóstico de la enfermedad es el tamaño del tumor primario. De esta forma, diversos trabajos establecen que los tumores de mayor tamaño (T3) son los que tienen un pronóstico clínico más desfavorable [13] y que los tumores mamarios malignos son significativamente de mayor tamaño que los benignos [38] e incluso, Chang S.C. y col. (2005) observan que las pacientes con tumores mayores de 5 cm. tienen más probabilidades de desarrollar metástasis distantes [14]. En nuestro trabajo, a pesar de que todos los tumores son de carácter maligno, el porcentaje más elevado lo alcanzan aquellos tumores con un diámetro máximo menor de 3 cm. (57,14%), frente al 33,77% que son mayores de 5 cm. Resultados similares obtuvieron Philibert J.C. y col. (2003) con una representación de 55,55% de tumores con menos de 3 cm. de diámetro [106].

En diversos estudios se establece que la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos regionales está asociada a un pronóstico adverso,

relacionándose esta variable con el tiempo de supervivencia total de la paciente o el período de tiempo antes de la recurrencia del tumor [13, 37]. Nuestros resultados avalan estos trabajos, evidenciándose que el tiempo de supervivencia total en pacientes sin metástasis en los ganglios linfáticos regionales es mayor que en aquellas en las que ya ha habido diseminación de la neoplasia hacia estas estructuras orgánicas. Sin embargo, no hemos podido establecer una asociación significativa entre el estado de los ganglios linfáticos regionales y el tiempo libre de enfermedad.

En lo referente al estadio tumoral, Yamagami T. y col. (1996) comprueban que los tumores de mayor tamaño (T3) son los que presentan un pronóstico clínico más desfavorable y que el rango de supervivencia en los animales con un estadio IV (N1) es marcadamente más bajo (35,7%) que en aquellos que no presentan metástasis en ganglios linfáticos regionales (N0) (94,4%) [13]. Se evidencia en este mismo estudio, que a mayor estadiaje el pronóstico para la paciente es peor, siendo los grados de supervivencia un año después de la intervención quirúrgica del 13,6% para el estadio V, del 75,8% para el estadio IV y del 97,9% para el estadio I [13]. Por el contrario, Philibert J.C. y col. (2003) contemplan una supervivencia media de 24 meses para el estadio I, de 12 meses para el estadio II, de 15 meses para el III y de 19 meses para el estadio IV [106]. En nuestro estudio el 47,83% de las pacientes se encuentran en estadio I de la enfermedad, debido a la rapidez con que los propietarios han llevado a sus mascotas a la consulta una vez que han detectado el nódulo. Al examinar esta variable, se aprecia que esta sí influye en los tiempos libres de enfermedad y de supervivencia total, aunque no se puede establecer de que forma afecta ya que hay categorías con un porcentaje muy bajo de individuos. Sin embargo, si observamos los datos que nos aporta la muestra vemos que aquellas pacientes con un tiempo de supervivencia más alto corresponden a las que presentaban un estadio I de la enfermedad, mientras que casi todas las pacientes en un estadio V han mostrado un corto periodo de supervivencia.

Según diversos autores, el grado histológico de malignidad de los tumores se considera un importante factor pronóstico [19, 20]. Nosotros hemos podido corroborar los resultados de dichas publicaciones, concluyendo que el grado histológico de malignidad influye sobre variables como la invasión peritumoral y linfática, y sobre los marcadores inmunohistoquímicos como los receptores de estrógenos. Resaltar que las neoplasias con un grado histológico de malignidad bajo no han mostrado ni invasión peritumoral ni linfática, mientras que en aquellos tumores con un alto grado histológico de malignidad se ha detectado dicha invasión. En cuanto a la capacidad de inmunorreacción para el receptor de estrógeno α , al valorar las pacientes que son positivas para este anticuerpo, se evidencia que más de la mitad presentan tumores con un grado de malignidad bajo, mientras que casi todas las neoplasias que son negativas para este receptor tienen un grado de malignidad alto.

Así mismo, el grado histológico de malignidad influye sobre la aparición de metástasis distantes durante el período de seguimiento y sobre los tiempos libres de enfermedad y de supervivencia total, concluyendo como cabía esperar, que el tiempo de supervivencia es mayor a menor grado de malignidad del proceso neoplásico.

En lo referente a la invasión peritumoral y linfática, estas se aprecian en un 33,77% y 28,57% de los tumores analizados respectivamente. Estas dos variables influyen sobre la evolución de las pacientes, apreciándose que afectan a la aparición de metástasis, el tiempo libre de enfermedad y el tiempo de supervivencia total. En ambos casos, la supervivencia es estadísticamente mayor en las pacientes que no muestran ni invasión peritumoral ni linfática, corroborando lo expuesto por otros autores [79].

Existe en la literatura científica fuertes evidencias de que la presencia de infiltrado inflamatorio en el tumor puede contribuir al incremento de la angiogénesis, de la agresividad tumoral y, por lo tanto, a un peor pronóstico [120]. En nuestro trabajo, observamos que un tercio de los tumores (33,77%) presentan una intensa reacción inflamatoria y que, cuando

existe inflamación, ésta se halla vinculada en un 75,8% a zonas peritumorales. Se demuestra que la presencia de reacción inflamatoria en el tumor sí afecta a los tiempos libre de enfermedad y de supervivencia total, de modo que a menor evidencia de reacción inflamatoria mayor es el tiempo de supervivencia total, confirmando lo aportado por los autores consultados. Sin embargo, el hecho de que dicha inflamación se halle en una zona u otra de la lesión no afecta a las variables mencionadas.

El estrógeno y la progesterona juegan un papel importante en la patogénesis de los tumores de mama [136, 137] por lo que se ha cuantificado su presencia en dicho tejido y su relación con un posible poder pronóstico [9, 37]. La pérdida de estos receptores hormonales se asocia con la progresión de la enfermedad [37], además de ser útil para identificar a aquellas pacientes que pueden beneficiarse de la terapia antiestrogénica [25]. En un intento de aportar información acerca de estos marcadores inmunohistoquímicos, se ha examinado la positividad de los ER y los PR en las muestras tumorales obtenidas tras la intervención quirúrgica de nuestras pacientes.

Se comprueba que tan solo el 31,17% de los tumores son positivos frente al ER α , mientras que el porcentaje de pacientes con tumores mamarios positivos para el PR asciende al 80,52%. Dichos resultados son superiores a los expuestos por Martín de las Mulas J. y col. (2005) [137], los cuales describen una positividad del 22% para los receptores de estrógenos y un 66% para los PR. Sin embargo, se han publicado porcentajes muy variados de expresiones para los ER; expresiones más bajas (10%) [178], expresiones más altas (59%) [153] y expresiones muy elevadas (87,5%) [141] en tumores malignos. En cuanto a la expresión del PR, nuestros datos difieren de los expuestos por Millanta F. y col. (2005) que hallan expresiones más bajas para dicho receptor con un 41,6% de positividad para carcinomas no invasivos y un 34,7% para carcinomas invasivos [155].

En un análisis más exhaustivo de nuestros resultados, apreciamos que el 18,18% de los procesos son negativos a ambos receptores,

mientras que el 28,57% de ellos son positivos para ambos receptores y solamente se evidencia un 1,30% de las neoplasias positivas exclusivamente para receptor de estrógeno α , frente al 51,95% que lo han sido sólo para receptor de progesterona. Estos datos no avalan los publicados por diferentes autores, que encuentran una expresión de ambos receptores hormonales en el 46,9% de los tumores primarios [23], porcentaje similar es el aportado por Donnay I. y col. en 1993 [145]. Por otra parte, Toniti W. y col. (2009) no encuentran expresión de ninguno de los dos receptores en los tumores malignos estudiados [127].

En este trabajo no se ha realizado un estudio comparativo entre la expresión de estos receptores hormonales a nivel de tumores de carácter benigno y maligno, ya que nuestro análisis se ha realizado exclusivamente sobre muestras de neoplasias malignas, concretamente carcinomas.

Al igual que en el estudio llevado a cabo por Martín de las Mulas J. y col. (2005) [137] no hemos evidenciado ninguna relación entre la expresión de alguno de los receptores hormonales con la edad de diagnóstico de la enfermedad, el mestizaje y el tamaño de las pacientes, así como tampoco con el número de pseudogestaciones padecidas por la paciente o con la multiplicidad de los tumores. Por el contrario, nuestros resultados contradicen los publicados por Nieto A. y col. (2000), ya que no evidenciamos una relación estadísticamente significativa entre la expresión del ER α y el desarrollo posterior de metástasis distantes; sin embargo, estos autores observan porcentajes más bajos de expresión de ER en los tumores primarios que dan lugar a metástasis que en los que no metastatizan [141].

Por otra parte, hemos detectado que el hecho de que el tumor sea positivo o negativo para el ER α sí afecta a los tiempos libres de enfermedad y de supervivencia total, de manera que el tiempo de supervivencia total y el tiempo libre de enfermedad es mayor en las pacientes con tumores positivos a estos receptores. Por lo que se podría considerar a estos receptores hormonales como factor pronóstico de la evolución de la enfermedad. Sin embargo, en lo referente a los

PR, comprobamos que la presencia o no de estos receptores no afecta a ninguna de las variables de evolución de las pacientes.

Sartin E. y col. ya indicaron en 1992, que el estado de ER/PR se podía considerar como un factor pronóstico útil para los carcinomas mamarios en perras, pudiendo ser beneficioso para identificar aquellas pacientes que pueden responder a la terapia antiestrogénica [25]. A pesar de estas afirmaciones, Millanta F. y col. (2005) no pudieron establecer una asociación estadísticamente significativa entre la pérdida de ambos receptores hormonales y un pronóstico más desfavorable [155]. Pese a que en nuestra investigación hemos constatado que el 18,18% de los tumores son negativos para ambos receptores, debido a la escasez de datos en alguno de los grupos valorados no se han podido relacionar estos valores con las variables de evolución de las pacientes en un análisis estadístico. Aunque si analizamos nuestra muestra de población vemos que las pacientes cuyos tumores son negativos a ambos receptores hormonales exhiben, en general, un tiempo de supervivencia total más corto que aquellas con neoplasias positivas a ambos receptores o a uno de ellos.

En este trabajo se ha empleado también la técnica inmunohistoquímica para la determinación de la sobreexpresión de la oncoproteína c-erbB-2, apreciándose que tan sólo el 2,60% de los tumores sobreexpresan la proteína, con una puntuación de (3+). Sin embargo, si consideramos como positivos los tumores clasificados como 2+ esta cifra de positividad se eleva a un 65%. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por el resto de autores que hemos consultado, los cuales describen porcentajes de positividad más elevados. Así, Ahern T.E. y col. (1996) [124] confirman positividad en el 74% de tumores por ellos analizados. Sin embargo, Dutra A.P. y col. (2004) evidencian un porcentaje inferior (35,4%), de los cuales el 25,3% son 3+ [28]. El porcentaje ya señalado con anterioridad por Rungsipipat A. y col. (1999) ha sido más bajo, concretamente el 19,1% [58]. Otros autores también describen una sobreexpresión para la oncoproteína inferior a la detectada en nuestro estudio, considerando

como positivo una inmunorreacción 2+ y 3+ con porcentajes variados que oscilan entre el 17,6% [29], el 29,7% [250], y el 42,59% propuesto por Kumar P. y col. (2009), en cuyo estudio no apareció ningún tumor que mostrara una inmunotinción de 3+ [258]. Estas variaciones entre los diferentes trabajos pueden deberse a la aplicación de distintos protocolos de estandarización y a la variación subjetiva en la evaluación de la inmunotinción de las células neoplásicas. La diferencia entre nuestros resultados y los descritos por Ahern T. y col. (1996) [124] con respecto al resto de trabajos puede deberse al bajo número de individuos analizados en el estudio de el caso de Ahern T. y col. (1996), con 24 pacientes únicamente y, en general, a los diferentes métodos utilizados para la detección de la sobreexpresión de la oncoproteína en el caso de Dutra A.P. y col. (2004) [28].

Nuestros resultados, si sólo se tiene en cuenta que hemos considerado a los positivos como los que presentan una valoración de la inmunotinción 3+, están más en concordancia con los obtenidos por Nowak M. y col. (2005) en los que muestran sólo un 10% de tumores [259], aunque los nuestros siguen siendo inferiores, quizá debido a la variación en el tipo de anticuerpo empleado, protocolo seguido o sistema de puntuación que se ha utilizado.

No hemos podido analizar la influencia estadística de la sobreexpresión de esta oncoproteína con ninguna de las variables morfológicas; sin embargo, en el trabajo de Dutra A.P. y col. (2004) remarcan que la expresión de erbB-2 se relaciona con un elevado grado de pleomorfismo nuclear e índice mitótico, así como con una baja tasa de formación tubular en tumores mamarios caninos [28], es decir, un grado histológico de malignidad alto. En nuestro estudio, las dos pacientes cuyas neoplasias son positivas con una inmunorreacción de 3+ presentan un grado histológico de malignidad de II y III.

Así mismo, tampoco hemos podido establecer una relación entre esta variable y la expresión de receptores hormonales, como si se ha demostrado

en el cáncer mamario de la mujer, en el cual se comprueba que aquellos procesos malignos con altos niveles de sobreexpresión o amplificación de la oncoproteína se relacionan con niveles más bajos de ER/PR [270]. En nuestro trabajo, se observa que aquellos tumores positivos a la sobreexpresión de la oncoproteína c-erbB-2 son ambos negativos para ER α , siendo uno de ellos positivo para PR (5 puntos); por otra parte, las pacientes con tumores 3+ tuvieron un tiempo de supervivencia total de 1 mes (ER α negativo/PR positivo) y de 20 meses (ER/PR negativos). Martín de las Mulas J. y col. (2003) describen en su estudio que todos los tumores positivos a c-erbB-2 (2+ y 3+) muestran un tamaño mayor a 3 cm., presentan un grado de malignidad alto (III), tienen un crecimiento infiltrativo y ausencia de receptores de estrógenos y de progesterona [29]. En nuestro estudio, si se consideran como positivos a los tumores con inmunorreacción 2+ y 3+, se aprecia que no afecta estadísticamente al grado histológico de malignidad, ni al resto de marcadores inmunohistoquímicos analizados, así como tampoco afecta a la evolución de las pacientes.

Por otra parte, valorando únicamente los tumores 3+ como positivos a la expresión de la oncoproteína, tampoco se ha podido establecer una asociación entre su sobreexpresión y la evolución de las pacientes, con el fin de valorar dicha expresión como factor pronóstico, como han descrito diversos autores [28, 250], ya que la sobreexpresión de la oncoproteína no afecta al tiempo libre de enfermedad ni al tiempo de supervivencia total.

En su relación con la enzima COX-2, si se contempla sólo a estos tumores 3+, se observa que dichas neoplasias tienen una inmunorreactividad para la enzima COX-2 baja, con una puntuación entre 0 y 6 puntos.

Diversas investigaciones proporcionan evidencias de que la expresión de la enzima COX-2 es más frecuente y se muestra con mayor intensidad en los tumores malignos que en los de carácter benigno, variando la proporción de su expresión entre el 56% y el 100% de las muestras de tumores mamarios (benignos y malignos)

analizadas [97-100, 122, 345], mostrando los estudios analizados una relación estadísticamente significativa entre una elevada expresión de la enzima y unos tiempos de supervivencia y libre de enfermedad bajos, así como una influencia en el desarrollo de metástasis distantes durante el período de seguimiento [27, 100]. Nuestros resultados difieren de estas evidencias, ya que casi la mitad de los tumores analizados (48,05%) no muestran inmunotinción para la enzima COX-2 y solamente un 2,60% de las neoplasias obtienen una puntuación para la inmunotinción de 9.

En el estudio de Queiroga F.L. y col. (2010) [100] establecen una categorización que permite diferenciar los tumores con baja y alta inmunorreactividad, pero sus resultados difieren de los que hemos obtenido, ya que en nuestro análisis el 97,4% de las neoplasias presenta una inmunorreactividad baja (0-6 puntos), mientras que en el estudio de Queiroga F.L. y col. (2010) las neoplasias con una inmunorreactividad alta ascienden al 70,37% [100]. Sólo hemos podido analizar la influencia de esta variable sobre los tiempos libre de enfermedad y de supervivencia total, comprobándose que sí afecta a ambas variables, aunque no podemos determinar en que sentido.

Si se incluye en el grupo de inmunorreacción alta a las puntuaciones iguales o superiores a 6, se establece que la expresión de COX-2 no afecta al grado histológico de malignidad ni a la sobreexpresión de la oncoproteína c-erbB-2, aunque sí influye en la positividad al ER α , siendo 0,3048 veces más probable obtener una inmunorreactividad alta si el ER α es positivo. También se aprecia que no afecta estadísticamente a la aparición de metástasis distantes durante el período de seguimiento del estudio, pero sí a los tiempos libre de enfermedad y de supervivencia total, de manera que si la inmunorreactividad de la COX-2 es baja los tiempos de evolución son mayores.

VI. Conclusiones

1-La patología oncológica es el motivo más frecuente de consulta en el Servicio de Cirugía del Hospital Clínico Veterinario de la UEx en el periodo analizado, siendo el tejido glandular mamario el más propenso al padecimiento de esta patología.

2-La variable epidemiológica mestizaje debe ser tomada en cuenta como factor de riesgo en la progresión de neoplasias malignas en general y de las del tejido mamario en particular, siendo las pacientes oncológicas clasificadas como mestizas las más susceptibles a padecer cualquier tipo de proceso oncológico maligno, fundamentalmente a nivel del tejido mamario.

3-La variable tamaño del animal también debe ser considerada como un factor de riesgo en el diagnóstico de tumores de mama respecto al padecimiento de otros tipos de neoplasias, siendo las pacientes clasificadas como grandes (>25Kg) las más predispuestas no sólo al padecimiento de tumores mamarios, sino también las más sensibles para el desarrollo de procesos malignos en este tejido.

4-La edad debe ser estimada como un factor de riesgo negativo en la valoración de los procesos neoplásicos en general, siendo más probable que la paciente desarrolle una neoplasia maligna cuando ésta presenta una edad avanzada, apreciándose esta misma tendencia en el caso de las pacientes con neoplasias mamarias malignas.

5-Los carcinomas mamarios afectan con mayor frecuencia a hembras de raza pura pertenecientes al grupo de Perros de Muestra (Grupo 7), de pequeño tamaño y con una edad promedio de 10 años.

6-La edad de la paciente con carcinoma mamario se correlaciona positivamente con la variable evolutiva tiempo de supervivencia total, afectando también a la evolución final de la paciente (mortalidad).

7-La velocidad de crecimiento tumoral influye negativamente en las variables evolutivas tiempo libre de enfermedad y tiempo de supervivencia total.

8-Las características morfológicas infiltración del tumor en los tejidos adyacentes, presencia macroscópica de necrosis y estadiaje tumoral influyen sobre las variables evolutivas tiempo libre de enfermedad y tiempo de supervivencia total, aunque estadísticamente no se puede determinar el sentido de la asociación. La presencia de metástasis en ganglios linfáticos regionales se vincula negativamente a un menor tiempo de supervivencia total.

9-Los parámetros grado histológico de malignidad, invasión vascular y presencia de infiltrado inflamatorio en la neoplasia, afectan negativamente a las variables evolutivas tiempo libre de enfermedad y tiempo de supervivencia total, mientras que el diagnóstico histopatológico sólo influye sobre el tiempo de supervivencia total, aunque no se determina cual es su relación.

10-La ausencia de expresión del receptor de estrógeno α en el tumor se relaciona con unos tiempos libre de enfermedad y de supervivencia total menores, por lo que se considera a este marcador con un factor pronóstico para el carcinoma de mama en la perra.

11-La expresión del receptor de progesterona y la sobreexpresión de la oncoproteína c-erbB-2 y de la enzima COX-2 en el tumor no influyen sobre las variables evolutivas tiempo libre de enfermedad y tiempo de supervivencia total.

VII. Resumen

El objetivo final de este estudio ha sido analizar si la interacción de ciertos factores clínicos, morfológicos e inmunohistoquímicos tienen influencia sobre la evolución del carcinoma mamario en la especie canina.

En este trabajo se ha realizado un examen retrospectivo previo sobre 858 pacientes para determinar la incidencia e importancia de la patología oncológica mamaria en las hembras de la especie canina, mediante el análisis de variables epidemiológicas (raza, mestizaje, edad y tamaño), clínicas (tipo de patología y tipo de tumor) e histopatológica (malignidad tumoral). Para ello se han formado cuatro grupos de pacientes: grupo general (n=858), grupo de pacientes no oncológicas (n=482), grupo de pacientes oncológicas (n=376) y grupo de pacientes con neoplasias mamarias (n=227). Por otra parte, se lleva a cabo un estudio prospectivo de 77 pacientes con carcinomas mamarios en los que se valoran parámetros epidemiológicos, clínicos, morfológicos, histopatológicos, inmunohistoquímicos y evolutivos. En este estudio prospectivo se realiza un análisis descriptivo de todas las variables e inferencias, comparando principalmente los marcadores inmunohistoquímicos (ER α , PR, c-erbB-2 y COX-2) con la evolución de las pacientes, con el fin de obtener información sobre su valor pronóstico. Así mismo se realiza un análisis de la supervivencia.

En nuestro estudio, la oncología se presenta como la patología más frecuente para las hembras de la especie canina en la consulta de cirugía del Hospital Clínico Veterinario de la UEx, con una mayor representación de los tumores mamarios. Se evidencia que las perras mestizas con tumores son más propensas que las de raza pura al padecimiento de neoplasias mamarias y que estas son más frecuentemente de comportamiento maligno; así mismo, son aquellas pacientes de tamaño grande las que muestran una mayor predisposición a padecer tumores mamarios malignos. La edad influye negativamente en la malignidad de cualquier tipo de proceso neoplásico. En el análisis que se ha realizado en 77 pacientes con carcinomas mamarios se comprueba que esta patología es más habitual en hembras de raza pura pertenecientes al grupo de Perros de Muestra (Grupo 7), de pequeño tamaño y con una edad promedio de 10 años, relacionándose negativamente la edad con el tiempo de supervivencia total y con la mortalidad. Considerando las variables clínicas, únicamente la velocidad de crecimiento influye negativamente en los tiempos libres de enfermedad y de supervivencia total. Atendiendo a las variables morfológicas, tanto la implantación del tumor, como la necrosis y el estadiaje tumoral influyen en la evolución, asociándose negativamente la presencia de metástasis en ganglios linfáticos regionales con el tiempo de supervivencia total. También influyen negativamente sobre la evolución de la paciente el grado histológico de malignidad, la invasión vascular y el infiltrado inflamatorio. En el estudio inmunohistoquímico, la ausencia de ER α se relaciona con unos tiempos libre de enfermedad y de supervivencia total menores, mientras que el resto de marcadores analizados, el PR, la oncoproteína c-erbB-2 y la enzima COX-2, no influyen en la evolución de las pacientes.

En conclusión, el cáncer es el motivo de consulta más común en hembras de la especie canina en el servicio de cirugía de nuestro Hospital, siendo los tumores de mama los más frecuentes en nuestras pacientes. En nuestro trabajo hemos podido evidenciar que la edad, la velocidad de crecimiento tumoral, la fijación a tejidos, la necrosis, el estadiaje tumoral, la presencia de metástasis en ganglios

linfáticos regionales, el grado histológico de malignidad, la invasión vascular, la presencia de infiltrado inflamatorio y el diagnóstico histopatológico, junto con la ausencia de la expresión para los receptores α de estrógenos, son factores pronóstico para establecer la evolución de las pacientes con esta enfermedad oncológica de la glándula mamaria.

VII. Summary

The final purpose of this study has been to analyze whether the interaction of certain clinical, morphological and immunohistochemical factors influence the development of canine mammary carcinoma.

This paper has made a previous retrospective review of 858 patients to determine the incidence and importance of mammary cancer pathology in females of the canine species, by analyzing epidemiological (breed, crossbreeding, age and size), clinical (type of pathology and type of tumor), histopathological (tumoral malignancy) variables. For this aim they have been formed four groups of patients: general group (n=858), group of non-cancer patients (n=482), group of cancer patients (n=376) and group of patients with mammary neoplasms (n=227). On the other hand, it performed a prospective study of 77 patients with breast carcinoma in which epidemiological, clinical, morphopathologic, histopathological, immunohistochemical and evolutive parameters are valued. In this prospective study a descriptive analysis of all variables and inferences, mainly comparing the immunohistochemical markers (ER α , PR, c-erbB-2 and COX-2) with the evolution of the patients, in order to obtain information about its prognostic value. Likewise survival analysis is performed.

In our study, oncology is presented as the most common pathology for females of the canine species in consulting surgery in the Veterinary Hospital of the UEX, with greater representation of mammary tumor pathology. It is evident that crossmixed dogs with tumors are more likely than the pure breed condition to suffer mammary tumors and that these are more often malignant behavior; likewise, those large patients show greater predisposition to malignant mammary tumors. The age negatively influences the malignancy of any type of neoplastic process. The analysis was performed in 77 patients with mammary carcinoma is found that this condition is more common in purebred females belonging to the group Pointing Dogs (Group 7), small size and with an average age of 10 years, interacting negatively age with overall survival time and mortality. Considering the clinical variables, only the growth rate negatively affects disease-free time and overall survival. Considering the morphological variables, both tumor implantation, such as staging and tumor necrosis influence the evolution negatively associating the presence of metastases in regional lymph nodes with overall survival time. Also negatively influence the evolution of the patient the histological grade of malignancy, vascular invasion and the inflammatory infiltrate. In the immunohistochemical study, the absence of ER α is related to a disease-free and lower overall survival times, while other markers analyzed, the PR, the oncoprotein c-erbB-2 and COX-2, does not influence in the evolution of patients.

In conclusion, cancer is the most common reason for consultation in females of the canine species in the surgery department of our hospital, with the most common tumors of the mammary gland in our patients. In our work we have been able to demonstrate that age, the rate of tumor growth, attachment to tissue necrosis, tumor staging, the presence of metastases in regional lymph nodes, histological grade of malignancy, vascular invasion, the presence of inflammatory infiltration and histopathological diagnosis, together with the absence of the expression for estrogen receptor α , are prognostic factors to establish the evolution of patients with this cancer disease of the mammary gland.

VIII. Bibliografía

1. Pinho, S.S., Carvalho, S., Cabral, J., Reis, C. A., Gartner, F. Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. *Transl Res*, 2012. 159(3): p. 165-72.
2. Thamm, D. and Dow, S. How companion animals contribute to the fight against cancer in humans. *Vet Ital*, 2009. 45(1): p. 111-20.
3. Ranieri, G., Gadaleta, C. D., Patruno, R., Zizzo, N., Daidone, M. G., Hansson, M. G., Paradiso, A., Ribatti, D. A model of study for human cancer: Spontaneous occurring tumors in dogs. Biological features and translation for new anticancer therapies. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2013. 88(1): p. 187-97.
4. Marconato, L., Leo, C., Girelli, R., Salvi, S., Abramo, F., Bettini, G., Comazzi, S., Nardi, P., Albanese, F., Zini, E. Association between waste management and cancer in companion animals. *J Vet Intern Med*, 2009. 23(3): p. 564-9.
5. Rivera, P. and H. von Euler, Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors. *Vet Pathol*, 2011. 48(1): p. 132-46.
6. Moe, L., Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. *J Reprod Fertil Suppl*, 2001. 57: p. 439-43.
7. Egenvall, A., Bonnett, B. N., Ohagen, P., Olson, P., Hedhammar, A., von Euler, H. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Prev Vet Med*, 2005. 69(1-2): p. 109-27.
8. Perez Alenza, M.D., Pena, L., del Castillo, N., Nieto, A. I., Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *J Small Anim Pract*, 2000. 41(7): p. 287-91.
9. Lana S.E., Rutteman G.R., Withrow S.J., Tumors of the Mammary Gland. *Small Animal Clinical Oncology*. In Saunders (ed), 2007. Fourth Edition: p. 619-636.
10. Itoh, T., Uchida, K., Ishikawa, K., Kushima, K., Kushima, E., Tamada, H., Moritake, T., Nakao, H., Shii, H. Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: differences between small-breed dogs and others. *J Vet Med Sci*, 2005. 67(3): p. 345-7.
11. Perez Alenza, M.D., Pena, L., Nieto, A. I., Castano, M., Clinical and pathological prognostic factors in canine mammary tumors. *Ann Ist Super Sanita*, 1997. 33(4): p. 581-5.
12. Pena, L.L., Nieto, A. I., Perez-Alenza, D., Cuesta, P., Castano, M., Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *J Vet Diagn Invest*, 1998. 10(3): p. 237-46.
13. Yamagami, T., Kobayashi, T., Takahashi, K., Sugiyama, M., Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. *J Vet Med Sci*, 1996. 58(11): p. 1079-83.
14. Chang, S.C., Chang, C. C., Chang, T. J., Wong, M. L., Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). *J Am Vet Med Assoc*, 2005. 227(10): p. 1625-9.
15. Hellmen, E., Bergstrom, R., Holmberg, L., Spangberg, I. B., Hansson, K., Lindgren, A., Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Vet Pathol*, 1993. 30(1): p. 20-7.
16. Karayannopoulou, M., et al., Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading

method. *J Comp Pathol*, 2005. 133(4): p. 246-52.

17. Sarli, G., Preziosi, R., Benazzi, C., Castellani, G., Marcato, P. S., Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. *J Vet Diagn Invest*, 2002. 14(1): p. 25-34.

18. Dickson, R.B., Lippman, M.E., Cáncer de mama, in *Cáncer. Principios y práctica de oncología.*, E.M. Panamericana, Editor 2000, Editorial Médica Panamericana: Madrid. p. 1541-1616.

19. Goldschmidt, M., Pena, L., Rasotto, R., Zappulli, V., Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol*, 2011. 48(1): p. 117-31.

20. Misdorp, W., *Tumors of the Mammary Gland. Tumors in Domestic Animals.* Iowa State Press (ed), 2002. Fourth Edition: p. 575-606.

21. Aaltomaa, S., Lipponen, P., Eskelinen, M., Kosma, V. M., Marin, S., Alhava, E., Syrjanen, K., Lymphocyte infiltrates as a prognostic variable in female breast cancer. *Eur J Cancer*, 1992. 28A(4-5): p. 859-64.

22. Ben-Baruch, A., Host microenvironment in breast cancer development: inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor-microenvironment interactions. *Breast Cancer Res*, 2003. 5(1): p. 31-6.

23. Rutteman, G.R., Misdorp, W., Blankenstein, M. A., van den Brom, W. E., Oestrogen (ER) and progesterin receptors (PR) in mammary tissue of the female dog: different receptor profile in non-malignant and malignant states. *Br J Cancer*, 1988. 58(5): p. 594-9.

24. Chang, C.C., Tsai, M. H., Liao, J. W., Chan, J. P., Wong, M. L., Chang, S. C., Evaluation of hormone receptor expression for use in predicting survival of female dogs with malignant mammary gland tumors. *J Am Vet Med Assoc*, 2009. 235(4): p. 391-6.

25. Sartin, E.A., Barnes, S., Kwapien, R. P., Wolfe, L. G., Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs. *Am J Vet Res*, 1992. 53(11): p. 2196-200.

26. Queiroga, F.L., Perez-Alenza, M. D., Silvan, G., Pena, L., Lopes, C., Illera, J. C., Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2005. 94(1-3): p. 181-7.

27. Lavalle, G.E., Bertagnolli, A. C., Tavares, W. L., Cassali, G. D., Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. *Vet Pathol*, 2009. 46(6): p. 1275-80.

28. Dutra, A.P., Granja, N. V., Schmitt, F. C., Cassali, G. D., c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Braz J Med Biol Res*, 2004. 37(11): p. 1673-81.

29. Martin de las Mulas, J., Ordas, J., Millan, Y., Fernandez-Soria, V., Ramon y Cajal, S., Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Breast Cancer Res Treat*, 2003. 80(3): p. 363-7.

30. Piccart, M., Lohrisch, C., Di Leo, A., Larsimont, D., The predictive value of HER2 in breast cancer. *Oncology*, 2001. 61 Suppl 2: p. 73-82.

31. Adams, V.J., Evans, K. M., Sampson, J., Wood, J. L., Methods and mortality results of a health survey of purebred dogs in the UK. *J Small Anim Pract*, 2010. 51(10): p. 512-24.

32. Dorn, C.R., Taylor, D. O., Schneider, R., Hibbard, H. H., Klauber, M. R., Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *J Natl Cancer Inst*, 1968. 40(2): p. 307-18.

33. Vascellari, M., Baioni, E., Ru, G., Carminato, A., Mutinelli, F., Animal tumour registry of two provinces in northern Italy: incidence of spontaneous tumours in dogs and cats. *BMC Vet Res*, 2009. 5: p. 39.

34. Dobson, J.M., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K., Wood, J. L., Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J Small Anim Pract*, 2002. 43(6): p. 240-6.

35. Merlo, D.F., Rossi, L., Pellegrino, C., Ceppi, M., Cardellino, U., Capurro, C. y col.

Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *J Vet Intern Med*, 2008. 22(4): p. 976-84.

36. Gruntzig, K., Graf, R., Hassig, M., Welle, M., Meier, D., Lott, G., Erni, D., Schenker, N. S. y col. The Swiss Canine Cancer Registry: a retrospective study on the occurrence of tumours in dogs in Switzerland from 1955 to 2008. *J Comp Pathol*, 2015. 152(2-3): p. 161-71.

37. Rutteman, G.R., Kirpensteijn, J., Tumours of the mammary glands. *British Small Animal Veterinary Association (ed): Manual of Canine and Feline Oncology.*, 2003. Second Edition: p. 235-242.

38. Sorenmo, K.U., Kristiansen, V. M., Cofone, M. A., Shofer, F. S., Breen, A. M., Langeland, M. y col. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Vet Comp Oncol*, 2009. 7(3): p. 162-72.

39. Sonnenschein, E.G., Glickman, L. T., Goldschmidt, M. H., McKee, L. J., Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study. *Am J Epidemiol*, 1991. 133(7): p. 694-703.

40. Allende, M.G., Del Amo, A.N., Castellano, M.C., Idiart, J.R., Diessler, M.E., Bonzo, E.B., Quiroga, M.A., Machuca, M.A., Risso, M.A. , Análisis estadístico de tumores mamarios en perras a través de una perspectiva bayesiana. . En: VI Congreso Internacional de Ciencias Veterinarias y II Seminario Internacional de Salud Animal., 2007.

41. Mangieri, J., Sistema TNM, estadificación del paciente y características del tumor, las linfadenopatías y las metástasis en el canino con cáncer mamario. En: *Oncología Veterinaria*. Prensa Veterinaria Argentina., 1994: p. 144-172.

42. Borge, K.S., A.L. Borresen-Dale, and F. Lingaas, Identification of genetic variation in 11 candidate genes of canine mammary tumour. *Vet Comp Oncol*, 2011. 9(4): p. 241-50.

43. Perez Alenza, M.D., Influencia de la nutrición, alteraciones genéticas y aspectos clínicos en los tumores mamarios caninos., 1994,

Universidad Complutense de Madrid.

44. Karayannopoulou, M., Kaldrymidou, E., Dessiris, A., Some epidemiological aspects of canine mammary tumors. Treatment and prognosis. *Bulletin of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 1989. 40: p. 111-121.

45. Ferreira G., P.F., Arango M. , Neoplasias de glándula mamaria canina diagnosticadas en Medellín, Colombia, entre 1968 y 1994. *Vet Mex*, 1997. 28(3): p. 257-259.

46. Perez Alenza, D., Rutteman, G. R., Pena, L., Beynen, A. C., Cuesta, P., Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. *J Vet Intern Med*, 1998. 12(3): p. 132-9.

47. Flores A.J., A.E., Sillero M.J. , Epidemiología de los tumores de mama en la perra, in II Reunión Grupo Oncología de AVEPA1996: Madrid.

48. van Garderen, E. and J.A. Schalken, Morphogenic and tumorigenic potentials of the mammary growth hormone/growth hormone receptor system. *Mol Cell Endocrinol*, 2002. 197(1-2): p. 153-65.

49. Da Silva A.E., S.R., Cassali G.D. , Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. *Ciência Rural* 2004. 34(2): p. 625-633.

50. Rutteman, G.R., Hormones and mammary tumour disease in the female dog: an update. *In Vivo*, 1990. 4(1): p. 33-40.

51. Beauvais, W., J.M. Cardwell, and D.C. Brodbelt, The effect of neutering on the risk of urinary incontinence in bitches - a systematic review. *J Small Anim Pract*, 2012. 53(4): p. 198-204.

52. Veronesi, M.C., Battocchio, M., Rizzi, C., Sironi, G., Relationship between dysplastic and neoplastic mammary lesions and pseudopregnancy in the bitch. *Vet Res Commun*, 2003. 27 Suppl 1: p. 245-7.

53. Valladares, Y., Neoplasias de mama, in *Historia Natural del Cáncer. Causas, procesos y manifestaciones. Oncología particular.*, Rescate, Editor 2007. p. 1170-1220.

54. El Etreby, M.F., Muller-Peddinghaus, R., Bhargava, A. S., El Bab, M., Graf, K. J., Trautwein, G., The role of the pituitary gland in spontaneous canine mammary tumorigenesis. *Vet Pathol*, 1980. 17(1): p. 2-16.
55. Mol, J.A., van Garderen, E., Rutteman, G. R., Rijnberk, A., New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary glands of dogs, cats and humans. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1996. 57(1-2): p. 67-71.
56. Coppola F., N.J., Aguirre R., Metabolismo de los estrógenos endógenos y cáncer de mama. *Revista Médica del Uruguay*, 2005. 21: p. 15-22.
57. Paterson, M.C., Dietrich, K. D., Danyluk, J., Paterson, A. H., Lees, A. W., Jamil, N. y col. Correlation between c-erbB-2 amplification and risk of recurrent disease in node-negative breast cancer. *Cancer Res*, 1991. 51(2): p. 556-67.
58. Rungsipipat, A., Tateyama, S., Yamaguchi, R., Uchida, K., Miyoshi, N., Hayashi, T., Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB-2 oncogene products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors. *J Vet Med Sci*, 1999. 61(1): p. 27-32.
59. Murakami, Y., Tateyama, S., Rungsipipat, A., Uchida, K., Yamaguchi, R., Immunohistochemical analysis of cyclin A, cyclin D1 and P53 in mammary tumors, squamous cell carcinomas and basal cell tumors of dogs and cats. *J Vet Med Sci*, 2000. 62(7): p. 743-50.
60. Wakui, S., Muto, T., Yokoo, K., Yokoo, R., Takahashi, H., Masaoka, T., Hano, H., Furusato, M., Prognostic status of p53 gene mutation in canine mammary carcinoma. *Anticancer Res*, 2001. 21(1B): p. 611-6.
61. Rodo, A. and E. Malicka, Immunohistochemical expression of protein p53 in neoplasms of the mammary gland in bitches. *Pol J Vet Sci*, 2008. 11(2): p. 89-95.
62. Perez Alenza, M.D., E. Tabanera, and L. Pena, Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995-1999). *J Am Vet Med Assoc*, 2001. 219(8): p. 1110-4.
63. Vail, D.M. and E.G. MacEwen, Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Invest*, 2000. 18(8): p. 781-92.
64. Misdorp, W. and A.A. Hart, Prognostic factors in canine mammary cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1976. 56(4): p. 779-86.
65. Misdorp W., E.R.W., Hellmen E., Lipscomb T.P., Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. *International Histological Classification of Tumors in Domestic Animals.*, 1999, Armed Forces Institute of Pathology with the World Health Organization: Washington DC.
66. Allen, S.W., K.W. Prasse, and E.A. Mahaffey, Cytologic differentiation of benign from malignant canine mammary tumors. *Vet Pathol*, 1986. 23(6): p. 649-55.
67. Reinhardt, S., Stockhaus, C., Teske, E., Rudolph, R., Brunnberg, L., Assessment of cytological criteria for diagnosing osteosarcoma in dogs. *J Small Anim Pract*, 2005. 46(2): p. 65-70.
68. Orell, S.R. and J. Miliuskas, Fine needle biopsy cytology of breast lesions: a review of interpretative difficulties. *Adv Anat Pathol*, 2005. 12(5): p. 233-45.
69. Ciatto, S., Rosselli Del Turco, M., Ambrogetti, D., Bravetti, P., Catarzi, S., Morrone, D., Cariaggi, M. P., Solid nonpalpable breast lesions. Success and failure of guided fine-needle aspiration cytology in a consecutive series of 2444 cases. *Acta Radiol*, 1997. 38(5): p. 815-20.
70. Buchbinder, S.S., Gurell, D. S., Tarlow, M. M., Salvatore, M., Suhrland, M. J., Kader, K., Role of US-guided fine-needle aspiration with on-site cytopathologic evaluation in management of nonpalpable breast lesions. *Acad Radiol*, 2001. 8(4): p. 322-7.
71. Simon, D., Schoenrock, D., Nolte, I., Baumgartner, W., Barron, R., Mischke, R., Cytologic examination of fine-needle

aspirates from mammary gland tumors in the dog: diagnostic accuracy with comparison to histopathology and association with postoperative outcome. *Vet Clin Pathol*, 2009. 38(4): p. 521-8.

72. Patsikas, M.N., Karayannopoulou, M., Kaldrymidoy, E., Papazoglou, L. G., Papadopoulou, P. L., Tzegas, S. I., Tziris, N. E., Kaitzis, D. G., Dimitriadis, A. S., Dessiris, A. K., The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: a lymphographic study. *Anat Histol Embryol*, 2006. 35(4): p. 228-34.

73. Patsikas, M.N. and A. Dessiris, The lymph drainage of the mammary glands in the bitch: a lymphographic study. Part I: The 1st, 2nd, 4th and 5th mammary glands. *Anat Histol Embryol*, 1996. 25(2): p. 131-8.

74. Patsikas, M.N. and A. Dessiris, The lymph drainage of the mammary glands in the Bitch: a lymphographic study. Part II: The 3rd mammary gland. *Anat Histol Embryol*, 1996. 25(2): p. 139-43.

75. Pereira, C.T., Luiz Navarro Marques, F., Williams, J., Wladimir De Martin, B., Primo Bombonato, P., ^{99m}Tc-labeled dextran for mammary lymphoscintigraphy in dogs. *Vet Radiol Ultrasound*, 2008. 49(5): p. 487-91.

76. Otoni, C.C., Rahal, S. C., Vulcano, L. C., Ribeiro, S. M., Hette, K., Giordano, T., Doiche, D. P., Amorim, R. L., Survey radiography and computerized tomography imaging of the thorax in female dogs with mammary tumors. *Acta Vet Scand*, 2010. 52: p. 20.

77. Brassart, G., Les tumeurs mammaires chez la chienne: donnes bibliographiques recents concernant l'approche diagnostique et la proposition d'un pronostic fiable. , 2008, Université Claude-Bernard-Lyon.

78. Brodey RS., G.M., Roszel JR. , Canine mammary gland neoplasms. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 1983. 19: p. 61-90.

79. Gilbertson, S.R., Kurzman, I. D., Zachrau, R. E., Hurvitz, A. I., Black, M. M., Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics

assessed in 232 dogs. *Vet Pathol*, 1983. 20(2): p. 127-42.

80. Aaltomaa, S., Lipponen, P., Eskelinen, M., Kosma, V. M., Mari, S., Alhava, E., Syrjanen, K., Histological assessment of the prognostic factors in female breast cancer. *Oncology*, 1992. 49(1): p. 1-8.

81. Sontasa, B.H., Ozyogurtcu, H., Gurel, A., Ekici, H., Evaluation of clinical and pathological characteristics of 155 canines with mammary tumors: a retrospective study. *Arch Med Vet*, 2009. 41: p. 53-59.

82. Shafiee, R., Javanbakht, J., Atyabi, N., Bahrami, A., Kheradmand, D., Safaei, R., Khadivar, F., Hosseini, E., Diagnosis, classification and grading of canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: an Clinico-Cytohistopathological study with environmental factors influencing public health and medicine. *Cancer Cell Int*, 2013. 13: p. 79.

83. Ferguson, H.R., Canine mammary gland tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 1985. 15(3): p. 501-11.

84. MacEwen, E.G., Harvey, H. J., Patnaik, A. K., Mooney, S., Hayes, A., Kurzman, I., Hardy, W. D., Jr., Evaluation of effects of levamisole and surgery on canine mammary cancer. *J Biol Response Mod*, 1985. 4(4): p. 418-26.

85. Stratmann, N., Failing, K., Richter, A., Wehrend, A., Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy. *Vet Surg*, 2008. 37(1): p. 82-6.

86. Straw, R.C., treatment of mammary gland tumors and perineal neoplasia., in *The North American Veterinary Conference (NAVC)*.2005: Orlando, Florida.

87. Horta, R.S., Figueiredo, M. S., Lavallo, G. E., Costa, M. P., Cunha, R. M., Araujo, R. B., Surgical stress and postoperative complications related to regional and radical mastectomy in dogs. *Acta Vet Scand*, 2015. 57: p. 34.

88. Horta, R.S., Lavallo, G.E., Monteiro, R., Layara, L., Baracat, R., Dantas, G., Influence

of surgical technique influence on overall survival, disease free interval and new lesion development interval in dogs with mammary tumors. *Advances in Breast Cancer Research*, 2014. 3: p. 38-46.

89. Yamagami, T., Kobayashi, T., Takahashi, K., Sugiyama, M., Influence of ovariectomy at the time of mastectomy on the prognosis for canine malignant mammary tumours. *J Small Anim Pract*, 1996. 37(10): p. 462-4.

90. Novosad, C.A., Principles of treatment for mammary gland tumors. *Clin Tech Small Anim Pract*, 2003. 18(2): p. 107-9.

91. Lanore, D., Delprat, C., Quimioterapia anticancerosa. Masson2004: Lanore D., Delprat C. .

92. Karayannopoulou, M., Kaldrymidou, E., Constantinidis, T. C., Dessiris, A., Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 2001. 48(2): p. 85-96.

93. Clemente, M., De Andres, P. J., Pena, L., Perez-Alenza, M. D., Survival time of dogs with inflammatory mammary cancer treated with palliative therapy alone or palliative therapy plus chemotherapy. *Vet Rec*, 2009. 165(3): p. 78-81.

94. Sorenmo, K., Canine mammary gland tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 2003. 33(3): p. 573-96.

95. Klijn, J.G., B. Setyono-Han, and J.A. Foekens, Progesterone antagonists and progesterone receptor modulators in the treatment of breast cancer. *Steroids*, 2000. 65(10-11): p. 825-30.

96. Guil-Luna, S., Sanchez-Cespedes, R., Millan, Y., De Andres, F. J., Rollon, E., Domingo, V., Guscetti, F., Martin de Las Mulas, J., Aglepristone decreases proliferation in progesterone receptor-positive canine mammary carcinomas. *J Vet Intern Med*, 2011. 25(3): p. 518-23.

97. Dore, M., I. Lanthier, and J. Sirois, Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. *Vet Pathol*, 2003. 40(2): p. 207-12.

98. Millanta, F., Citi, S., Della Santa, D., Porciani, M., Poli, A., COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Breast Cancer Res Treat*, 2006. 98(1): p. 115-20.

99. Queiroga, F.L., Alves, A., Pires, I., Lopes, C., Expression of Cox-1 and Cox-2 in canine mammary tumours. *J Comp Pathol*, 2007. 136(2-3): p. 177-85.

100. Queiroga, F.L., Pires, I., Lobo, L., Lopes, C. S., The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. *Res Vet Sci*, 2010. 88(3): p. 441-5.

101. de, M. Souza C. H., Toledo-Piza, E., Amorin, R., Barboza, A., Tobias, K. M., Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment. *Can Vet J*, 2009. 50(5): p. 506-10.

102. Martin, P.M., Cotard, M., Mialot, J. P., Andre, F., Raynaud, J. P., Animal models for hormone-dependent human breast cancer. Relationship between steroid receptor profiles in canine and feline mammary tumors and survival rate. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1984. 12(1): p. 13-7.

103. Hellmen, E., Bergstrom, R., Holmberg, L., Spangberg, I. B., Hansson, K., Lindgren, A., Comparison of histology and clinical variables to DNA ploidy in canine mammary tumors. *Vet Pathol*, 1988. 25(3): p. 219-26.

104. Parodi, A.L., Misdorp, W., Mialot, J. P., Mialot, M., Hart, A. A., Hurtrel, M., Salomon, J. C., Intratumoral BCG and *Corynebacterium parvum* therapy of canine mammary tumours before radical mastectomy. *Cancer Immunol Immunother*, 1983. 15(3): p. 172-7.

105. Kurzman, I.D. and S.R. Gilbertson, Prognostic factors in canine mammary tumors. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)*, 1986. 1(1): p. 25-32.

106. Philibert, J.C., Snyder, P. W., Glickman, N., Glickman, L. T., Knapp, D. W., Waters, D. J., Influence of host factors on survival in dogs

with malignant mammary gland tumors. *J Vet Intern Med*, 2003. 17(1): p. 102-6.

107. Bostock, D.E., The prognosis following the surgical excision of canine mammary neoplasms. *Eur J Cancer*, 1975. 11(6): p. 389-96.

108. Moulton, J.E., L.S. Rosenblatt, and M. Goldman, Mammary tumors in a colony of beagle dogs. *Vet Pathol*, 1986. 23(6): p. 741-9.

109. Taylor, G.N., Shabestari, L., Williams, J., Mays, C. W., Angus, W., McFarland, S., Mammary neoplasia in a closed beagle colony. *Cancer Res*, 1976. 36(8): p. 2740-3.

110. Schneider, R., C.R. Dorn, and D.O. Taylor, Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J Natl Cancer Inst*, 1969. 43(6): p. 1249-61.

111. Else, R.W. and D. Hannant, Some epidemiological aspects of mammary neoplasia in the bitch. *Vet Rec*, 1979. 104(14): p. 296-304.

112. Sorenmo, K.U., Rasotto, R., Zappulli, V., Goldschmidt, M. H., Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Vet Pathol*, 2011. 48(1): p. 85-97.

113. Owen, L.N., Classification of tumors in domestic animals., W.H. Organization, Editor 1980: Geneva.

114. Rutteman GR, W.S., MacEwen EG, Tumors of the mammary gland, in *Small Animal Clinical Oncology*, M.E. Withrow SJ, Editor 2001, WB Saunders: Philadelphia. p. 455-477.

115. Misdorp, W., Else, R.W., Hellmen, E., Lipscomb, T.P., Histologic classification of mammary tumors of the dog and the cat. *Armed Force Institute of Pathology and World Health Organization*, 1999. 7.

116. Misdorp W., E.R.W., Hellmen E., Lipscomb T.P., Histologic Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat, A.F.I.o.P.a.W.H. Organization, Editor 1999, *Armed Force Institute of Pathology and World Health Organization*: Washington DC.

117. Estrela-Lima, A., Araujo, M. S.,

Costa-Neto, J. M., Teixeira-Carvalho, A., Barrouin-Melo, S. M., Cardoso, S. V., Martins-Filho, O. A., Serakides, R., Cassali, G. D., Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. *BMC Cancer*, 2010. 10: p. 256.

118. Coussens, L.M. and Z. Werb, Inflammatory cells and cancer: think different! *J Exp Med*, 2001. 193(6): p. F23-6.

119. Hung, K., Hayashi, R., Lafond-Walker, A., Lowenstein, C., Pardoll, D., Levitsky, H., The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med*, 1998. 188(12): p. 2357-68.

120. Carvalho, M.I., Pires, I., Dias, M., Prada, J., Gregorio, H., Lobo, L., Queiroga, F., Intratumoral CD3+ T-Lymphocytes Immunoexpression and Its Association with c-Kit, Angiogenesis, and Overall Survival in Malignant Canine Mammary Tumors. *Anal Cell Pathol (Amst)*, 2015. 2015: p. 920409.

121. Queiroga, F.L., Perez-Alenza, M. D., Silvan, G., Pena, L., Lopes, C., Illera, J. C., Cox-2 levels in canine mammary tumors, including inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological features and prognostic significance. *Anticancer Res*, 2005. 25(6B): p. 4269-75.

122. Heller, D.A., Clifford, C.A., Goldschmidt, M. H., Holt, D. E., Shofer, F. S., Smith, A., Sorenmo, K. U., Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma. *Vet Pathol*, 2005. 42(6): p. 776-80.

123. Ristimaki, A., Sivula, A., Lundin, J., Lundin, M., Salminen, T., Haglund, C., Joensuu, H., Isola, J., Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res*, 2002. 62(3): p. 632-5.

124. Ahern, T.E., Bird, R. C., Bird, A. E., Wolfe, L. G., Expression of the oncogene c-erbB-2 in canine mammary cancers and tumor-derived cell lines. *Am J Vet Res*, 1996. 57(5): p. 693-6.

125. Greenblatt, M.S., Bennett, W. P., Hollstein, M., Harris, C. C., Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, 1994. 54(18): p. 4855-78.
126. Briones F., C.M., Muñoz J., Venegas F., Araya N., El anticuerpo monoclonal Ki-67 como elemento de valor diagnóstico y pronóstico en neoplasias mamarias caninas. *Revista Chilena de Anatomía*, 2002. 20(2): p. 165-168.
127. Toniti, W., Buranasinsup, S., Kongcharoen, A., Charoonrut, P., Puchadapirom, P., Kasorndorkbua, C., Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptors in canine mammary tumors. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2009. 10(5): p. 907-11.
128. Zuccari, D.A., Santana, A. E., Cury, P. M., Cordeiro, J. A., Immunocytochemical study of Ki-67 as a prognostic marker in canine mammary neoplasia. *Vet Clin Pathol*, 2004. 33(1): p. 23-8.
129. Rosciani, A.S., Merlo, W.A., Guaimas, L.E., Baez, A., Lopez, J.E., Maccio, O.A., Graduación nuclear y determinación de regiones organizadoras de nucléolos en muestras citológicas de tumores mamarios caninos. *Revista Veterinaria*, 2005. 16(2): p. 65-68.
130. Bostock, D.E., J. Moriarty, and J. Crocker, Correlation between histologic diagnosis mean nucleolar organizer region count and prognosis in canine mammary tumors. *Vet Pathol*, 1992. 29(5): p. 381-5.
131. Bratulic, M., Grabarevic, Z., Artukovic, B., Capak, D., Number of nucleoli and nucleolar organizer regions per nucleus and nucleolus--prognostic value in canine mammary tumors. *Vet Pathol*, 1996. 33(5): p. 527-32.
132. Perez Alenza, M.D., Rutteman, G. R., Kuipers-Dijkshoorn, N. J., Pena, L., Montoya, A., Misdorp, W., Cornelisse, C. J., DNA flow cytometry of canine mammary tumours: the relationship of DNA ploidy and S-phase fraction to clinical and histological features. *Res Vet Sci*, 1995. 58(3): p. 238-43.
133. Bravo, R., Frank, R., Blundell, P. A., Macdonald-Bravo, H., Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature*, 1987. 326(6112): p. 515-7.
134. Lohr, C.V., Teifke, J. P., Failing, K., Weiss, E., 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*, 1997. 34(3): p. 212-21.
135. Funakoshi, Y., Nakayama, H., Uetsuka, K., Nishimura, R., Sasaki, N., Doi, K., Cellular proliferative and telomerase activity in canine mammary gland tumors. *Vet Pathol*, 2000. 37(2): p. 177-83.
136. MacEwen, E.G., Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment. *Cancer Metastasis Rev*, 1990. 9(2): p. 125-36.
137. Martin de las Mulas, J., Ordas, J., Millan, M. Y., Chacon, F., De Lara, M., Espinosa de los Monteros, A., Reymundo, C., Jover, A., Immunohistochemical expression of estrogen receptor beta in normal and tumoral canine mammary glands. *Vet Pathol*, 2004. 41(3): p. 269-72.
138. Rutteman, G.R., Kirpensteijn, J., Tumours of the mammary glands. 2003: p. 235-242.
139. Brosens, J.J., Tullet, J., Varshochi, R., Lam, E. W., Steroid receptor action. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2004. 18(2): p. 265-83.
140. Allred, D.C., Carlson, R. W., Berry, D. A., Burstein, H. J., Edge, S. B., Goldstein, L. J., Gown, A., Hammond, M. E. y col. NCCN Task Force Report: Estrogen Receptor and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer by Immunohistochemistry. *J Natl Compr Canc Netw*, 2009. 7 Suppl 6: p. S1-S21; quiz S22-3.
141. Nieto, A., Pena, L., Perez-Alenza, M. D., Sanchez, M. A., Flores, J. M., Castano, M., Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet Pathol*, 2000. 37(3): p. 239-47.
142. Snead, D.R., Bell JA, Dixon AR, Nicholson RI, Elston CW, Blamey RW, Ellis IO.,

Methodology of immunohistological detection of oestrogen receptor in human breast carcinoma in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue: a comparison with frozen section methodology. *Histopathology*, 1993. 23(3): p. 233-8.

143. MacEwen, E.G., Patnaik AK, Harvey HJ, Panko WB., Estrogen receptors in canine mammary tumors. *Cancer Res*, 1982. 42(6): p. 2255-9.

144. Boldizsar, H., Muray T, Számel I, Szenci O, Csenki J., Studies on canine mammary tumours. II. Oestradiol and progesterone receptor binding capacity and histological type. *Acta Vet Hung*, 1992. 40(1-2): p. 89-97.

145. Donnay, I., Rauis, J., Wouters-Ballman, P., Devleeschouwer, N., Leclercq, G., Verstegen, J. P., Receptors for oestrogen, progesterone and epidermal growth factor in normal and tumorous canine mammary tissues. *J Reprod Fertil Suppl*, 1993. 47: p. 501-12.

146. Donnay, I., Rauis, J., Devleeschouwer, N., Wouters-Ballman, P., Leclercq, G., Verstegen, J., Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. *Am J Vet Res*, 1995. 56(9): p. 1188-94.

147. Donnay, I., Wouters-Ballman P, Devleeschouwer N, Leclercq G, Verstegen J., Changes in oestrogen, progesterone and epidermal growth factor receptor concentrations and affinities during the oestrous cycle in the normal mammary gland and uterus of dogs. *Vet Res Commun*, 1995. 19(2): p. 101-13.

148. Selman, P.J., J. Wolfswinkel, and J.A. Mol, Binding specificity of medroxyprogesterone acetate and proligestone for the progesterone and glucocorticoid receptor in the dog. *Steroids*, 1996. 61(3): p. 133-7.

149. Graham, J.C., D.A. O'Keefe, and H.B. Gelberg, Immunohistochemical assay for detecting estrogen receptors in canine mammary tumors. *Am J Vet Res*, 1999. 60(5): p. 627-30.

150. de Las Mulas, J.M., Y. Millan, and R. Dios, A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen

receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Vet Pathol*, 2005. 42(2): p. 200-12.

151. Jambhekar, N.A., A.C. Chaturvedi, and B.P. Madur, Immunohistochemistry in surgical pathology practice: a current perspective of a simple, powerful, yet complex, tool. *Indian J Pathol Microbiol*, 2008. 51(1): p. 2-11.

152. Lantinga-van Leeuwen, I.S., van Garderen E, Rutteman GR, Mol JA., Cloning and cellular localization of the canine progesterone receptor: co-localization with growth hormone in the mammary gland. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2000. 75(4-5): p. 219-28.

153. Sobczak-Filipiak, M. and E. Malicka, Estrogen receptors in canine mammary gland tumours. *Pol J Vet Sci*, 2002. 5(1): p. 1-5.

154. Pena, L., Perez-Alenza MD, Rodriguez-Bertos A, Nieto A., Canine inflammatory mammary carcinoma: histopathology, immunohistochemistry and clinical implications of 21 cases. *Breast Cancer Res Treat*, 2003. 78(2): p. 141-8.

155. Millanta, F., Calandrella, M., Bari, G., Niccolini, M., Vannozzi, I., Poli, A., Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Res Vet Sci*, 2005. 79(3): p. 225-32.

156. Illera, J.C., Pérez-Alenza MD, Nieto A, Jiménez MA, Silvan G, Dunner S, Peña L., Steroids and receptors in canine mammary cancer. *Steroids*, 2006. 71(7): p. 541-8.

157. Kumaraguruparan, R., D. Prathiba, and S. Nagini, Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. *Res Vet Sci*, 2006. 81(2): p. 218-24.

158. Yang, W.Y., Liu CH, Chang CJ, Lee CC, Chang KJ, Lin CT., Proliferative activity, apoptosis and expression of oestrogen receptor and Bcl-2 oncoprotein in canine mammary gland tumours. *J Comp Pathol*, 2006. 134(1): p. 70-9.

159. Thuroczy, J., Reisvaag GJ, Perge E, Tibold A, Szilágyi J, Balogh L., Immunohistochemical detection of progesterone and cellular proliferation in canine mammary tumours. *J Comp Pathol*, 2007. 137(2-3): p. 122-9.
160. Sanchez-Archidona, A.R., Jiménez MA, Pérez-Alenza D, Silván G, Illera JC, Peña L, Dunner S., Steroid pathway and oestrone sulphate production in canine inflammatory mammary carcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007. 104(3-5): p. 93-9.
161. Morris, J.S., Nixon C, King OJ, Morgan IM, Philbey AW., Expression of TopBP1 in canine mammary neoplasia in relation to histological type, Ki67, ERalpha and p53. *Vet J*, 2009. 179(3): p. 422-9.
162. Manee-in S., S.S., Lohachit C. and Sirivaidyapong S., The number of ER α and PR in the mammary glands of bitches with and without tumor mass using immunohistochemical assay. *Comparative Clinical Pathology*, 2009. 18(3): p. 221-227.
163. Hermo G., S.R., Wargon V., Scursoni A., Lanari C., Gobello C., Immunohistochemistry and expression of estrogen and progesterone receptors in canine malignant mammary tumors in different clinical stages. *Revista Científica FCV-LUZ*, 2010. 20(3): p. 245-253.
164. Qureshi, A. and S. Pervez, Allred scoring for ER reporting and its impact in clearly distinguishing ER negative from ER positive breast cancers. *J Pak Med Assoc*, 2010. 60(5): p. 350-3.
165. McClelland, R.A., Finlay P, Walker KJ, Nicholson D, Robertson JF, Blamey RW, Nicholson RI., Automated quantitation of immunocytochemically localized estrogen receptors in human breast cancer. *Cancer Res*, 1990. 50(12): p. 3545-50.
166. Lee, H., A G Douglas-Jones, J M Morgan, and B Jasani, The effect of fixation and processing on the sensitivity of oestrogen receptor assay by immunohistochemistry in breast carcinoma. *J Clin Pathol*, 2002. 55(3): p. 236-8.
167. Collins, L.C., M.L. Botero, and S.J. Schnitt, Bimodal frequency distribution of estrogen receptor immunohistochemical staining results in breast cancer: an analysis of 825 cases. *Am J Clin Pathol*, 2005. 123(1): p. 16-20.
168. Allred, D.C., Harvey JM, Berardo M, Clark GM., Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*, 1998. 11(2): p. 155-68.
169. Harvey, J.M., Clark GM, Osborne CK, Allred DC., Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol*, 1999. 17(5): p. 1474-81.
170. Andersen, J., T. Orntoft, and H.S. Poulsen, Semiquantitative oestrogen receptor assay in formalin-fixed paraffin sections of human breast cancer tissue using monoclonal antibodies. *Br J Cancer*, 1986. 53(5): p. 691-4.
171. Barnes, D.M., Millis RR, Beex LV, Thorpe SM, Leake RE., Increased use of immunohistochemistry for oestrogen receptor measurement in mammary carcinoma: the need for quality assurance. *Eur J Cancer*, 1998. 34(11): p. 1677-82.
172. Kolar, Z., J. Ehrmann, Jr., and M. Duskova, Immunohistochemical analysis of the functional status of estrogen receptor cascade in breast cancer. *Neoplasma*, 1998. 45(2): p. 83-7.
173. McGuire, W.L., Steroid receptors in human breast cancer. *Cancer Res*, 1978. 38(11 Pt 2): p. 4289-91.
174. Pena, L., Gama A, Goldschmidt MH, Abadie J, Benazzi C, Castagnaro M, Díez L, Gärtner F, Hellmén E, Kiupel M, Millán Y, Miller MA, Nguyen F, Poli A, Sarli G, Zappulli V, de las Mulas JM., Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. *Vet Pathol*, 2014. 51(1): p. 127-45.
175. Wolff, A.C., Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett

- M, Fitzgibbons PL, y col., American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol*, 2007. 25(1): p. 118-45.
176. Hamilton, J.M., R.W. Else, and P. Forshaw, Oestrogen receptors in canine mammary tumours. *Vet Rec*, 1977. 101(13): p. 258-60.
177. Inaba, T., Buranasinsup S, Kongcharoen A, Charoonrut P, Puchadapirom P, Kasorndorkbua C., Estrogen and progesterone receptors and progesterone metabolism in canine mammary tumours. *Nippon Juigaku Zasshi*, 1984. 46(6): p. 797-803.
178. Geraldles, M., F. Gartner, and F. Schmitt, Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. *Vet Rec*, 2000. 146(14): p. 403-6.
179. Gerdes, J., Pickartz H, Brotherton J, Hammerstein J, Weitzel H, Stein H., Growth fractions and estrogen receptors in human breast cancers as determined in situ with monoclonal antibodies. *Am J Pathol*, 1987. 129(3): p. 486-92.
180. Hurlimann, J., S. Gebhard, and F. Gomez, Oestrogen receptor, progesterone receptor, pS2, ERD5, HSP27 and cathepsin D in invasive ductal breast carcinomas. *Histopathology*, 1993. 23(3): p. 239-48.
181. Railo, M., et al., Prognostic value of Ki-67 immunolabelling in primary operable breast cancer. *Br J Cancer*, 1993. 68(3): p. 579-83.
182. Rudas, M., Gnant MF, Mittlböck M, Neumayer R, Kummer A, Jakesz R, Reiner G, Reiner A., Thymidine labeling index and Ki-67 growth fraction in breast cancer: comparison and correlation with prognosis. *Breast Cancer Res Treat*, 1994. 32(2): p. 165-75.
183. Pichon, M.F., Claude Pallud, Maurice Brunet, and Edwin Milgrom, Relationship of presence of progesterone receptors to prognosis in early breast cancer. *Cancer Res*, 1980. 40(9): p. 3357-60.
184. Cooke, T., George D, Shields R, Maynard P, Griffiths K., Oestrogen receptors and prognosis in early breast cancer. *Lancet*, 1979. 1(8124): p. 995-7.
185. Fisher, E.R., R. Sass, and B. Fisher, Pathologic findings from the national surgical adjuvant breast project. Correlations with concordant and discordant estrogen and progesterone receptors. *Cancer*, 1987. 59(9): p. 1554-9.
186. Robertson, J.F., K. Bates, D. Pearson, R. W. Blamey, and R. I. Nicholson, Comparison of two oestrogen receptor assays in the prediction of the clinical course of patients with advanced breast cancer. *Br J Cancer*, 1992. 65(5): p. 727-30.
187. Withrow, S.J., MacEwan, E.G., *Small Animal Clinical Oncology* fourth edition. 2001: p. 242 - 263.
188. Manning, G., Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S., The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 2002. 298(5600): p. 1912-34.
189. Hanks, S.K. and T. Hunter, Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J*, 1995. 9(8): p. 576-96.
190. van der Geer, P., T. Hunter, and R.A. Lindberg, Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol*, 1994. 10: p. 251-337.
191. Kostich, M., English J, Madison V, Gheyas F, Wang L, Qiu P, Greene J, Laz TM., Human members of the eukaryotic protein kinase family. *Genome Biol*, 2002. 3(9): p. RESEARCH0043.
192. Hubbard, S.R. and J.H. Till, Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem*, 2000. 69: p. 373-98.
193. Huse, M. and J. Kuriyan, The conformational plasticity of protein kinases. *Cell*, 2002. 109(3): p. 275-82.

194. Zwick, E., J. Bange, and A. Ullrich, Receptor tyrosine kinases as targets for anticancer drugs. *Trends Mol Med*, 2002. 8(1): p. 17-23.
195. Marmor, M.D., K.B. Skaria, and Y. Yarden, Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004. 58(3): p. 903-13.
196. Fischer, O.M., Hart S, Gschwind A, Ullrich A., EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochem Soc Trans*, 2003. 31(Pt 6): p. 1203-8.
197. Gschwind, A., O.M. Fischer, and A. Ullrich, The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2004. 4(5): p. 361-70.
198. Gutierrez, J., Biological therapies in cancer: a new era in oncology. *Medwave*, 2009. 9(5).
199. Murua Escobar, H., Becker K, Bullerdiek J, Nolte I., The canine ERBB2 gene maps to a chromosome region frequently affected by aberrations in tumors of the dog (*Canis familiaris*). *Cytogenet Cell Genet*, 2001. 94(3-4): p. 194-5.
200. Bargmann, C.I., M.C. Hung, and R.A. Weinberg, The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature*, 1986. 319(6050): p. 226-30.
201. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. 2(2): p. 127-37.
202. Burgess, A.W., Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, y col., An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell*, 2003. 12(3): p. 541-52.
203. Neve, R.M., Sutterlüty H, Pullen N, Lane HA, Daly JM, Krek W, Hynes NE., Effects of oncogenic ErbB2 on G1 cell cycle regulators in breast tumour cells. *Oncogene*, 2000. 19(13): p. 1647-56.
204. Roskoski, R., Jr., The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 319(1): p. 1-11.
205. Harari, D. and Y. Yarden, Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene*, 2000. 19(53): p. 6102-14.
206. Nair, P., Epidermal growth factor receptor family and its role in cancer progression. *Current Science*, 2005. 88(6): p. 890-898.
207. Slamon, D.J., Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, y col., Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*, 2001. 344(11): p. 783-92.
208. Delacroix, L., Begon D, Chatel G, Jackers P, Winkler R., Distal ERBB2 promoter fragment displays specific transcriptional and nuclear binding activities in ERBB2 overexpressing breast cancer cells. *DNA Cell Biol*, 2005. 24(9): p. 582-94.
209. Hammock, L., Lewis M, Phillips C, Cohen C., Strong HER-2/neu protein overexpression by immunohistochemistry often does not predict oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization. *Hum Pathol*, 2003. 34(10): p. 1043-7.
210. Jimenez, R.E., Wallis T, Tabaszka P, Visscher DW., Determination of Her-2/Neu status in breast carcinoma: comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol*, 2000. 13(1): p. 37-45.
211. Menard, S., Casalini P, Campiglio M, Pupa S, Agresti R, Tagliabue E., HER2 overexpression in various tumor types, focussing on its relationship to the development of invasive breast cancer. *Ann Oncol*, 2001. 12 Suppl 1: p. S15-9.
212. Merkelbach-Bruse, S., Wardelmann E, Behrens P, Losen I, Buettner R, Friedrichs N., Current diagnostic methods of HER-2/neu detection in breast cancer with special regard to real-time PCR. *Am J Surg Pathol*, 2003. 27(12): p. 1565-70.
213. Owens, M.A., B.C. Horten, and M.M. Da Silva, HER2 amplification ratios by fluorescence

in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clin Breast Cancer*, 2004. 5(1): p. 63-9.

214. Pauletti, G., Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Seshadri R, Slamon DJ., Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol*, 2000. 18(21): p. 3651-64.

215. Delacroix, L., Vernimmen, D., Begon, D., Jackers, P., Winkler, R., Mechanisms responsible for ERBB2 gene overexpression in human breast and non-breast cancer cells. The role of AP-2 transcriptions factors. *Cancer Therapy*, 2005. 3(issue B): p. 365-378.

216. Bankfalvi, A., Simon R, Brandt B, Bürger H, Vollmer I, Dockhorn-Dworniczak B, Lellé RJ, Boecker W., Comparative methodological analysis of erbB-2/HER-2 gene dosage, chromosomal copy number and protein overexpression in breast carcinoma tissues for diagnostic use. *Histopathology*, 2000. 37(5): p. 411-9.

217. Zhao, J., Wu R, Au A, Marquez A, Yu Y, Shi Z., Determination of HER2 gene amplification by chromogenic in situ hybridization (CISH) in archival breast carcinoma. *Mod Pathol*, 2002. 15(6): p. 657-65.

218. Hanna, W.M., Kahn HJ, Pienkowska M, Blondal J, Seth A, Marks A., Defining a test for HER-2/neu evaluation in breast cancer in the diagnostic setting. *Mod Pathol*, 2001. 14(7): p. 677-85.

219. Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G. et al. , Human breast cancer: correlation with relapse and survival with amplification of the Her-2/neu oncogen. *The Oncologist*, 1987. 3: p. 237-252.

220. Berger, M.S., Locher GW, Saurer S, Gullick WJ, Waterfield MD, Groner B, Hynes NE., Correlation of c-erbB-2 gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. *Cancer Res*, 1988. 48(5): p. 1238-43.

221. Van de Vijver, M.J., Peterse J.L., Mooi, W.J., Wisman P., Lomans J., Dalesio, O., Nusse, R., Neu-Protein Overexpression in Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine* 1988(319): p. 1239-1245.

222. Heintz, N.H., Leslie KO, Rogers LA, Howard PL, Amplification of the c-erb B-2 oncogene and prognosis of breast adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab Med*, 1990. 114(2): p. 160-3.

223. Battifora, H., Gaffey M, Esteban J, Mehta P, Bailey A, Faucett C, Niland J., Immunohistochemical assay of neu/c-erbB-2 oncogene product in paraffin-embedded tissues in early breast cancer: retrospective follow-up study of 245 stage I and II cases. *Mod Pathol*, 1991. 4(4): p. 466-74.

224. Marks, J.R., P A Humphrey, K Wu, D Berry, N Bandarenko, B J Kerns, and J D Iglehart, Overexpression of p53 and HER-2/neu proteins as prognostic markers in early stage breast cancer. *Ann Surg*, 1994. 219(4): p. 332-41.

225. Quenel, N., Wafflart J, Bonichon F, de Mascarel I, Trojani M, Durand M, Avril A, Coindre JM., The prognostic value of c-erbB2 in primary breast carcinomas: a study on 942 cases. *Breast Cancer Res Treat*, 1995. 35(3): p. 283-91.

226. Charpin, C., Garcia S, Bouvier C, Martini F, Lavaut MN, Allasia C, Bonnier P, Andrac L., c-erbB-2 oncoprotein detected by automated quantitative immunocytochemistry in breast carcinomas correlates with patients' overall and disease-free survival. *Br J Cancer*, 1997. 75(11): p. 1667-73.

227. Press, M.F., Bernstein L, Thomas PA, Meisner LF, Zhou JY, Ma Y, Hung G, Robinson RA., HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol*, 1997. 15(8): p. 2894-904.

228. Muss, H.B., Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET, Koerner F, Cirincione CT, Budman DR, Wood WC, Barcos M, et al., c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med*,

1994. 330(18): p. 1260-6.

229. O'Malley, F.P., Saad Z, Kerkvliet N, Doig G, Stitt L, Ainsworth P, Hundal H, Chambers AF, Turnbull DI, Bramwell V., The predictive power of semiquantitative immunohistochemical assessment of p53 and c-erb B-2 in lymph node-negative breast cancer. *Hum Pathol*, 1996. 27(9): p. 955-63.

230. Dittadi, R., Brazzale A, Pappagallo G, Salbe C, Nascimben O, Rosabian A, Gion M.

, ErbB2 assay in breast cancer: possibly improved clinical information using a quantitative method. *Anticancer Res*, 1997. 17(2B): p. 1245-7.

231. Eissa, S., Khalifa A, el-Gharib A, Salah N, Mohamed MK., Multivariate analysis of DNA ploidy, p53, c-erbB-2 proteins, EGFR, and steroid hormone receptors for short-term prognosis in breast cancer. *Anticancer Res*, 1997. 17(4B): p. 3091-7.

232. Descotes, F., J.J. Pavy, and G.L. Adessi, Human breast cancer: correlation study between HER-2/neu amplification and prognostic factors in an unselected population. *Anticancer Res*, 1993. 13(1): p. 119-24.

233. Shah, S., Chen, B., Testing for HER2 in Breast Cancer: A Continuing Evolution. *Pathology Research International*, 2011. 2011: p. 1-16.

234. Pegram, M.D., G. Pauletti, and D.J. Slamon, HER-2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy. *Breast Cancer Res Treat*, 1998. 52(1-3): p. 65-77.

235. Meijnen, P., Peterse JL, Antonini N, Rutgers EJ, van de Vijver MJ., Immunohistochemical categorisation of ductal carcinoma in situ of the breast. *Br J Cancer*, 2008. 98(1): p. 137-42.

236. Stomper, P.C. and J.L. Connolly, Ductal carcinoma in situ of the breast: correlation between mammographic calcification and tumor subtype. *AJR Am J Roentgenol*, 1992. 159(3): p. 483-5.

237. Pauletti, G., Godolphin W, Press MF, Slamon DJ., Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast

cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene*, 1996. 13(1): p. 63-72.

238. Sauter, G., Feichter G, Torhorst J, Moch H, Novotna H, Wagner U, Dürmüller U, Waldman FM., Fluorescence in situ hybridization for detecting erbB-2 amplification in breast tumor fine needle aspiration biopsies. *Acta Cytol*, 1996. 40(2): p. 164-73.

239. Xing, W.R., Gilchrist KW, Harris CP, Samson W, Meisner LF., FISH detection of HER-2/neu oncogene amplification in early onset breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 1996. 39(2): p. 203-12.

240. Saez, A., Andreu FJ, Seguí MA, Baré ML, Fernández S, Dinarés C, Rey M., HER-2 gene amplification by chromogenic in situ hybridisation (CISH) compared with fluorescence in situ hybridisation (FISH) in breast cancer-A study of two hundred cases. *Breast*, 2006. 15(4): p. 519-27.

241. Reed, W., Hannisdal E, Boehler PJ, Gundersen S, Host H, Marthin J., The prognostic value of p53 and c-erb B-2 immunostaining is overrated for patients with lymph node negative breast carcinoma: a multivariate analysis of prognostic factors in 613 patients with a follow-up of 14-30 years. *Cancer*, 2000. 88(4): p. 804-13.

242. Dolan, M. and D. Snover, Comparison of immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization assessment of HER-2 status in routine practice. *Am J Clin Pathol*, 2005. 123(5): p. 766-70.

243. Lan, C., Liu JM, Liu TW, Hsu DH, Liang S, Chen JR, Peng JW., erb-b2 amplification by fluorescence in situ hybridization in breast cancer specimens read as 2+ in immunohistochemical analysis. *Am J Clin Pathol*, 2005. 124(1): p. 97-102.

244. Kuo, S.J., Wang BB, Chang CS, Chen TH, Yeh KT, Lee DJ, Yin PL, Chen M., Comparison of immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization assessment for HER-2/neu status in Taiwanese breast cancer patients. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2007. 46(2): p. 146-51.

245. Lal, P., Salazar PA, Ladanyi M, Chen B., Impact of polysomy 17 on HER-2/neu immunohistochemistry in breast carcinomas without HER-2/neu gene amplification. *J Mol Diagn*, 2003. 5(3): p. 155-9.
246. Varshney, D., Zhou YY, Geller SA, Alsabeh R., Determination of HER-2 status and chromosome 17 polysomy in breast carcinomas comparing HercepTest and PathVysion FISH assay. *Am J Clin Pathol*, 2004. 121(1): p. 70-7.
247. Shah, S.S., Wang Y, Tull J, Zhang S., Effect of high copy number of HER2 associated with polysomy 17 on HER2 protein expression in invasive breast carcinoma. *Diagn Mol Pathol*, 2009. 18(1): p. 30-3.
248. Siegel, P.M., D L Dankort, W R Hardy, and W J Muller, Novel activating mutations in the neu proto-oncogene involved in induction of mammary tumors. *Mol Cell Biol*, 1994. 14(11): p. 7068-77.
249. Papewalis, J., A. Nikitin, and M.F. Rajewsky, G to A polymorphism at amino acid codon 655 of the human erbB-2/HER2 gene. *Nucleic Acids Res*, 1991. 19(19): p. 5452.
250. Hsu, W.L., Huang HM, Liao JW, Wong ML, Chang SC., Increased survival in dogs with malignant mammary tumours overexpressing HER-2 protein and detection of a silent single nucleotide polymorphism in the canine HER-2 gene. *Vet J*, 2009. 180(1): p. 116-23.
251. Press, M.F., Hung G, Godolphin W, Slamon DJ., Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res*, 1994. 54(10): p. 2771-7.
252. Penault-Llorca, F., Adelaïde J, Houvenaeghel G, Hassoun J, Birnbaum D, Jacquemier J., Optimization of immunohistochemical detection of ERBB2 in human breast cancer: impact of fixation. *J Pathol*, 1994. 173(1): p. 65-75.
253. Kay, E.W., Walsh CJ, Cassidy M, Curran B, Leader M., C-erbB-2 immunostaining: problems with interpretation. *J Clin Pathol*, 1994. 47(9): p. 816-22.
254. Jacobs, T.W., Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ., HER-2/neu protein expression in breast cancer evaluated by immunohistochemistry. A study of interlaboratory agreement. *Am J Clin Pathol*, 2000. 113(2): p. 251-8.
255. Thor, A.D., Berry DA, Budman DR, Muss HB, Kute T, Henderson IC, Barcos M, Cirincione C, y col. erbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1998. 90(18): p. 1346-60.
256. Paik, S., Bryant J, Park C, Fisher B, Tan-Chiu E, Hyams D, Fisher ER, y col. erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1998. 90(18): p. 1361-70.
257. Gouvea, A.P., Milanezi F, Olson SJ, Leitao D, Schmitt FC, Gobbi H., Selecting antibodies to detect HER2 overexpression by immunohistochemistry in invasive mammary carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2006. 14(1): p. 103-8.
258. Kumar, P.K., R.; Pawaiya, R. V. S.; Reddy, G. B. M.; Maiti, S. K., Expression pattern of c-erbB2 oncoprotein in canine mammary tumours. *Indian Journal of Veterinary Pathology*, 2009. 33(2): p. 125-129.
259. Nowak, M., Madej, J.A., Dziegiel, P., Correlation in the expression of HER-2 receptor and Ki-67 in mammary adenocarcinomas in bitches. *The Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 2005. 49(3): p. 337-342.
260. Ferreira, E., A. C. Bertagnolli, M. F. Cavalcanti, F. C. Schmitt and G. D. Cassali, The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Vet Comp Oncol*, 2009. 7(4): p. 230-5.
261. Kim, J.H., Im KS, Kim NH, Yhee JY, Nho WG, Sur JH., Expression of HER-2 and nuclear localization of HER-3 protein in canine mammary tumors: Histopathological and

immunohistochemical study. *Vet J*, 2010.

262. Antuofermo, E., Miller MA, Pirino S, Xie J, Badve S, Mohammed SI., Spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs--a model of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007. 16(11): p. 2247-56.

263. Gama, A., A. Alves, and F. Schmitt, Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Arch*, 2008. 453(2): p. 123-32.

264. Gama, A., Gärtner F, Alves A, Schmitt F., Immunohistochemical expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in canine mammary tissues. *Res Vet Sci*, 2009. 87(3): p. 432-7.

265. Slamon, D.J., Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, y col. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 1989. 244(4905): p. 707-12.

266. Di Fiore, P.P., Pierce JH, Kraus MH, Segatto O, King CR, Aaronson SA. erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science*, 1987. 237(4811): p. 178-82.

267. Slamon, D.J., Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 1987. 235(4785): p. 177-82.

268. Allred, D.C., Clark GM, Tandon AK, Molina R, Tormey DC, Osborne CK, Gilchrist KW. y col. HER-2/neu in node-negative breast cancer: prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma. *J Clin Oncol*, 1992. 10(4): p. 599-605.

269. Gusterson, B.A., Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Säve-Söderborgh J, Anbazhagan R, y col. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol*, 1992. 10(7): p. 1049-56.

270. Konecny, G., Pauletti G, Pegram M, Untch M, Dandekar S, Aguilar Z, Wilson C, y

col. Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2003. 95(2): p. 142-53.

271. Tiwari, R.K., Borgen PI, Wong GY, Cordon-Cardo C, Osborne MP. HER-2/neu amplification and overexpression in primary human breast cancer is associated with early metastasis. *Anticancer Res*, 1992. 12(2): p. 419-25.

272. Vaidyanathan, K., Kumar P, Reddy CO, Deshmane V, Somasundaram K, Mukherjee G. ErbB-2 expression and its association with other biological parameters of breast cancer among Indian women. *Indian J Cancer*, 2010. 47(1): p. 8-15.

273. Gullick, W.J., Love SB, Wright C, Barnes DM, Gusterson B, Harris AL, Altman DG. c-erbB-2 protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patients with involved and uninvolved lymph nodes. *Br J Cancer*, 1991. 63(3): p. 434-8.

274. Ivkovic-Kapicel, T., Knezevic-Usaj S, Djilas-Ivanovic D, Panjkovic M. Correlation of HER-2/neu protein overexpression with other prognostic and predictive factors in invasive ductal breast cancer. *In Vivo*, 2007. 21(4): p. 673-8.

275. Gusterson, B.A., Identification and interpretation of epidermal growth factor and c-erbB-2 overexpression. *Eur J Cancer*, 1992. 28(1): p. 263-7.

276. Jardines, L., Weiss M, Fowble B, Greene M. neu(c-erbB-2/HER2) and the epidermal growth factor receptor (EGFR) in breast cancer. *Pathobiology*, 1993. 61(5-6): p. 268-82.

277. McCann, A.H., Dervan PA, O'Regan M, Codd MB, Gullick WJ, Tobin BM, Carney DN. Prognostic significance of c-erbB-2 and estrogen receptor status in human breast cancer. *Cancer Res*, 1991. 51(12): p. 3296-303.

278. Matsuyama, S., Nakamura M, Yonezawa K, Shimada T, Ohashi F, Takamori Y, Kubo K. Expression patterns of the erbB subfamily mRNA in canine benign and malignant mammary

tumors. *J Vet Med Sci*, 2001. 63(9): p. 949-54.

279. Ross, J.S. and J.A. Fletcher, The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells*, 1998. 16(6): p. 413-28.

280. Sfacteria, A., Bertani C, Costantino G, Del Bue M, Paiardini M, Cervasi B, Piedimonte A, De Vico G. Cyclin D1 expression in pre-cancerous and cancerous lesions of the canine mammary gland. *J Comp Pathol*, 2003. 128(4): p. 245-51.

281. Revillion, F., J. Bonnetterre, and J.P. Peyrat, ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur J Cancer*, 1998. 34(6): p. 791-808.

282. Almasri, N.M. and M. Al Hamad, Immunohistochemical evaluation of human epidermal growth factor receptor 2 and estrogen and progesterone receptors in breast carcinoma in Jordan. *Breast Cancer Res*, 2005. 7(5): p. R598-604.

283. Rungsipipat, A., Tangkawattana, A., Sailasuta, A., Lohachit, C., Chariyalertsak, S., Expression of c-erbB-2 oncogene and p21WAF/CIP1 tumor suppressor gene as clinicopathological factors of canine mammary adenocarcinomas. Proceeding of the 11th International Symposium of the World Association of the Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology, 2003: p. 34-35.

284. Rungsipipat, A., Tateyama S, Yamaguchi R, Uchida K, Miyoshi N. Expression of c-yes oncogene product in various animal tissues and spontaneous canine tumours. *Res Vet Sci*, 1999. 66(3): p. 205-10.

285. Vinothini, G., R.S. Murugan, and S. Nagini, Evaluation of molecular markers in a rat model of mammary carcinogenesis. *Oncol Res*, 2009. 17(10): p. 483-93.

286. Nerurkar, V.R., Chitale AR, Jalnapurkar BV, Naik SN, Lalitha VS. Comparative pathology of canine mammary tumours. *J Comp Pathol*, 1989. 101(4): p. 389-97.

287. Houston, S.J., Plunkett TA, Barnes DM, Smith P, Rubens RD, Miles DW. Overexpression

of c-erbB2 is an independent marker of resistance to endocrine therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer*, 1999. 79(7-8): p. 1220-6.

288. Gago, F.E., M.A. Fanelli, and D.R. Ciocca, Co-expression of steroid hormone receptors (estrogen receptor alpha and/or progesterone receptors) and Her2/neu (c-erbB-2) in breast cancer: clinical outcome following tamoxifen-based adjuvant therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2006. 98(1): p. 36-40.

289. Berry, D.A., Muss HB, Thor AD, Dressler L, Liu ET, Broadwater G, Budman DR, Henderson IC, Barcos M, Hayes D, Norton L. HER-2/neu and p53 expression versus tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive, node-positive breast cancer. *J Clin Oncol*, 2000. 18(20): p. 3471-9.

290. Sui, W., Ou, M., Chen, J., Wan, Y., Peng, H., Qi, M., Huang, H., Dai, Y., Comparison of immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH) assessment for Her-2 status in breast cancer. *World Journal of Surgical Oncology*, 2009. 7(83).

291. Breen, M. and J.F. Modiano, Evolutionarily conserved cytogenetic changes in hematological malignancies of dogs and humans--man and his best friend share more than companionship. *Chromosome Res*, 2008. 16(1): p. 145-54.

292. Uva, P., Aurisicchio L, Watters J, Loboda A, Kulkarni A, Castle J, Palombo F. Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BMC Genomics*, 2009. 10: p. 135.

293. Peruzzi, D., Mesiti G, Ciliberto G, La Monica N, Aurisicchio L. Telomerase and HER-2/neu as targets of genetic cancer vaccines in dogs. *Vaccine*, 2010. 28(5): p. 1201-8.

294. Smith, W.L., D.L. DeWitt, and R.M. Garavito, Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*, 2000. 69: p. 145-82.

295. Vane, J.R., Y.S. Bakhle, and R.M. Botting, Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1998. 38: p. 97-120.

296. Vane, J.R., Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*, 1971. 231(25): p. 232-5.
297. Dubois, R.N., Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J*, 1998. 12(12): p. 1063-73.
298. Ueno, T., L.W. Chow, and M. Toi, Increases in circulating VEGF levels during COX-2 inhibitor treatment in breast cancer patients. *Biomed Pharmacother*, 2006. 60(6): p. 277-9.
299. O'Banion, M.K., V.D. Winn, and D.A. Young, cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89(11): p. 4888-92.
300. Masferrer, J.L., Zweifel BS, Seibert K, Needleman P. Selective regulation of cellular cyclooxygenase by dexamethasone and endotoxin in mice. *J Clin Invest*, 1990. 86(4): p. 1375-9.
301. Chandrasekharan, N.V., Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(21): p. 13926-31.
302. Kis, B., J.A. Snipes, and D.W. Busija, Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. 315(1): p. 1-7.
303. Kulinsky, V.I., Biochemical aspects of inflammation. *Biochemistry (Mosc)*, 2007. 72(6): p. 595-607.
304. Dennis, L.K., C.F. Lynch, and J.C. Torner, Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer. *Urology*, 2002. 60(1): p. 78-83.
305. Coussens, L.M. and Z. Werb, Inflammation and cancer. *Nature*, 2002. 420(6917): p. 860-7.
306. Hussain, S.P. and C.C. Harris, Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer*, 2007. 121(11): p. 2373-80.
307. Suganuma, M., Okabe S, Marino MW, Sakai A, Sueoka E, Fujiki H. Essential role of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in tumor promotion as revealed by TNF-alpha-deficient mice. *Cancer Res*, 1999. 59(18): p. 4516-8.
308. Cristofanon, S., Morceau F, Scovassi AI, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M. Oxidative, multistep activation of the noncanonical NF-kappaB pathway via disulfide Bcl-3/p50 complex. *FASEB J*, 2009. 23(1): p. 45-57.
309. D'Alessio, M., Cerella C, Amici C, Pesce C, Coppola S, Fanelli C, De Nicola M, Cristofanon S. y col. Glutathione depletion up-regulates Bcl-2 in BSO-resistant cells. *FASEB J*, 2004. 18(13): p. 1609-11.
310. Sobolewski, C., Cerella, C., Dicato, M., Ghibelli, L., Diederich, M. The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. *Int J Cell Biol*, 2010. 2010: p. 215158.
311. Wang, D. and R.N. DuBois, Cyclooxygenase 2-derived prostaglandin E2 regulates the angiogenic switch. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(2): p. 415-6.
312. Greenhough, A., Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, Kaidi A. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*, 2009. 30(3): p. 377-86.
313. Fulton, A.M., X. Ma, and N. Kundu, Targeting prostaglandin E EP receptors to inhibit metastasis. *Cancer Res*, 2006. 66(20): p. 9794-7.
314. Chang, S.H., Liu CH, Conway R, Han DK, Nithipatikom K, Trifan OC, Lane TF, Hla T. Role of prostaglandin E2-dependent angiogenic switch in cyclooxygenase 2-induced breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(2): p. 591-6.
315. Chang, S.H., Ai Y, Breyer RM, Lane TF, Hla T. The prostaglandin E2 receptor EP2 is required for cyclooxygenase 2-mediated mammary hyperplasia. *Cancer Res*, 2005.

65(11): p. 4496-9.

316. Amano, H., Hayashi I, Endo H, Kitasato H, Yamashina S, Maruyama T, Kobayashi M, Satoh K, y col. Host prostaglandin E(2)-EP3 signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *J Exp Med*, 2003. 197(2): p. 221-32.

317. Harris, S.G., Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol*, 2002. 23(3): p. 144-50.

318. Richards, J.A. and R.W. Brueggemeier, Prostaglandin E2 regulates aromatase activity and expression in human adipose stromal cells via two distinct receptor subtypes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. 88(6): p. 2810-6.

319. Rishikesh, M.K., Sadhana, S.S., Prostaglandins and cyclooxygenase: their probable role in cancer. *Indian Journal of Pharmacology*, 2003. 35: p. 3-12.

320. de Bittencourt Junior, P.I., et al., Evidence that prostaglandins modulate lipogenesis in cultured lymphocytes--a comparison with its effect on macrophages and tumour cells. *Biochem Mol Biol Int*, 1994. 33(3): p. 463-75.

321. Masferrer, J.L., A. Koki, and K. Seibert, COX-2 inhibitors. A new class of antiangiogenic agents. *Ann N Y Acad Sci*, 1999. 889: p. 84-6.

322. Spisni, E., F. Manica, and V. Tomasi, Involvement of prostanoids in the regulation of angiogenesis by polypeptide growth factors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1992. 47(2): p. 111-5.

323. Uefuji, K., T. Ichikura, and H. Mochizuki, Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer. *Clin Cancer Res*, 2000. 6(1): p. 135-8.

324. Chiarugi, V., L. Magnelli, and O. Gallo, Cox-2, iNOS and p53 as play-makers of tumor angiogenesis (review). *Int J Mol Med*, 1998. 2(6): p. 715-9.

325. Rodrigues, S., Nguyen QD, Faivre S, Bruyneel E, Thim L, Westley B, May F, Flatau G, Mareel M, Gespach C, Emami S. Activation

of cellular invasion by trefoil peptides and src is mediated by cyclooxygenase- and thromboxane A2 receptor-dependent signaling pathways. *FASEB J*, 2001. 15(9): p. 1517-28.

326. Sheng, H., Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res*, 1998. 58(2): p. 362-6.

327. Levy, G.N., Prostaglandin H synthases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and colon cancer. *FASEB J*, 1997. 11(4): p. 234-47.

328. Chan, T.A., Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(2): p. 681-6.

329. Cross, D.S., Platt JL, Juhn SK, Bach FH, Adams GL. Tumor infiltrating lymphocytes in squamous cell carcinoma of the head and neck: mechanisms of enhancement using prostaglandin synthetase inhibitors. *Adv Exp Med Biol*, 1997. 400B: p. 1013-24.

330. Fischer, S.M., Prostaglandins and cancer. *Front Biosci*, 1997. 2: p. d482-500.

331. Ribas, A., L.H. Butterfield, and J.S. Economou, Genetic immunotherapy for cancer. *Oncologist*, 2000. 5(2): p. 87-98.

332. Goodsell, D.S., The molecular perspective: cyclooxygenase-2. *Oncologist*, 2000. 5(2): p. 169-71.

333. Bennett, A., A.M. McDonald, I.F. Stamford, E.M. Charlier, J.S. Simpson, T. Zebro Prostaglandins and breast cancer. *Lancet*, 1977. 2(8039): p. 624-6.

334. Howe, L.R., Chang SH, Tolle KC, Dillon R, Young LJ, Cardiff RD, Newman RA, Yang P. y col. HER2/neu-induced mammary tumorigenesis and angiogenesis are reduced in cyclooxygenase-2 knockout mice. *Cancer Res*, 2005. 65(21): p. 10113-9.

335. Half, E., Tang XM, Gwyn K, Sahin A, Wathen K, Sinicrope FA. Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Res*, 2002.

62(6): p. 1676-81.

336. Takeshita, E., Osanai T, Higuchi T, Soumaoro LT, Sugihara K. Elevated cyclooxygenase-2 expression is associated with histological grade in invasive ductal breast carcinoma. *J Med Dent Sci*, 2005. 52(4): p. 189-93.

337. Costa, C., Soares R, Reis-Filho JS, Leitão D, Amendoeira I, Schmitt FC. Cyclo-oxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *J Clin Pathol*, 2002. 55(6): p. 429-34.

338. Arun, B. and P. Goss, The role of COX-2 inhibition in breast cancer treatment and prevention. *Semin Oncol*, 2004. 31(2 Suppl 7): p. 22-9.

339. Boland, G.P., Butt IS, Prasad R, Knox WF, Bundred NJ. COX-2 expression is associated with an aggressive phenotype in ductal carcinoma in situ. *Br J Cancer*, 2004. 90(2): p. 423-9.

340. Zerkowski, M.P., Camp RL, Burtness BA, Rimm DL, Chung GG. Quantitative analysis of breast cancer tissue microarrays shows high cox-2 expression is associated with poor outcome. *Cancer Invest*, 2007. 25(1): p. 19-26.

341. Park, K., Han S, Shin E, Kim HJ, Kim JY. Cox-2 expression on tissue microarray of breast cancer. *Eur J Surg Oncol*, 2006. 32(10): p. 1093-6.

342. Surowiak, P., Materna V, Matkowski R, Szczuraszek K, Kornafel J, Wojnar A, Pudielko M. Relationship between the expression of cyclooxygenase 2 and MDR1/P-glycoprotein in invasive breast cancers and their prognostic significance. *Breast Cancer Res*, 2005. 7(5): p. R862-70.

343. Gallicchio, L., McSorley MA, Newschaffer CJ, Thuita LW, Huang HY, Hoffman SC, Helzlsouer KJ. Nonsteroidal antiinflammatory drugs, cyclooxygenase polymorphisms, and the risk of developing breast carcinoma among women with benign breast disease. *Cancer*, 2006. 106(7): p. 1443-52.

344. Visscher, D.W., Pankratz VS, Santisteban M, Reynolds C, Ristimäki A, Vierkant RA, Lingle

WL, Frost MH, Hartmann LC. Association between cyclooxygenase-2 expression in atypical hyperplasia and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2008. 100(6): p. 421-7.

345. Dias Pereira, P., Lopes CC, Matos AJ, Santos M, Gärtner F, Medeiros R, Lopes C. COX-2 expression in canine normal and neoplastic mammary gland. *J Comp Pathol*, 2009. 140(4): p. 247-53.

346. Chang, C.C., Recent translational research: stem cells as the roots of breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2006. 8(1): p. 103.

347. Kabil, A., E. Silva, and A. Kortenkamp, Estrogens and genomic instability in human breast cancer cells--involvement of Src/Raf/Erk signaling in micronucleus formation by estrogenic chemicals. *Carcinogenesis*, 2008. 29(10): p. 1862-8.

348. Vadlamudi, R., Mandal M, Adam L, Steinbach G, Mendelsohn J, Kumar R. Regulation of cyclooxygenase-2 pathway by HER2 receptor. *Oncogene*, 1999. 18(2): p. 305-14.

349. Dohadwala, M., Batra RK, Luo J, Lin Y, Krysan K, Pold M, Sharma S, Dubinett SM. Autocrine/paracrine prostaglandin E2 production by non-small cell lung cancer cells regulates matrix metalloproteinase-2 and CD44 in cyclooxygenase-2-dependent invasion. *J Biol Chem*, 2002. 277(52): p. 50828-33.

350. Tsujii, M. and R.N. DuBois, Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*, 1995. 83(3): p. 493-501.

351. Subbaramaiah, K., Howe LR, Port ER, Brogi E, Fishman J, Liu CH, Hla T, Hudis C, Dannenberg AJ. HER-2/neu status is a determinant of mammary aromatase activity in vivo: evidence for a cyclooxygenase-2-dependent mechanism. *Cancer Res*, 2006. 66(10): p. 5504-11.

352. Wang, K.H., Kao AP, Chang CC, Lee JN, Hou MF, Long CY, Chen HS, Tsai EM. Increasing CD44+/CD24(-) tumor stem cells, and upregulation of COX-2 and HDAC6, as major

functions of HER2 in breast tumorigenesis. *Mol Cancer*, 2010. 9: p. 288.

353. Subbaramaiah, K., Norton L, Gerald W, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in HER-2/neu-positive breast cancer: evidence for involvement of AP-1 and PEA3. *J Biol Chem*, 2002. 277(21): p. 18649-57.

354. Denkert, C., Winzer KJ, Müller BM, Weichert W, Pest S, Köbel M, Kristiansen G, Reles A, Elevated expression of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor for disease free survival and overall survival in patients with breast carcinoma. *Cancer*, 2003. 97(12): p. 2978-87.

355. Rozenowicz Rde, L., Santos RE, Silva MA, Rodrigues FF, Oliveira AL, Ulson LB, Oliveira VM, Aoki T. Cox-2 and its association with prognostic factors and response to primary chemotherapy in patients with breast cancer. *Rev Col Bras Cir*, 2010. 37(5): p. 323-7.

356. McCarthy, K., Bustin SA, Ogunkolade B, Khalaf S, Laban CA, McVittie CJ, Carpenter R, Jenkins PJ. Cyclo-oxygenase-2 (COX-2) mRNA expression and hormone receptor status in breast cancer. *Eur J Surg Oncol*, 2006. 32(7): p. 707-9.

357. Dore, M., Cyclooxygenase-2 expression in animal cancers. *Vet Pathol*, 2011. 48(1): p. 254-65.

358. Mohammed, S.I., Khan KN, Sellers RS, Hayek MG, DeNicola DB, Wu L, Bonney PL, Knapp DW. Expression of cyclooxygenase-1 and 2 in naturally-occurring canine cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2004. 70(5): p. 479-83.

359. Queiroga, F.L., Pérez-Alenza D, Silvan G, Peña L, Illera JC. Positive correlation of steroid hormones and EGF in canine mammary cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2009. 115(1-2): p. 9-13.

360. Badowska-Kozakiewicz, A.M. and E. Malicka, Expression of cyclooxygenase-2 in neoplasms of the mammary gland in bitches. *Pol J Vet Sci*, 2010. 13(2): p. 337-42.

361. Queiroga, F.L., Pires I, Parente M, Gregório H, Lopes CS. COX-2 over-expression

correlates with VEGF and tumour angiogenesis in canine mammary cancer. *Vet J*, 2011. 189(1): p. 77-82.

362. Leo, C., Faber S, Hentschel B, Höckel M, Horn LC. The status of cyclooxygenase-2 expression in ductal carcinoma in situ lesions and invasive breast cancer correlates to cyclooxygenase-2 expression in normal breast tissue. *Ann Diagn Pathol*, 2006. 10(6): p. 327-32.

363. Wang, M.T., K.V. Honn, and D. Nie, Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*, 2007. 26(3-4): p. 525-34.

364. Brunelle, M., Sartin EA, Wolfe LG, Sirois J, Doré M. Cyclooxygenase-2 expression in normal and neoplastic canine mammary cell lines. *Vet Pathol*, 2006. 43(5): p. 656-66.

365. Shim, J.Y., An HJ, Lee YH, Kim SK, Lee KP, Lee KS. Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with breast carcinoma and its poor prognostic factors. *Mod Pathol*, 2003. 16(12): p. 1199-204.

366. Kulkarni, S., Patil DB, Diaz LK, Wiley EL, Morrow M, Khan SA. COX-2 and PPARgamma expression are potential markers of recurrence risk in mammary duct carcinoma in-situ. *BMC Cancer*, 2008. 8: p. 36.

367. Glynn, S.A., Prueitt RL, Ridnour LA, Boersma BJ, Dorsey TM, Wink DA, Goodman JE, Yfantis HG, Lee DH, Ambs S. COX-2 activation is associated with Akt phosphorylation and poor survival in ER-negative, HER2-positive breast cancer. *BMC Cancer*, 2010. 10: p. 626.

368. Kang, J.H., Song KH, Jeong KC, Kim S, Choi C, Lee CH, Oh SH. Involvement of Cox-2 in the metastatic potential of chemotherapy-resistant breast cancer cells. *BMC Cancer*, 2011. 11: p. 334.

369. Dannenberg, A.J. and K. Subbaramaiah, Targeting cyclooxygenase-2 in human neoplasia: rationale and promise. *Cancer Cell*, 2003. 4(6): p. 431-6.

370. Harris, R.E., Alshafie GA, Abou-Issa H, Seibert K. Chemoprevention of breast cancer in rats by celecoxib, a cyclooxygenase 2 inhibitor.

Cancer Res, 2000. 60(8): p. 2101-3.

371. Hudson, M., Rahme E, Richard H, Pilote L. Risk of congestive heart failure with nonsteroidal antiinflammatory drugs and selective Cyclooxygenase 2 inhibitors: a class effect? *Arthritis Rheum*, 2007. 57(3): p. 516-23.

372. White, W.B., Faich G, Whelton A, Maurath C, Ridge NJ, Verburg KM, Geis GS, Lefkowitz JB. Comparison of thromboembolic events in patients treated with celecoxib, a cyclooxygenase-2 specific inhibitor, versus ibuprofen or diclofenac. *Am J Cardiol*, 2002. 89(4): p. 425-30.

373. Zhao, S.Z., Reynolds MW, Lejkowitz J, Whelton A, Arellano FM. A comparison of renal-related adverse drug reactions between rofecoxib and celecoxib, based on the World Health Organization/Uppsala Monitoring Centre safety database. *Clin Ther*, 2001. 23(9): p. 1478-91.

374. van Staa, T.P., Smeeth L, Persson I, Parkinson J, Leufkens HG. What is the harm-benefit ratio of Cox-2 inhibitors? *Int J Epidemiol*, 2008. 37(2): p. 405-13.

375. De Smet, B.D., Fendrick AM, Stevenson JG, Bernstein SJ. Over and under-utilization of cyclooxygenase-2 selective inhibitors by primary care physicians and specialists: the tortoise and the hare revisited. *J Gen Intern Med*, 2006. 21(7): p. 694-7.

376. Luqmani, Y.A., Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Med Princ Pract*, 2005. 14 Suppl 1: p. 35-48.

377. Cherbonnel-Lasserre, C. and M.K. Dosanjh, Suppression of apoptosis by overexpression of Bcl-2 or Bcl-xL promotes survival and mutagenesis after oxidative damage. *Biochimie*, 1997. 79(9-10): p. 613-7.

378. Rudin, C.M. and C.B. Thompson, Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu Rev Med*, 1997. 48: p. 267-81.

379. Puhlmann, U., Ziemann C, Ruedell G, Vorwerk H, Schaefer D, Langebrake C, Schuermann P, Creutzig U, Reinhardt D. Impact of the cyclooxygenase system on

doxorubicin-induced functional multidrug resistance 1 overexpression and doxorubicin sensitivity in acute myeloid leukemic HL-60 cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. 312(1): p. 346-54.

380. Secchiero, P., Barbarotto E, Gonelli A, Tiribelli M, Zerbinati C, Celeghini C, Agostinelli C, Pileri SA, Zauli G. Potential pathogenetic implications of cyclooxygenase-2 overexpression in B chronic lymphoid leukemia cells. *Am J Pathol*, 2005. 167(6): p. 1599-607.

381. Chan, M.W., Wong CY, Cheng AS, Chan VY, Chan KK, To KF, Chan FK, Sung JJ, Leung WK. Targeted inhibition of COX-2 expression by RNA interference suppresses tumor growth and potentiates chemosensitivity to cisplatin in human gastric cancer cells. *Oncol Rep*, 2007. 18(6): p. 1557-62.

382. Wun, T., H. McKnight, and J.M. Tuscano, Increased cyclooxygenase-2 (COX-2): a potential role in the pathogenesis of lymphoma. *Leuk Res*, 2004. 28(2): p. 179-90.

383. Zrieki, A., R. Farinotti, and M. Buyse, Cyclooxygenase inhibitors down regulate P-glycoprotein in human colorectal Caco-2 cell line. *Pharm Res*, 2008. 25(9): p. 1991-2001.

384. Rusetskaya, N.V., N.Y. Lukyanova, and V.F. Chekhun, Molecular profile and cell cycle in MCF-7 and MCF-7/Dox cells exposed to conventional and liposomal forms of doxorubicin. *Exp Oncol*, 2009. 31(3): p. 140-3.

385. Kim, D.S., Park KS, Jeong KC, Lee BI, Lee CH, Kim SY. Glucosamine is an effective chemo-sensitizer via transglutaminase 2 inhibition. *Cancer Lett*, 2009. 273(2): p. 243-9.

386. Williams, J., Lucas PC, Griffith KA, Choi M, Fogoros S, Hu YY, Liu JR. Expression of Bcl-xL in ovarian carcinoma is associated with chemoresistance and recurrent disease. *Gynecol Oncol*, 2005. 96(2): p. 287-95.

387. Yao, M., Lam EC, Kelly CR, Zhou W, Wolfe MM. Cyclooxygenase-2 selective inhibition with NS-398 suppresses proliferation and invasiveness and delays liver metastasis in colorectal cancer. *Br J Cancer*, 2004. 90(3): p. 712-9.

388. Wang, R., Wang X, Lin F, Gao P, Dong K, Zhang HZ. shRNA-targeted cyclooxygenase (COX)-2 inhibits proliferation, reduces invasion and enhances chemosensitivity in laryngeal carcinoma cells. *Mol Cell Biochem*, 2008. 317(1-2): p. 179-88.
389. Zatelli, M.C., Molè D, Tagliati F, Minoia M, Ambrosio MR, degli Uberti E. Cyclooxygenase 2 modulates chemoresistance in breast cancer cells involving NF-kappaB. *Cell Oncol*, 2009. 31(6): p. 457-65.
390. Falandry, C., Debled M, Bachelot T, Delozier T, Créatin J, Romestaing P, Mille D, You B, y col. Celecoxib and exemestane versus placebo and exemestane in postmenopausal metastatic breast cancer patients: a double-blind phase III GINECO study. *Breast Cancer Res Treat*, 2009. 116(3): p. 501-8.
391. Dirix, L.Y., Ignacio J, Nag S, Bapsy P, Gomez H, Raghunadharao D, Paridaens R, y col. Treatment of advanced hormone-sensitive breast cancer in postmenopausal women with exemestane alone or in combination with celecoxib. *J Clin Oncol*, 2008. 26(8): p. 1253-9.
392. Ma, X., Kundu N, Rifat S, Walser T, Fulton AM. Prostaglandin E receptor EP4 antagonism inhibits breast cancer metastasis. *Cancer Res*, 2006. 66(6): p. 2923-7.
393. Simon, D., Schoenrock D, Baumgärtner W, Nolte I. Postoperative adjuvant treatment of invasive malignant mammary gland tumors in dogs with doxorubicin and docetaxel. *J Vet Intern Med*, 2006. 20(5): p. 1184-90.
394. Marconato, L., Lorenzo RM, Abramo F, Ratto A, Zini E. Adjuvant gemcitabine after surgical removal of aggressive malignant mammary tumours in dogs. *Vet Comp Oncol*, 2008. 6(2): p. 90-101.
395. Wang, L.S., Huang YW, Sugimoto Y, Liu S, Chang HL, Ye W, Shu S, Lin YC. Conjugated linoleic acid (CLA) up-regulates the estrogen-regulated cancer suppressor gene, protein tyrosine phosphatase gamma (PTPgama), in human breast cells. *Anticancer Res*, 2006. 26(1A): p. 27-34.
396. Johnson, G.E., V.N. Ivanov, and T.K. Hei, Radiosensitization of melanoma cells through combined inhibition of protein regulators of cell survival. *Apoptosis*, 2008. 13(6): p. 790-802.
397. Chandrasekharan, N.V. and D.L. Simmons, The cyclooxygenases. *Genome Biol*, 2004. 5(9): p. 241.
398. Lynch, P.M., COX-2 inhibition in clinical cancer prevention. *Oncology (Williston Park)*, 2001. 15(3 Suppl 5): p. 21-6.
399. Czembirek, C., Eder-Czembirek C, Erovic BM, Turhani D, Spittler A, Selzer E, Pötter R, Thurnher D. The cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide, a nonsteroidal analgesic, decreases the effect of radiation therapy in head-and-neck cancer cells. *Strahlenther Onkol*, 2009. 185(5): p. 310-7.
400. Salas, Y., Márquez A2, Diaz D3, Romero L4. Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem. *PLoS One*, 2015. 10(5): p. e0127381.
401. (FCI), F.C.I., Reglamento de exposiciones caninas de la FCI in Reglamento de exposiciones caninas de la FCI y Reglamento Complementario para las exposiciones mundiales y de sección, F.C.I. (FCI), Editor 2013: Bélgica.
402. Rutteman, G.R., Withrow, S.J., MacEwen, E.G., Tumors of the mammary gland, in *Small Animal Clinical Oncology*, S.J. Withrow, MacEwen, E.G., Editor 2001, WB Saunders. p. 455-477.
403. Clemente, M., Pérez-Alenza MD, Illera JC, Peña L. Histological, immunohistological, and ultrastructural description of vasculogenic mimicry in canine mammary cancer. *Vet Pathol*, 2010. 47(2): p. 265-74.
404. Dobson, J.M., Breed-predispositions to cancer in pedigree dogs. *ISRN Vet Sci*, 2013. 2013: p. 941275.

IX. Anexos

ANEXO 1 FICHA DE TUMORES MAMARIOS

DATOS DEL PACIENTE

Nº Ficha: _____

Fecha: _____

Propietario: _____

Tlf _____

Especie: _____ Raza: _____ Edad: _____

Peso: _____

Procedencia: _____ Localización geográfica: _____

Estado: entera ___ castrada ___ cuando: _____

Ciclos regulares: si ___ no ___ Intervalos interestros: _____

Fecha últimos celo: _____

Gestaciones: si ___ no ___ nº _____

Partos: si ___ no ___ nº _____ fecha último parto: _____

Tamaño medio de camadas: _____

Pseudogestaciones: si ___ no ___ ¿Cúantas? _____

Tratamientos hormonales: si ___ no ___

¿Cuál/es?: _____

¿Cúantos? _____

Fecha último tratamiento _____

Alimentación: _____

Otras patologías: _____

Tumores mamarios anteriores: si ___ no ___

Localización: _____

Tiempo transcurrido: _____

Tratamiento: _____

Diagnóstico anatomopatológico: _____

EXPLORACIÓN FÍSICA

Estado general: Temperatura _____ Mucosas _____ TRC: _____

Auscultación: Pulmonar _____

Cardíaca _____

Pérdida de peso: si ___ no ___ ¿desde cuándo? _____

Otros signos clínicos: _____

Analítica sanguínea: - Hematología: _____

Bioquímica: _____

Pruebas coagulación: _____

Rx: -Tórax: _____

-Abdomen: _____

Ecografía: - Tórax: _____

-Abdomen: _____

ECG: _____

DATOS DEL TUMOR

CMD	1(torácica)	2	3	4	5
Tamaño (cm)					
Tipo de presentación (simple/múltiple)					
Consistencia					
Forma					
Adherencias					
T ^a					
Caract. piel					
Fecha aparición					
Crecimiento					
Citología previa					

Afectación ganglios linfáticos (a la palpación): si _____ no _____

Axilar _____ Inguinal _____ Otros _____

DATOS DEL TUMOR

CMI	1(torácica)	2	3	4	5
Tamaño (cm)					
Tipo de presentación (simple/múltiple)					
Consistencia					
Forma					
Adherencias					
T ^a					
Caract. piel					
Fecha aparición					
Crecimiento					
Citología previa					

Afectación ganglios linfáticos (a la palpación): si ____ no ____

Axilar _____ Inguinal _____ Otros _____

Otros tumores primarios: _____

TRATAMIENTO

Quirúrgico: si _____ no _____

Descripción: _____

OVH simultánea: si _____ no _____

OVH posterior: si _____ no _____ ¿Cuándo?: _____

Complicaciones quirúrgicas: _____

Complicaciones postquirúrgicas: _____

Otros: - Quimioterapia:

Protocolo: _____

Duración: _____

-Radioterapia:

Protocolo: _____

Duración: _____

-Otros tratamientos: _____

DIAGNÓSTICO ANATOMOPATOLÓGICO:

Descripción: _____

EVOLUCIÓN DEL PACIENTE

Fecha: _____

Estado general: Temperatura _____ Mucosas _____ TRC: _____

Auscultación: Pulmonar _____

Cardíaca _____

Pérdida de peso: si _____ no _____ ¿desde cuándo? _____

Otros signos clínicos: _____

Analítica sanguínea: - Hematología: _____

Bioquímica: _____

Pruebas coagulación: _____

Rx: -Tórax: _____

-Abdomen: _____

Ecografía: - Tórax: _____

-Abdomen: _____

ECG: _____

Desarrollo de otras neoplasias: mamarias: _____

Otras: _____

Aparición metástasis: si _____ no _____

¿Dónde? _____

Evolución: Muerte: _____

Eutanasia: si _____ no _____

Necropsia: si _____ no _____ Hallazgos: _____

ANEXO 2
IMÁGENES DEL ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

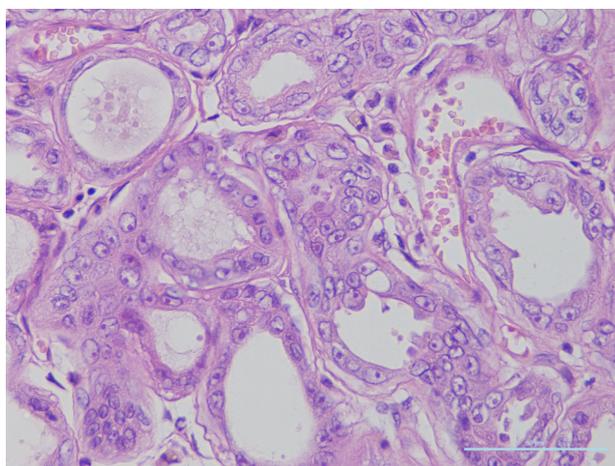


Figura 87. Apariencia de las estructuras tubulares que conforman un carcinoma tubular. H-E.

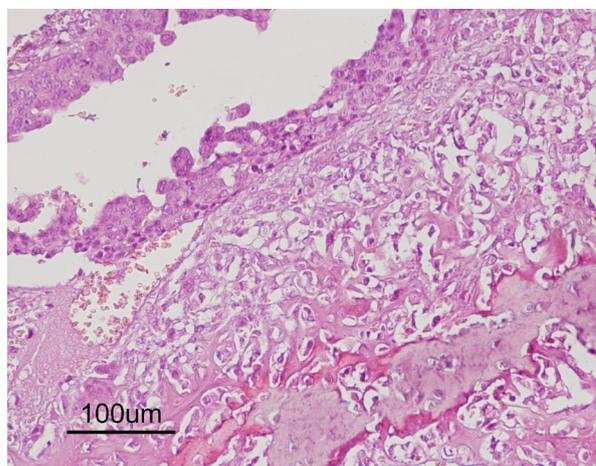


Figura 88. Presencia de células epiteliales y conectivas malignas en un carcinosarcoma. H-E.

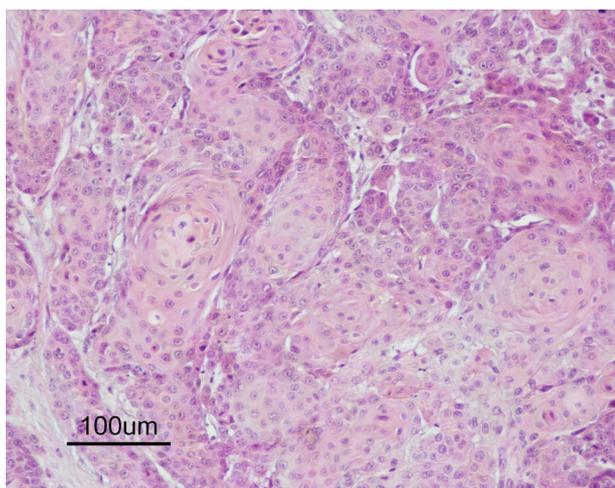


Figura 89. Imagen característica de un carcinoma de células escamosas desarrollado en la glándula mamaria. H-E.

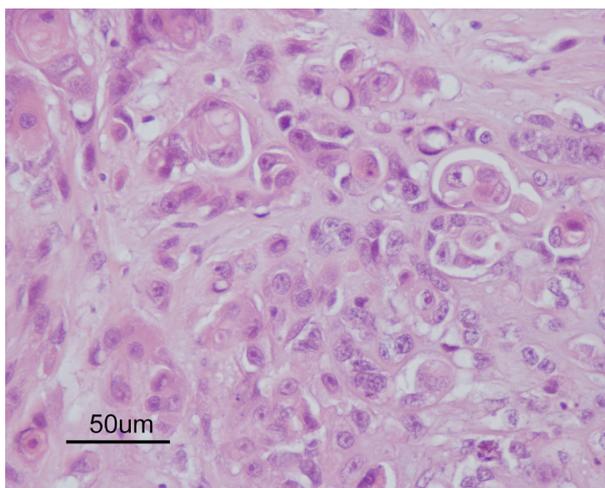


Figura 90. Detalle del aspecto indiferenciado de células malignas en un carcinoma anaplásico. H-E.

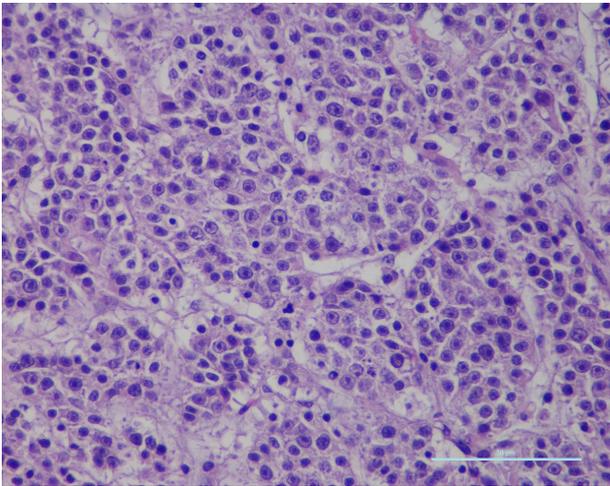


Figura 91. Células malignas densamente agrupadas constituyendo placas delimitadas por un fino estroma vascular en un carcinoma sólido. H-E.

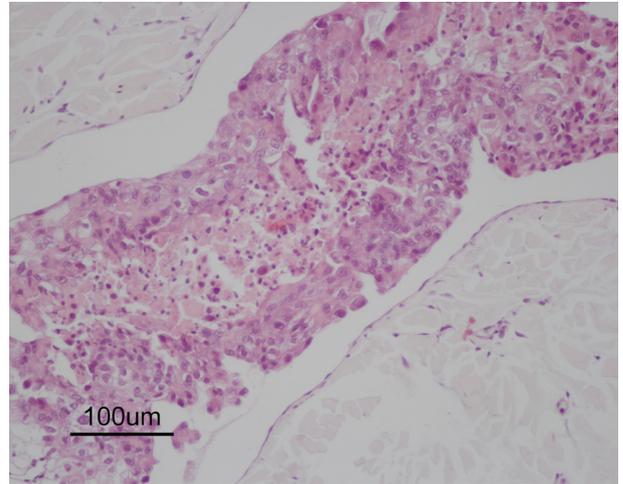


Figura 92. Extensa diseminación de células malignas en la luz de un vaso linfático en un carcinoma inflamatorio. H-E.

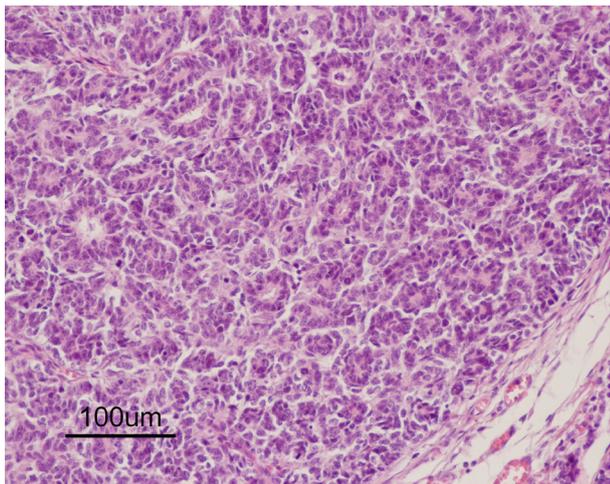


Figura 93. Disposición característica de las células neoplásicas entorno a una pequeña luz en un carcinoma cribiforme. H-E.

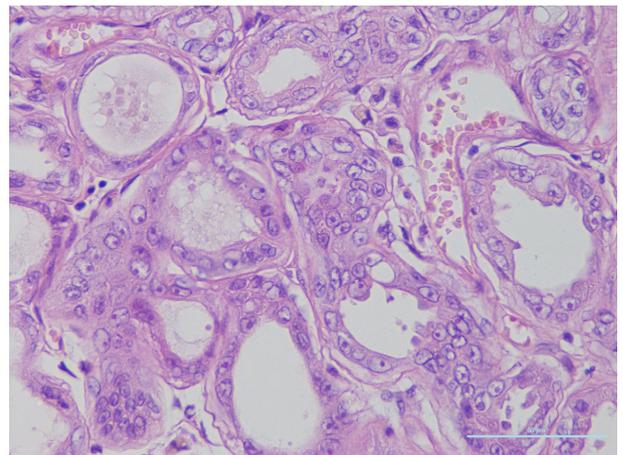


Figura 94. Intensa fibrosis del estroma en un carcinoma tubular. H-E.

ANEXO 3
IMÁGENES DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

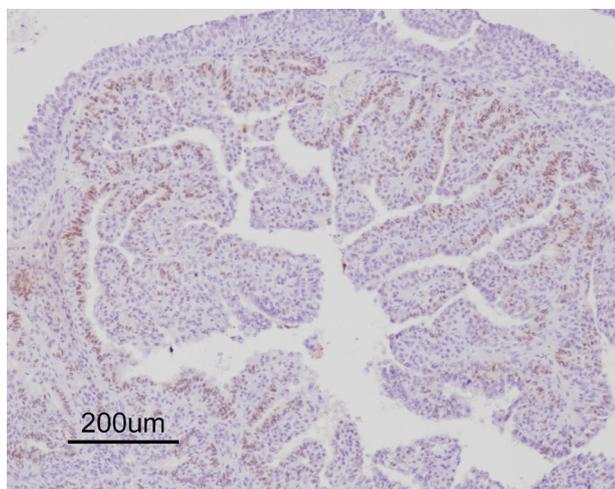


Figura 95. Positividad moderada para receptor de estrógeno α en células de un carcinoma papilar intraductal.

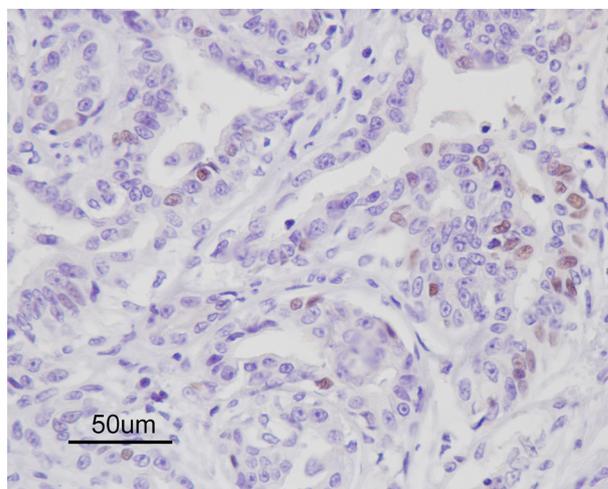


Figura 96. Inmunorreacción nuclear débil en un carcinoma de tipo mixto para receptor de estrógeno α .

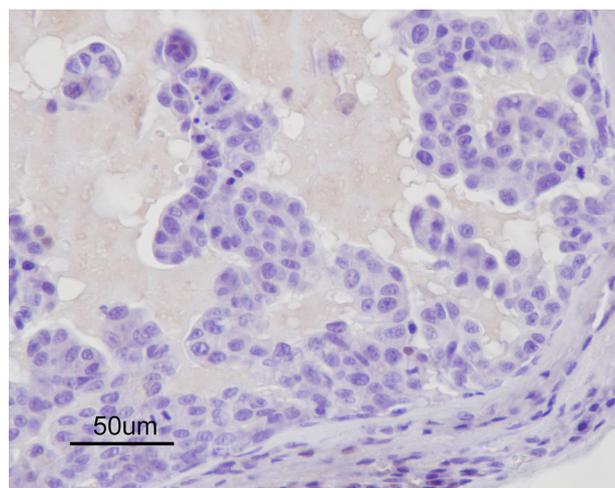


Figura 97. Ausencia de inmunorreacción para receptor de estrógeno α en células de un carcinoma micropapilar invasivo.

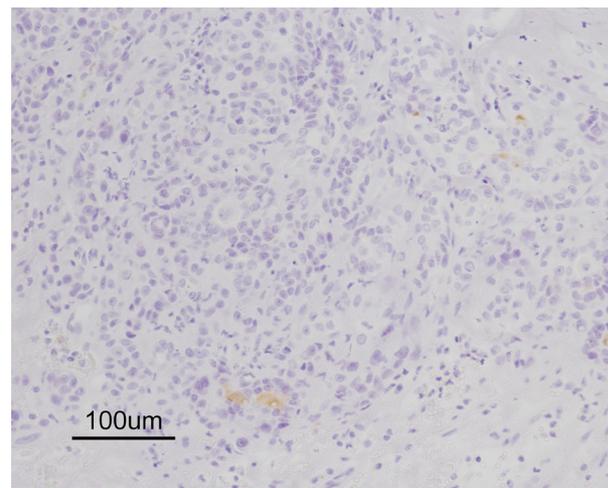


Figura 98. Reacción negativa en un carcinoma anaplásico para receptor de estrógeno α .

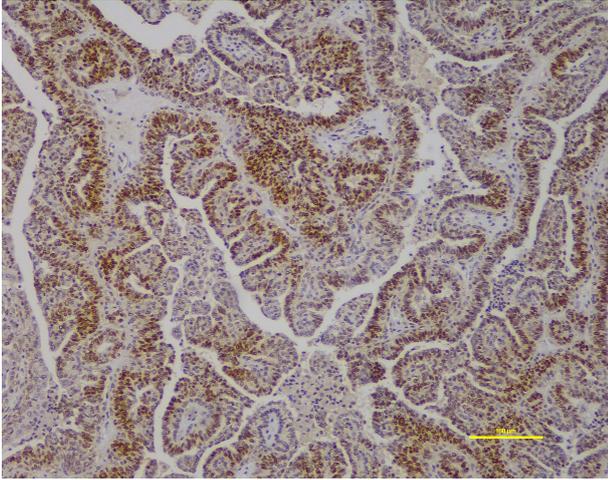


Figura 99. Positividad intensa de núcleos de un carcinoma papilar intraductal para receptor de progesterona.

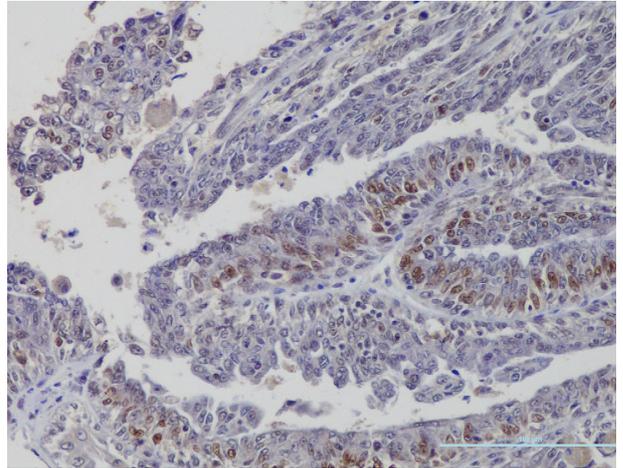


Figura 100. Inmunorreacción nuclear de débil a moderada en un carcinoma papilar intraductal para receptor de progesterona.

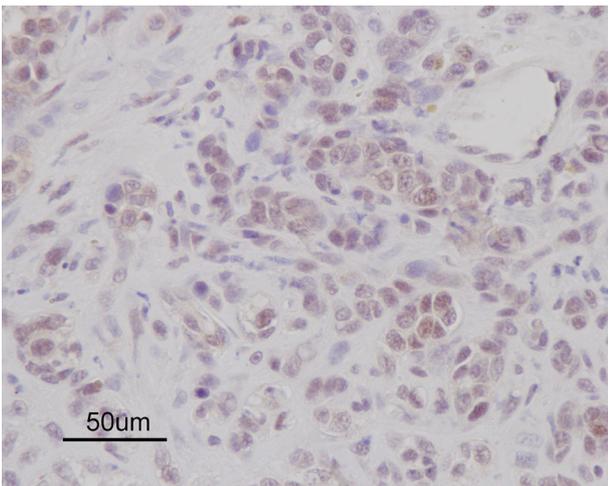


Figura 101. Reacción débil para receptor de progesterona en las células de un carcinoma anaplásico.

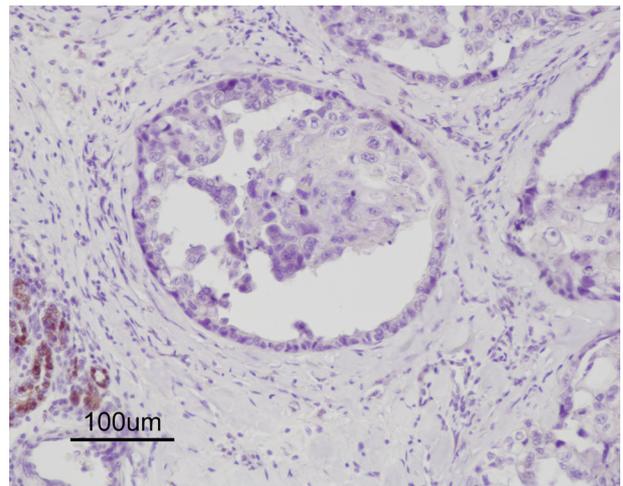


Figura 102. Ausencia de inmunorreacción para receptor de progesterona en células malignas de un carcinoma inflamatorio. Reacción positiva de núcleos de células de glándula mamaria no lesionada.

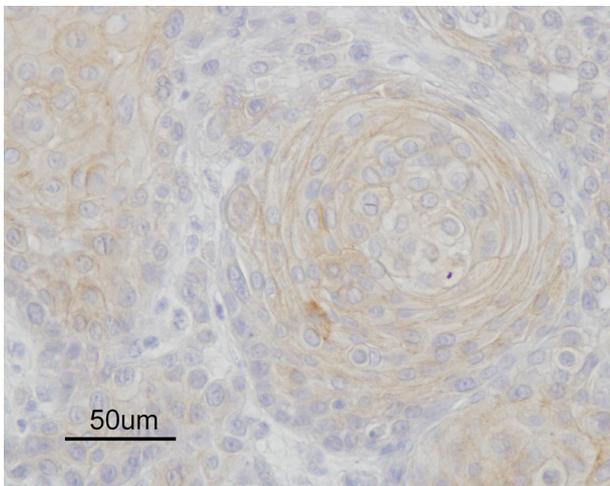


Figura 103. Reacción débil para la oncoproteína c-erbB-2 en la membrana de células de un carcinoma de células escamosas.

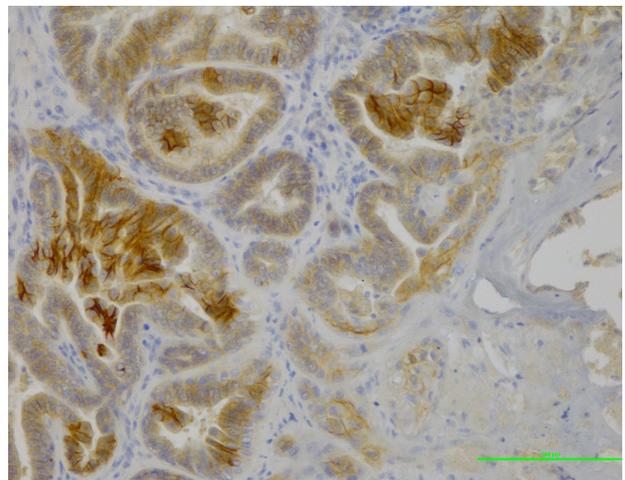


Figura 104. Áreas de intensa inmunorreacción para la oncoproteína c-erbB-2 en un carcinoma túbulo-papilar.

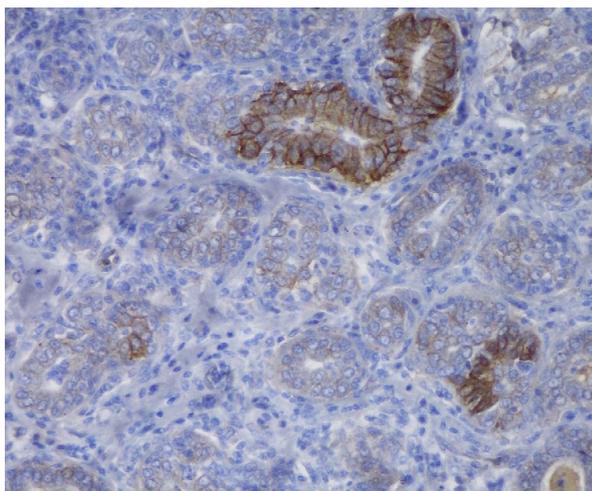


Figura 105. Inmunorreacción de intensidad variable en un carcinoma tubular para la oncoproteína c-erbB-2. Presencia de células que muestran una intensa positividad.

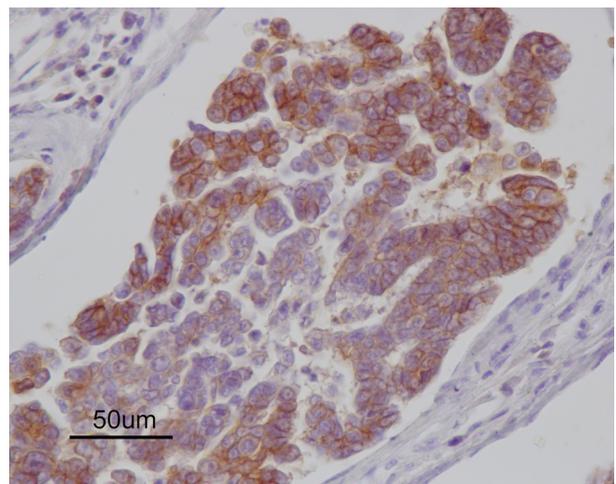


Figura 106. Reacción positiva para la oncoproteína c-erbB-2 en células cancerosas de un carcinoma inflamatorio situadas en la luz de un vaso linfático.

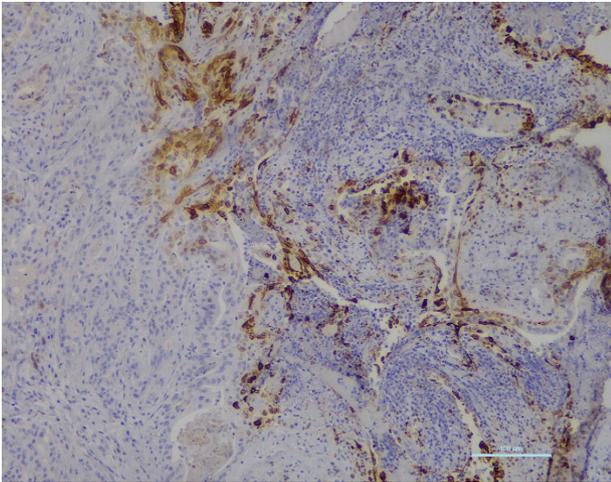


Figura 107. Reacción citoplasmática positiva para el anticuerpo COX-2 en un carcinoma de tipo mixto.

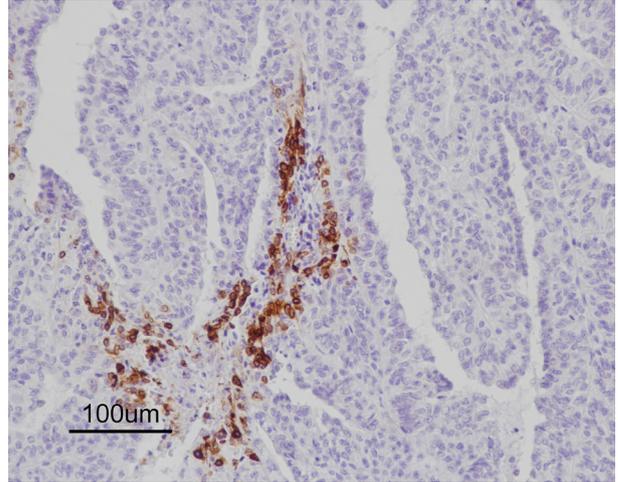


Figura 108. Intensa inmunorreacción en un foco de células de un carcinoma papilar intraductal para el anticuerpo COX-2.

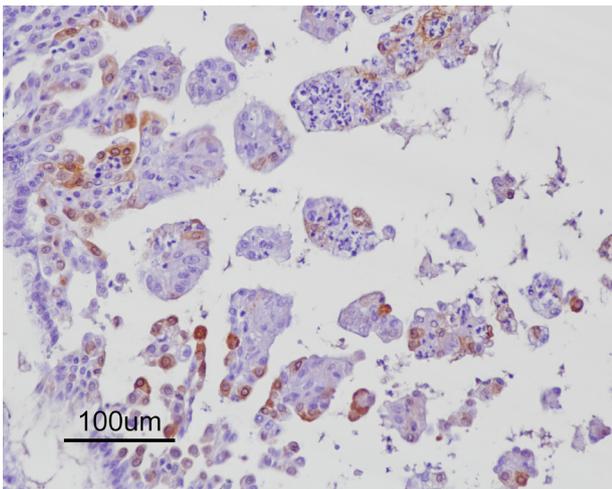


Figura 109. Positividad para el anticuerpo COX-2 en células neoplásicas malignas en un carcinoma micropapilar invasivo.

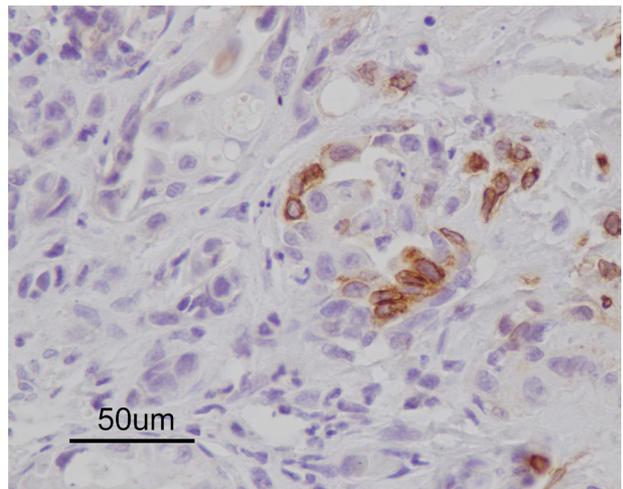


Figura 110. Inmunorreacción positiva para el anticuerpo COX-2 en un carcinoma anaplásico.

