

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CORRELACIÓN CITO-HISTOLÓGICA E ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN CELULAR
DE NEOPLASIAS DE GLÁNDULA MAMARIA EN PERRAS, DIAGNOSTICADAS EN
EL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

JESSICA ELIZABETH CABALLERO SEGUNDO

Asesores:

MVZ Laura Patricia Romero Romero

MVZ Yaritza Josefina Salas Araujo



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

México, D. F.

2015

Con todo mi amor a mis padres Teresa Segundo y Gustavo Caballero, mis hermanas
Mónica y Berenice. Porque han estado y estarán siempre a mí lado, ustedes me han dado
todo; esto es mas suyo que mío.

Gracias.

AGRADECIMIENTOS

Con la presentación de este trabajo quedo en deuda con incontables personas que permitieron su proceso y culminación.

A mis dos estimadas asesoras, principalmente a la MVZ Laura Romero quien me permitió ingresar al Departamento de Patología y además me confió el tema de esta tesis; por su apoyo incondicional, su comprensión y estímulos para finalizar este estudio. Junto con ella la MVZ Yaritza Salas; quien con madurez y paciencia se convirtió en un pilar durante el desarrollo de este trabajo. Además de ofrecer sus conocimientos me dieron cariño y amistad.

Expreso mi gratitud a la MVZ Beatriz Vanda quien con su amor por la enseñanza, su compromiso con el trato ético hacia los demás animales y su objetividad se convirtió en una gran maestra. Representa un ejemplo de vida en lo profesional y lo personal.

A todos quienes facilitaron herramientas para realizar esta labor; especialmente al Sr. Miguel quien además de apoyarme en el laboratorio de inmunología me brindo su amistad.

Mi estimado amigo Eugenio, que colaboro de manera importante en la edición fotografica.

Valoro, reconozco y aprecio a las personas que me ayudaron en la adquisición de conocimiento y experiencia profesional; al MVZ Edgar Ocampo y Oscar Martínez quienes fueron piezas clave en mi formación médica.

A mis queridos amigos Conrado, Karla, Hugo, Caty, Chris, Marco y Celic quienes me brindaron su amistad, consejos y experiencias tanto en lo profesional como en lo personal.

A los compañeros de la carrera, esperando que continúen siendo parte de mi vida; Rosario, Gladys, Gris, Dany, Pepe, Emmanuel, Ramón, Alberto (Nemo) y Miguel. No olvido todas las experiencias compartidas.

A mis familiares por su paciencia y confianza durante mis estudios. A mis abuelos que siempre están pendientes de mi a pesar de la lejanía Carmen, Ines, Don David y mi difunto abuelito Marcelino.

Gracias a todos los aquí mencionados mi pasión y compromiso con la medicina veterinaria y zootecnia, mi visión ética hacia los demás seres vivos y mi confianza en la ciencia se integraron y fortalecieron.

Sinceramente gracias a todos.

CONTENIDO

	PÁGINA
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVOS.....	6
MATERIAL Y MÉTODOS.....	6
RESULTADOS.....	11
DISCUSIÓN.....	12
CONCLUSIÓN.....	16
REFERENCIAS.....	17
FIGURAS Y CUADROS.....	21

RESUMEN

CABALLERO SEGUNDO JESSICA ELIZABETH. Correlación cito-histológica e índice de proliferación de neoplasias de glándula mamaria en perras, diagnosticadas en el Departamento de Patología (bajo la dirección de: MVZ Laura Patricia Romero Romero y MVZ M en C Yaritza Josefina Salas Araujo).

Las neoplasias de glándula mamaria representan el 50% del total de tumores en las perras, por ello se considera de suma importancia realizar un diagnóstico rápido, confiable y poco invasivo para la paciente. El estudio citológico de las lesiones mamarias, se ha convertido en la principal herramienta diagnóstica debido a su facilidad de obtención y procesamiento de la muestra. Además, esta técnica permite diferenciar rápidamente entre un proceso neoplásico maligno o benigno y un proceso inflamatorio, una vez identificada la naturaleza de la lesión, se puede tomar la decisión terapéutica apropiada, así como realizar pruebas complementarias que permitan establecer un pronóstico acertado. La técnica de inmunocitoquímica con el marcador Ki67 es una herramienta de gran utilidad en el pronóstico de las neoplasias de glándula mamaria; la literatura indica que a mayor positividad, el comportamiento biológico del tumor es más agresivo y por tanto la sobrevida del paciente se ve reducida. El objetivo de este estudio fue determinar la correlación cito-histológica de tumores de glándula mamaria en perras remitidas al Departamento de Patología de la FMVZ-UNAM entre abril de 2013 y noviembre de 2014,

asociar el comportamiento biológico de la neoplasia mamaria con el índice de proliferación celular en el estudio citológico a través del marcador Ki67, así como determinar las frecuencias de edad, raza y estado hormonal de las perras.

Las muestras citológicas fueron obtenidas a través de improntas de biopsias quirúrgicas de tumores mamarias remitidas para su estudio histopatológico. Asimismo, se recolectaron datos de utilidad diagnóstica y pronóstica para dichas neoplasias, tales como edad, estado reproductivo y comportamiento de la lesión.

En un total de 30 casos se obtuvo una correlación cito-histológica de 0.76, con sólo un 3.3% de falsos negativos y un 20% de falsos positivos. Por otro lado, se encontró que el comportamiento biológico maligno está relacionado con un índice alto de proliferación celular. La raza más frecuentemente afectada en el estudio fue el poodle, representando el 26% de la población; las perras de talla pequeña y mediana fueron las más afectadas y la edad de presentación más frecuente fue en perras mayores de 11 años, con un 43% de la población estudiada. Por último, las perras enteras o castradas después del tercer celo, correspondieron al 90%. Se concluye que el coeficiente de correlación cito-histológica en el diagnóstico de neoplasias de glándula mamaria fue del 76%; Ki67 es un inmunomarcador útil en citologías de tumor mamario canino, que se sugiere implementar como una prueba de rutina. Finalmente, se determinó que los principales factores de riesgo en esta población fueron hembras caninas de raza pura, no castradas, mayores de 9 años de edad.

INTRODUCCIÓN

Las neoplasias de glándula mamaria se informan comúnmente en perros y humanos, teniendo un comportamiento tres veces más agresivo en la perra que en la mujer¹, y representan el 50% del total de los tumores en las perras.^{1,2,3} Las glándulas mamarias caudales son generalmente las más afectadas, presentando lesiones comúnmente malignas.³ Las lesiones en glándula mamaria suelen detectarse durante el examen físico general y pueden describirse como lesiones firmes, de bordes irregulares.^{2,4,5} Existen diversos factores que influyen en la presentación de tumores en los perros.^{1,2,3,4} Los estudios refieren como principales factores predisponentes el estado hormonal y la edad;^{3,4} una perra castrada antes del primer ciclo estral disminuye la probabilidad de padecer tumores mamarios a sólo 0.05%; si la castración se realiza después del tercer ciclo estral, la probabilidad aumenta a 26%, teniendo un efecto preventivo nulo posterior a este ciclo.^{6,7,8} La castración posterior a la presentación de una lesión neoplásica en glándula mamaria no garantiza una evolución lenta del tumor y no influye en el tiempo de supervivencia de las pacientes.^{7,8} Otro factor relevante es la edad, ya que las hembras no castradas de entre 9 y 11 años son las principalmente afectadas.^{1,3,5} En cuanto a la raza, otros estudios señalan al poodle, pointer, setter inglés, pastor alemán, setter irlandés, springer spaniel, labrador retriever, gigante de los pirineos y samoyedos, como las principales razas afectadas, aunque la frecuencia de la enfermedad en cada una de las razas puede atribuirse a la preferencia de la sociedad por algunas de ellas.^{3,4,5}

Al igual que en los humanos, el cáncer de mama en perras representa un grupo heterogéneo de tumores en cuanto a morfología y comportamiento biológico. Histológicamente, las neoplasias mamarias se clasifican en epiteliales malignas, tipos especiales de neoplasias epiteliales, neoplasias mesenquimales malignas, tumor mixto maligno (carcinosarcoma) y neoplasias benignas.⁹

Realizar un diagnóstico oportuno de la lesión permite tratar al paciente adecuadamente y aumentar la probabilidad de supervivencia.^{10,11,12,13} La citología se ha convertido en la principal herramienta diagnóstica para diferenciar lesiones tumorales, gracias al bajo grado

de invasividad que representa y el corto periodo de tiempo en que se puede obtener un resultado que ayude a tomar la primera decisión terapéutica,^{12,14,15} ya que se puede diferenciar un proceso inflamatorio de uno neoplásico.^{16,17,18} El estudio citológico se puede obtener mediante aspiración con aguja delgada (ACAD) o impronta, mismas que cuentan con valor diagnóstico similar; para la citología por ACAD se conoce una sensibilidad de 96,8% y una especificidad de 100% , mientras que en la impronta se tiene una sensibilidad de 98,4% y una especificidad de 100%.¹⁹ El bajo porcentaje de falsos positivos (0-24%) en improntas intra-operatorias aprueban el uso de esta técnica para discernir el tipo de lesión, aunque el porcentaje de falsos positivos se puede ver afectado por los errores diagnósticos del observador o por el material que cuente con células escasas.²⁰

Las tinciones de Papanicolaou y Diff-Quik se han convertido en procesos de rutina para la evaluación de las muestras citológicas, debido a la excelente definición celular que brindan para obtener un diagnóstico.^{17,18} En caso de lesión neoplásica, la obtención apropiada de un aspirado, además de determinar la estirpe del tumor,^{18,21} permite observar las características celulares de malignidad, como son las particularidades del núcleo, nucléolo, de la cromatina y del citoplasma; por ejemplo, anisocariosis, anisocitosis, mitosis atípicas, macronúcleolos, uno o varios nucléolos evidentes, canibalismo y células en “anillo de sello”.^{18,21,22} Sin embargo, debido a diversos factores que interfieren en la obtención y el proceso de la muestra, tales como cantidad insuficiente de células intactas, contaminación excesiva con sangre, frotis espesos, artificios o mala conservación celular, para el diagnóstico definitivo se requiere realizar el estudio histopatológico mediante una biopsia quirúrgica.^{18,22,23} Existen diversos métodos de obtención de biopsias, en la perra se realiza generalmente una biopsia excisional, la cual consiste en retirar la glándula mamaria afectada completa.^{21,22} La obtención del tumor completo permite tomar muestras de las diversas áreas y así clasificarlo, determinar el índice mitótico, característica importante para definir la malignidad, así como establecer la extensión de la misma o el grado de invasión hacia tejidos adyacentes, e inclusive, pronosticar metástasis al observar permeación a los vasos sanguíneos y linfáticos locales.^{22,23}

Los inmunomarcadores en medicina veterinaria se han utilizado con fines pronósticos para tumores de glándula mamaria.²⁴ Mediante el uso de marcadores inmunocitoquímicos se pueden identificar ciertas características, tales como el índice de proliferación celular a través de Ki67.²⁴ La proteína Ki67 es un péptido recombinante humano que corresponde a un fragmento de cDNA de Ki67 de 1002 pares de bases.²⁵ Su nombre deriva de la ciudad Kiel, donde se identificó, y el número de la placa entre los 96 pocillos. El Ki67 es una proteína nuclear con peso molecular de 350-370 kDa, que pertenece a un grupo molecular de proteínas mitóticas asociadas al cromosoma. Este se expresa en todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2, y la mitosis), y está ausente de las células en reposo; por ello, Ki67 es un excelente indicador de proliferación celular.^{24,26,27} Su utilidad en el diagnóstico de neoplasias de glándula mamaria permite conocer el grado de proliferación celular, lo que brinda una orientación para el protocolo de tratamiento de cada tipo de neoplasia.^{26,27} El anticuerpo para Ki67 es un marcador por excelencia para determinar el índice de proliferación celular de una población celular neoplásica; éste se identifica positivamente dentro del núcleo y se expresa como una tinción positiva únicamente cuando la célula se encuentra en actividad mitótica.^{24,28} La expresión de Ki67 generalmente se correlaciona con la evolución clínica de la enfermedad; se espera que una población celular altamente positiva curse con una evolución más agresiva del tumor.^{24,27,29}

La rápida evolución de las lesiones neoplásicas malignas exige el uso de técnicas rápidas y asertivas. Como ya es conocido, las técnicas citológicas brindan una herramienta fundamental en el diagnóstico oportuno de lesiones tumorales en glándula mamaria; al utilizar inmunomarcadores para citología, se busca establecer una herramienta que permita no sólo identificar el tipo de lesión, sino también obtener un criterio que permita advertir el posible comportamiento biológico de una lesión.^{27,28,29} En este sentido, se plantean los siguientes objetivos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la correlación cito-histológica e índice de proliferación celular de neoplasias benignas y malignas de glándula mamaria en perras, diagnosticadas en el Departamento de Patología de la FMVZ de la UNAM, entre abril de 2013 y noviembre de 2014.

Objetivos específicos

1. Determinar el coeficiente de correlación cito-histológica en el diagnóstico de neoplasias benignas y malignas de glándula mamaria, en las perras remitidas al Departamento de Patología.
2. Asociar el comportamiento biológico de la neoplasia mamaria con el índice de proliferación celular, a través de inmunocitoquímica con el marcador Ki67.
3. Determinar las frecuencias de edad, raza, estado hormonal de las perras, y relacionarlas con el tumor mamario canino.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio prospectivo, transversal, descriptivo y comparativo, cualitativo y cuantitativo.

Se recolectaron y procesaron 30 glándulas mamarias de perras con tumores, obtenidos por resección quirúrgica en el Hospital Veterinario de Especialidades de la FMVZ-UNAM. Las glándulas mamarias con tumores conservadas en refrigeración que fueron remitidas al Departamento de Patología de la FMVZ fueron inmediatamente procesadas. Se realizó la descripción macroscópica del tejido; posteriormente se llevaron a cabo diversos cortes con el fin de obtener muestras citológicas por medio de improntas del tejido tumoral; de la misma zona se realizaron cortes del tejido para su procesamiento por histopatología.

Estudio citológico

De cada uno de los tumores se obtuvieron tres muestras citológicas por medio de improntas de la lesión, y se incluyeron de la siguiente forma:

- 1) Una laminilla fijada en alcohol al 96% durante 30 minutos para su proceso mediante tinción de Papanicolaou, la cual consiste en una coloración policrómica cuya principal ventaja es observar el detalle nuclear y el patrón de cromatina; asimismo, muestra un citoplasma claro que permite apreciar los grados de diferenciación celular. La tinción de Papanicolaou utiliza tres colorantes: la Hematoxilina, que tiñe selectivamente los núcleos, el Orange G y la Eosina Alcohol 50 que tiñen el citoplasma.^{28, 29}
- 2) Una laminilla fijada al aire para su tinción con Diff-Quik. Se trata de una tinción tipo Romanowsky, la cual se basa en el uso combinado de los colorantes eosina y azul de metileno, que permite evaluar aspectos morfológicos celulares, tales como la forma y dimensión celular, del núcleo y citoplasma, además de evidenciar estructuras intracitoplasmáticas.^{30, 31}

A partir de ambas laminillas teñidas con Papanicolaou y Diff Quik, se realizó el diagnóstico citológico por tres expertos con el uso de un microscopio óptico.

- 3) Una laminilla electrocargada fijada en alcohol al 96% durante 30 minutos, para su proceso mediante la técnica inmunocitoquímica. Esta es una técnica utilizada para evidenciar la presencia de proteínas en los tejidos mediante el empleo de anticuerpos (inmunoglobulina). Se basa en la especificidad y afinidad de los anticuerpos hacia determinadas proteínas, para lo cual los anticuerpos son combinados con colorantes que evidencian su presencia bajo el microscopio óptico.^{28, 29}

El diagnóstico citológico fue realizado de forma independiente por dos patólogos.

Inmunocitoquímica

Se realizó a través del método indirecto con el uso de polímero y marcaje de 2 pasos. Se identificó la proteína nuclear Ki-67 con un anticuerpo monoclonal anti-humano producido en ratón (DAKO clone MIB1, M7240), utilizando el juego de reactivos de EnVisionFLEX (Dako K8010). La técnica se realizó mediante el siguiente protocolo de trabajo.

Recuperación antigénica: Se colocaron las laminillas en solución Target Retrieval Solution Low pH en una dilución de 1:50 en agua destilada, dentro de una olla de presión preparada con 400 mL de agua destilada, en horno de microondas por 10 minutos a máxima temperatura. Posteriormente, se hizo un lavado en solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Bloqueo de Peroxidasa: Se incluyeron las laminillas en Peroxidasa blocking reagent (DM821) durante 5 minutos a temperatura ambiente para su incubación en cámara húmeda con el anticuerpo primario Ki67 en una dilución 1:200, a temperatura ambiente, por 25 minutos. Al finalizar se realizó un lavado en PBS por 5 minutos a temperatura ambiente.

Bloqueo: Las laminillas se incubaron en una cámara húmeda por 20 minutos a temperatura ambiente con el POLIMERO ENVISION FLEX/HRP (DM 822). Después se realizaron dos lavados con solución PBS, con una duración de 5 minutos cada uno.

Revelado: Se realizó con diaminobencidina (DAB) en una dilución de 1 mL de sustrato buffer DM823 con 1 gota de DAB por 1 minuto, observando al microscopio óptico la inmunopositividad en la cual los núcleos se tiñen marrón o ladrillo intenso. Al finalizar, se hicieron dos lavados con agua destilada, cada uno de 5 minutos.

Contratinción: Las laminillas se sumergen en hematoxilina por 10 segundos y se enjuagó dos veces, uno con agua amoniacal por 10 segundos y otro enjuague con agua corriente. Posteriormente, se deshidrataron por medio de pases en alcohol etílico al 70%, 80%, 96% y alcohol absoluto; cada pase durante 10 segundos. Por último, se aclaró en xilol absoluto por 10 segundos.

Montaje: Se colocó una gota de resina sintética y un cubreobjetos.

Estudio histopatológico

Se realizaron cortes en fresco de cada uno de los tumores, los cuales se incluyeron en formalina al 10% durante 24 horas, se realizó la técnica histológica de rutina en el procesador de tejidos para su inclusión en parafina y posteriormente hacer cortes de 3 μ para teñir con Hematoxilina-Eosina para su posterior estudio histopatológico.

El diagnóstico morfológico fue realizado de forma independiente por dos patólogos, a partir de cada uno de los cortes histológicos teñidos con H&E, para su posterior correlación con el estudio citológico.

Análisis de las imágenes

Con el microscopio óptico se obtuvieron imágenes fotográficas de 10 campos aleatorios en 40X, de cada una de las laminillas de las muestras citológicas procesadas con la inmunotinción para Ki67. Las imágenes fueron sometidas a análisis por medio del programa ImageJ,^{32,33} el cual es un programa de procesamiento de imagen digital de uso público, programado en Java y desarrollado en los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica, diseñado con un sistema abierto que proporciona extensibilidad por medio de herramientas y macroinstrucciones grabables; las cuales permiten desarrollar herramientas de escaneo personalizado, análisis y procesamiento, usando el editor incluido en ImageJ y un compilador del programa.

El análisis de imagen se realizó de la siguiente forma:

Se abrió la imagen mediante el programa ImageJ y se ajustó la escala a micrometros (μ), ya que la imagen original se encuentra en pixeles; para ello se debe seleccionar en el menú “Set Scale” y modificar los datos a μ . Para realizar el conteo celular se ajustó la saturación, el brillo y el matiz de las imágenes por medio del menú, el cual ofrece tres tonalidades: “Blue” para realizar la cuenta de las células inmunopositivas, “Green” y “Red” con los cuales se realiza la cuenta del total de las células presentes en la imagen. Se deben aplicar varios filtros de imagen que permiten eliminar partículas que interfieren con la cuenta; todo

este proceso se realiza con base al criterio de un mismo observador, teniendo en cuenta que todas las imágenes serán analizadas del mismo modo. Se debe seleccionar en el menú “Analyze Particles” con “Outlines”, que permite visualizar cuales fueron las partículas contabilizadas y de esta manera asegurar que el programa está tomando en cuenta lo que se requiere. Al finalizar el análisis, el programa arroja un cuadro de datos donde indica cuál es el número de células positivas.^{32,33} El proceso se realiza dos veces para cada foto; es decir, un conteo para las positivas y uno para la totalidad de ellas. Estos datos se acumulan en una página de Excel para su posterior estudio estadístico.

Índice de proliferación celular

Fue calculado como el resultado de la división del número de células positivas entre el total de células por campo y multiplicado por cien. Para el cálculo del nivel de expresión del índice Ki67, se realizaron los percentiles 50 para clasificar en índice bajo (<29%) e índice alto (>30%).

Análisis estadístico

La correlación cito-histológica se clasificó de acuerdo a la tabla de clasificación establecida por Landis y Koch.³⁴ Existen varios índices de concordancia propuestos, el más preciso es la proporción de acuerdos observados, es decir $(a + d)/N$. Este índice es muy intuitivo y fácilmente interpretable: toma valores entre cero (0), que será total desacuerdo, y uno (1), como máximo acuerdo. Sin embargo, como indicador de reproducibilidad tiene el inconveniente de que aún en el caso de que los dos observadores clasifiquen con criterios independientes, se produciría un cierto grado de acuerdo por azar.³⁴ (Cuadro 1)

La correlación se llevó a cabo con el programa SPSS versión 10.0, con los valores numéricos del índice de Ki67, diagnóstico citológico e histológico, comportamiento biológico, raza, edad, estado hormonal y talla de las perras en estudio. Se realizó la

correlación de Pearson entre el diagnóstico citológico e histológico y entre el comportamiento biológico y el índice de proliferación.

Se consideró estadísticamente significativo una P menor o igual a 0.05.

Se sometieron a estudio de frecuencia la edad, raza, talla, comportamiento biológico y estado hormonal de las perras.

RESULTADOS

Se realizó el diagnóstico citológico e histológico para cada uno de los 30 casos (Hoja de datos 1). Se encontró que la cantidad de tumores clasificados como benignos por citología es muy cercana a la suma real confirmada mediante clasificación histológica (60%). En cuanto a la relación entre benignos y malignos, en ambas técnicas se observa un mayor número de tumores malignos (Cuadro 2) (Imágenes 1, 2, 3, 4, 5).

1. Determinación del coeficiente de correlación cito-histológica.

El 33.3% de los casos diagnosticados como malignos por medio de citología, resultaron de igual forma malignos en el estudio histopatológico; asimismo, el 43.3% de los diagnósticos citológicos benignos, también se clasificaron como benignos por histología. Sólo el 3.3% de los casos diagnosticados citológicamente como benignos, resultaron malignos en el corte histológico (falsos negativos); 20% de los casos malignos por citología, fueron benignos por histología (falsos positivos). A partir de estos datos se calculó el índice de concordancia Kappa, que fue de 60% ($P= 0.02$) (Cuadro 3) (Imágenes 6A, B y C).

2. Correlación del comportamiento biológico con el índice de proliferación celular Ki67.

Se encontró que el comportamiento biológico maligno está relacionado con un índice alto de proliferación celular. El 40% de las neoplasias malignas tuvieron un índice de proliferación alto (Imagen 7); sólo el 23.3% de los tumores malignos presentaron índice de proliferación bajo (Imagen 8). Respecto a las neoplasias benignas, únicamente el 10% mostraron un índice de proliferación alto; sin embargo, no se encontró significancia estadística en la Chi cuadrada ($P=0.6$) (Cuadro 4).

3. Frecuencia de edad, raza y estado hormonal de las perras con tumor mamario canino.

Se encontró que la raza más afectada fue el poodle, pues representó el 26% de la población total (Gráfico 1).

Según la talla de las perras, se observó que las razas pequeñas y medianas son las más frecuentemente afectadas, cada una representa un 40%, mientras que las razas grandes sólo representaron el 20% (Gráfico 2).

En cuanto a la edad, las hembras mayores de 11 años representaron el 43% de la muestra afectada, el 33% tenía entre 9 y 11 años, y las menores a 8 años representaron el 23% (Gráfico 3).

En relación al estado hormonal de las pacientes, se evidenció que las hembras enteras, o castradas después del tercer celo, representan el 90% de la población estudiada (Gráfico 4).

DISCUSIÓN

Desde el punto de vista histológico, en este estudio se informa mayor frecuencia de tumores mamarios malignos que benignos, lo cual coincide con los resultados de otros estudios, como Hellmen et al,¹⁰ donde a partir de 202 casos estudiados, el 30% resultaron benignos, el 68% malignos, mientras que el 2% restante fueron displasias. Asimismo, Sontas²¹ en su

estudio obtuvo 65 muestras de tumores mamarios, de las cuales sólo 6 (9.2%) resultaron benignos, 51 (78.5%) malignos y 8 (12.3%) con atipias celulares. Por su parte, Peña et al,³ en un estudio donde revisaron 65 casos de perras con tumor mamario, encontraron que 46 (70.8%) presentaban al menos un tumor maligno, aunque se observaron neoplasias mamarias benignas concurrentes y displasias en 50 (77%) de las 65 pacientes. Según Meuten,¹ el comportamiento biológico del tumor mamario canino es comúnmente maligno y de progreso más agresivo que en la mujer.

Por otra parte, la concordancia cito-histológica obtenida fue sustancial (0.76);³⁴ la cual coincide con diversos autores, debido a la complejidad del diagnóstico citológico en muestras de tumores mamarios.^{17,18,22} En el Departamento de Patología de la FMVZ-UNAM se realizó otro estudio donde el valor de la sensibilidad, que son los verdaderos positivos identificados en la citología, fue de 61% ($p < 0,5\%$); a diferencia de la especificidad, traducida ésta como la proporción de verdaderos negativos, la cual fue de 84% ($p < 0,5\%$).³⁵

La correlación cito-histológica en las neoplasias mamarias en perras presenta menor precisión que en otros tipos de neoplasias, probablemente debido a la heterogeneidad morfológica en diferentes áreas del tumor.³⁸ Esto puede llevar a falsos negativos o falsos positivos en casos donde la muestra no es representativa, en lesiones proliferativas benignas, así como ante la presencia de necrosis e inflamación, debido a que estos procesos pueden alterar la morfología celular generando atipias.³⁹ También puede deberse a problemas en la obtención de la muestra, la tinción y la limitada área que cubre la punción.⁴⁰

A pesar de las limitaciones que puede tener la citología, a través de ella se puede establecer de forma rápida, económica y con el mínimo riesgo para la paciente, si la lesión neoplásica es benigna o maligna, así como los elementos que la conforman, es decir, si es de origen epitelial, mesenquimal, o mixto.³⁶ La citología mamaria, a partir de muestras adecuadas y representativas, es una valiosa herramienta diagnóstica para la diferenciación de neoplasias benignas o malignas de glándula mamaria en la perra. En ocasiones, para obtener una muestra representativa puede ser necesario apoyarse en diferentes métodos de muestreo.³⁷

Gracias a que tanto el estudio citológico por aspiración con aguja delgada (ACAD) y la impronta cuentan con valor diagnóstico similar, con una sensibilidad de 96.8% y 98.4% respectivamente, y una especificidad de 100% para ambos métodos de obtención,¹⁹ se puede utilizar de manera indistinta para el diagnóstico con la confianza de su asertividad.

A pesar de que no se encontró significancia estadística, al evaluar el índice de proliferación celular a través del anticuerpo Ki67, se observó que se encuentra asociado al comportamiento biológico de la neoplasia, pues el conteo de células positivas se encuentra notablemente incrementado en las neoplasias malignas. El anticuerpo Ki67, al ser específico de proliferación celular, se encuentra comúnmente asociado a neoplasias malignas. Pathmanatham,²² médico dedicado al estudio de cáncer de mama en mujeres, presenta un estudio en el cual describe los beneficios del anticuerpo Ki67 como el indicador por excelencia de proliferación celular. Nieto²⁴ realizó un estudio con el uso de inmunomarcadores en perras, entre ellos el anticuerpo Ki67, en el cual concluyó que es una herramienta importante para identificar cualquier célula que se encuentre en división, pues Ki67 es un excelente indicador de proliferación celular.

El anticuerpo Ki67 ha sido utilizado comúnmente en medicina humana, específicamente en el diagnóstico y pronóstico del cáncer de mama. Ha resultado útil al establecerse como un criterio de malignidad en las neoplasias mamarias caninas, esta prueba podría ser de mucha utilidad al usarse como un estudio de gabinete para todas las citologías de glándula mamaria diagnosticadas como malignas, y proporcionar al clínico un dato importante para emitir un pronóstico más acertado y decidir el tratamiento más apropiado.²⁴

La frecuencia con la que se diagnostican en el laboratorio de patología casos de tumor mamario canino hace necesario el uso de nuevas herramientas que permitan un diagnóstico rápido y más acertado, con el fin de establecer un pronóstico preciso que facilite al clínico tomar decisiones en el protocolo de tratamiento más adecuado para cada paciente.^{3,11}

En este trabajo se encontró que las neoplasias mamarias afectan preferentemente a perras de raza pura; al respecto Hellmen et al,¹⁰ de un total de 202 hembras, informaron que únicamente 13 (6.4%) de ellas eran mestizas. Simon et al,¹⁶ en el análisis de 50 hembras

con uno o varios tumores mamarios, encontraron que 18 (36%) eran mestizas, 8 (16%) Cocker y 6 (12%) Daschund; las 18 (36%) restantes eran diversas razas. Por su parte, Sontas²¹ obtuvo muestras de 55 perras, 50 (90.9%) de ellas eran de raza pura.

El 90% de las hembras muestreadas durante el presente estudio no estaban castradas, o bien, este procedimiento se realizó posterior al tercer celo, lo que reduce el beneficio preventivo de desarrollar tumores en glándula mamaria. Rutteman⁷ y Donnay et. al,⁸ señalan que en una perra castrada antes del primer ciclo fértil, disminuye la probabilidad de padecer tumores mamarios a sólo 0.05%; si la castración se realiza después del tercer ciclo estral la probabilidad aumenta a 26%, teniendo un efecto preventivo nulo posterior a este ciclo. Simon et al,¹⁶ encontraron que de 50 pacientes con uno o más tumores mamarios, sólo 5 (10%) de ellas estaban esterilizadas y el resto 45 (90%) estaban intactas. A pesar del menor número de hembras castradas, la presentación de tumores malignos fue menor en relación a los benignos; de las 40 perras evaluadas histológicamente, 24 (60%) se clasificaron como benignas y 16 (40%) como malignas.

En este estudio, de los 30 casos estudiados se encontró que la edad promedio fue de 9 años, como refieren la mayoría de los estudios. Similar al presente estudio, Rasotto et al,²³ con 24 muestras, obtuvieron un promedio de edad de 7.09 años con un intervalo de entre 5 y 19 años; mientras que Peña et al,³ con 65 casos, obtuvieron un promedio de 9.3 años de edad en sus pacientes, con un rango de presentación de entre 3 y 15 años. De igual forma Simon et al,¹⁶ con 50 casos, obtuvo un promedio de edad de 10 años con muestras de hembras de entre los 5 y los 15 años de edad, y Cassali,¹⁴ con 77 muestras, informó de un promedio de 8.8 +/- 2.5 años, con un rango de edad de entre los 3 y los 15 años.

CONCLUSIÓN

Al determinar el coeficiente de correlación cito-histológica en el diagnóstico de neoplasias de glándula mamaria en las perras diagnosticadas en el Departamento de Patología, FMVZ-UNAM, se encontró que un 60% de los casos diagnosticados por citología fueron asertivos. Asimismo, el diagnóstico citológico es cada día más valorado como estudio preliminar para el tumor mamario canino, sin olvidar que la prueba definitiva, en todos los casos, debe ser el estudio histopatológico.

Los datos que arroja el presente estudio indican que el anticuerpo Ki67 es un inmunomarcador útil en la identificación de lesiones malignas en citologías de tumor mamario canino. El uso de este anticuerpo en medicina veterinaria podría ser de mucha utilidad en muestras citológicas, donde es capaz de aportar mayor precisión pronóstica previa al estudio histológico.

Al identificar la frecuencia de la edad, raza y el estado hormonal de las perras con tumor mamario, se pudo determinar que los principales factores de riesgo fueron perras de alrededor de 9 años de edad, de razas puras y no castradas.

En cuanto al aporte diagnóstico en la clínica, se recomienda el uso de Ki67 como marcador pronóstico, ya que durante este estudio demostró ser una herramienta útil para la citología y puede realizarse en el post-operatorio y a la espera del resultado de la histopatología.

REFERENCIAS

1. MEUTEN D. Tumors in domestic animals, tumors of the mammary gland. Iowa State Press 2002, 575- 606.
2. MOULTON, J. E., TAYLOR, D. O. N., DORN, C. R. and ANDERSEN, A. C. Canine mammary tumors. *Vet Pathol.* 1970, 7: 289-320.
3. PEÑA, L., DE ANDRES, P. J., CLEMENTE, M., CUESTA, P., PEREZ-ALENZA, M. D. Pronostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. *Vet Pathol.* 2013, 50: 94-105.
4. MAC VEAN, D.. Frequency of canine and feline tumors in a defined population. *Vet Pathol.* 1978, 15: 700-715.
5. MIALOT, J., ANDRÉ, F., MARTIN, P., COTARD, D., RAYNAUD, J., Étude de récepteurs des hormones stéroïdes dans les tumeurs mammaires de la chienne II : corrélations avec quelques caractéristiques cliniques. *Recueil Médecine Vétérinaire* 1982, 158: 513-517.
6. VAN GARDEREN, E., DE WIT, M., VOORHOUT, W., RUTTEMAN, G., MOL, J., NEDERBRAGT, H., y MISDORP, W. Expresión of growth hormona in canine mammary tissue and mammary tumors: evidence for a potencial autocrine/paracrine stimulatory loop. *Am J Pathol.* 1997, 150: 1037-1047.
7. DONNAY, I. DEVLEESCHOWER, N., WOUTERS-BALLMAN, P., LECLERQ, G. y VERSTEGEN J. Relationship between receptors for epidermal growth factor and steroid hormones in normal, dysplastic y neoplastic canine mammary tissues. *Res Vet Sci.* 1996, 60: 251-254.
8. RUTTEMAN, G. Hormones and mammary tumour disease in the female dog. An update. *In Vivo.* 1990, 4: 33-40.
9. GOLDSCHMIDT, M., PEÑA, L., RASOTTO, R., and ZAPPULLI, V. Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. *Vet Pathol* 2011, 48: 117-131.

10. HELLMÉN, E., BERGSTRÖN, R., HOLMBERG, L., SPLINGBERG, I., HANSSON, K. y LINDGREN, A. Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Vet Pathol* 1993, 30: 20-27.
11. PEREZ, M., PEÑA, L., DEL CASTILLO, N., y NIETO, I. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *J Small Anim Pract.* 2000, 41: 287-291.
12. PRIESTER, W., MCKAY, F.. The occurrence of tumors in domestic animals. *Natl. Cancer Inst. Monog.* 1980, 54: 1-210.
13. THEILEN, G., MADEWELL, B. Tumors of the mammary gland. *Veterinary Cancer Medicine.* 2da ed. Ed. Gordon Theilen y Bruce Madewell. U.S.A. Philadelphia. 1987, 326-344.
14. CASSALI, G. D., GOBBI, H., MALM, C. and SCHMITT, F. C. Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumours: comparative features with human tumours. *Cytopathology* 2007, 18: 191–196.
15. CHOI, YD., CHOI, Y.H., LEE, J.H. ET AL. Analysis of fine needle aspiration cytology of the breast: a review of 1,297 cases and correlation with histologic diagnoses. *Acta Cytol*, 2004, 48: 801–806.
16. SIMON, D., SCHOENROCK, D., NOLTE, I., BAUMGÄRTNER, 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: 521–528.
17. YILDIRIM, F., GUREL, A. Comparison between cytological and histopathological evaluations of canine mammary tumours. *Revue Méd Vét.* 2012, 163: 116-122.
18. SIMEONOV, R. & STOIKOV, D. Study on the correlation between the cytological and histological tests in the diagnostics of canine spontaneous mammary neoplasms. *Bulg. J. Vet. Med.* 2006, 9: 211–219.
19. KHANNA, A.K., SINGH, M.R., KHANNA, S., KHANNA, N.N. Fine needle aspiration cytology, imprint cytology and tru-cut needle biopsy in breast lumps: a comparative evaluation; *J.I.M.A.* 1991, 89: 192-195.

20. SUEN, K. C., WOOD, W. S., SYED, A. A., QUENVILLE, N. F. AND CLEMENT, P. B. Role of imprint cytology in intraoperative diagnosis: value and limitations
From the Division of Surgical Pathology, Department of Pathology, Vancouver General Hospital, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada. *J. Clin. Pathol*, 1978, 31: 328-337.
21. SONTAS BH, YÜZBASIOGLU G, TOYDEMIR T, ARUN S and EKICI H. Fine-Needle Aspiration Biopsy of Canine Mammary Gland Tumours: A Comparison Between Cytology and Histopathology. *Reprod Dom Anim* 2012, 47: 125–130.
22. PATHMANATHAM, N., et al. Ki67 and proliferation in breast cancer. *J Clin Pathol* 2013, 66: 512-516.
23. RASOTTO, R., ZAPPULLI, V., CASTAGNARO, M. and GOLDSMITH. A retrospective study of those histopathologic parameters predictive of invasion of the lymphatic system by canine mammary carcinomas. *Vet pathol* 2012, 49: 330-340.
24. NIETO L, PEÑA, M, D PÉREZ-ALENZA M, SÁNCHEZ A, FLORES J and CASTAÑO M. Immunohistologic Detection of Estrogen Receptor Alpha in Canine Mammary Tumors: Clinical and Pathologic Associations and Prognostic Significance. *Vet Pathol*, 2000, 37: 239-247.
25. CATÁLOGO DE DAKO <http://www.dako.com/products>.
26. BOSTOCK, D. E., MORIARTY, J. and CROCKER, J. Correlation between histologic diagnosis mean nucleolar organizer region count and prognosis in canine mammary tumors. *Vet Pathol* 1992, 29: 381-385.
27. FERREIRA, H. GOBBI, B. S. SARAIVA and G. D. CASSALI. Histological and immunohistochemical identification of atypical ductal mammary hiperplasia as a preneoplastic marker in dogs. *Vet Pathol* 2012, 49: 322-329.
28. CLEMENTE, M., PÉREZ- ALENZA, M. D., IIIERA, J. C. and PEÑA, L. Histological, immunohistological, and ultrastructural description of vasculogenic mimicry in canine mammary cáncer. *Vet Pathol*. 2010, 47: 265-274.
29. OKADA, H., NISHIUMA, Y., YOSHINO, T., GRONE, A., CAPEN, C., y ROSOL, T. Immunohistochemical localization of parathyroid hormone related protein in canine mammary tumors. *Vet Pathol*. 1997, 34: 356-359

30. VALERO, G., Diagnóstico Veterinario 2ª Edición. Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, A. C., Mexico D.F., 1997.
31. DÍAZ, H.T., JUÁREZ, G. Manual de tinciones especiales, Laboratorio de Histopatología FMVZ-UNAM.
32. TAPIA, M., ImageJ para microscopía; Unidad de microscopía, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Mayo, 2013.
33. Workshop: Image processing and analysis with ImageJ and MRI Cell Image Analyzer. Montpellier RIO Imaging, Volker Baecker; 30.04.2010.
34. LANDIS, J.R., KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977, 33: 159-174.
35. Salas, A.Y., Rivera, R.L., Romero, R.L. Correlación cito-histológica y alteraciones sanguíneas en perras con neoplasias mamarias. Estudio retrospectivo enero 2011 - agosto 2012. Departamento de Patología. FMVZ- UNAM.
36. BAKER, R. & LUMSDEN, J. Introduction of cytological interpretation. In: *Color Atlas of Cytology of the Dog and Cat*, eds. Baker R. & J. Lumsden, Mosby, USA, , 2000 pp.721.
37. SONTAS, B.H., YÜZBASOGLU, O. G., TOYDEMIR, T.F., ARUN, S.S. AND EKICI, H. Fine-Needle Aspiration Biopsy of Canine Mammary Gland Tumours: A Comparison between Cytology and Histopathology. *Reprod Dom Anim*. 2012, 47: 125–130.
38. GR. Mammary tumors in the dog. Kessler M, ed: *Small Animal Oncology*. Berlin, Germany: Parey; 2000: 261–272.
39. ALLEN, S.W., PRASSE, K.W., MAHAFFEY, E.A. Cytologic differentiation of benign from malignant canine mammary tumors. *Vet Pathol*. 1986; 23: 649–655.
40. MENARD, M. AND PAPAGEORGES, M.. Fineneedle biopsies: how to increase diagnostic yield. *Compendium on Continuing Education for Practice Veterinarian*, 1997, 19: 738-740.

FIGURAS Y CUADROS

CUADRO 1. ESCALA DE VALORACIÓN DE LA CONCORDANCIA; LANDIS Y KOCH.

ESCALA DE VALORACIÓN DE CONCORDANCIA	GRADO DE ACUERDO
< 0,00	SIN ACUERDO
>0,00 - 0,20	INSIGNIFICANTE
0,21 - 0,40	DISCRETO
>0,41 - 0,60	MODERADO
0,61 - 0,80	SUSTANCIAL
0,81 - 1,00	CASI PERFECTO

CUADRO 2. COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO DE LAS NEOPLASIAS MAMARIAS EN PERRAS

DIAGNÓSTICO	BENIGNO	MALIGNO	TOTAL
Citología	14 (46.6%)	16 (53.3%)	30 (100%)
Biopsia	11 (36.6%)	19 (63.3%)	30 (100%)

CUADRO 3. CORRELACIÓN CITO-HISTOLÓGICA SEGÚN EL COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO DE LAS NEOPLASIAS MAMARIAS EN PERRAS

		HISTOLOGÍA		
		Positivo	Negativo	Total
CITOLOGÍA	Positivo	VP 10 (33.3%)	FP 6 (20%)	16 (53.3%)
	Negativo	FN 1 (3.3%)	VN 13 (43.3%)	14 (46.6%)
	Total	11 (36.6)	19 (63.2%)	30 (100%)

VP: Verdadero positivo; VN: Verdadero negativo; FP: Falso positivo; FN: Falso negativo

CUADRO 4. CORRELACIÓN DEL COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO Y EL ÍNDICE KI67 EN LAS NEOPLASIAS MAMARIAS EN PERRAS

		Índice Ki67		
		Bajo	Alto	Total
Comportamiento biológico	Benigno	8 (26.6%)	3 (10%)	11 (36.6%)
	Maligno	7 (23.3%)	12 (40%)	19 (63.3%)
	Total	15 (50%)	15 (50%)	30 (100%)

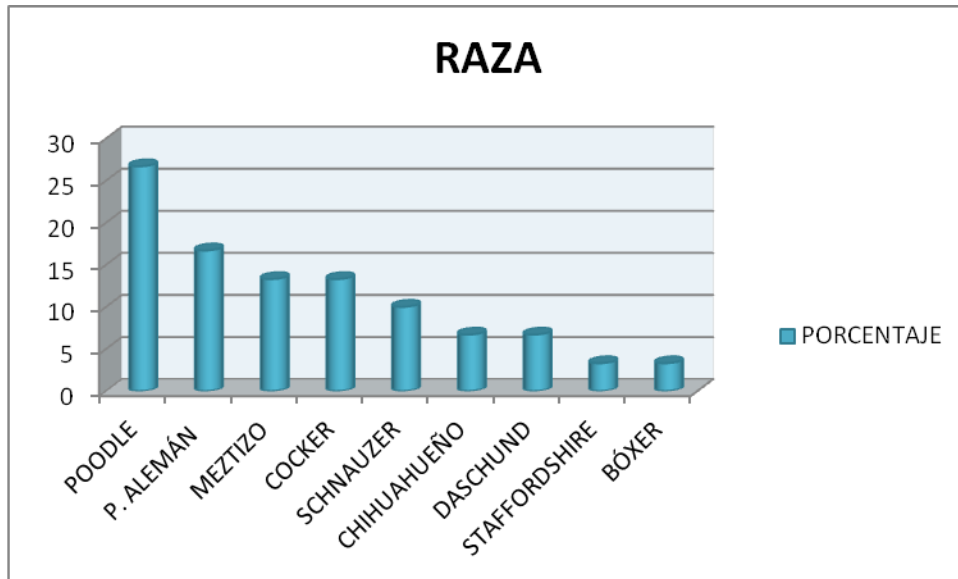


Gráfico 1. PORCENTAJE DE LAS RAZAS MÁS AFECTADAS

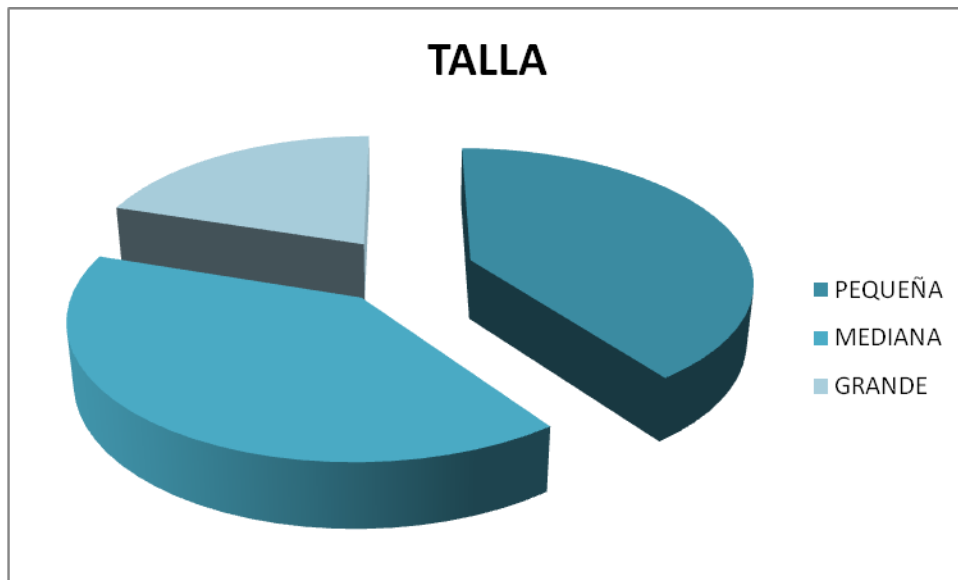


Gráfico 2. FRECUENCIA DE NEOPLASIA MAMARIA SEGÚN LA TALLA

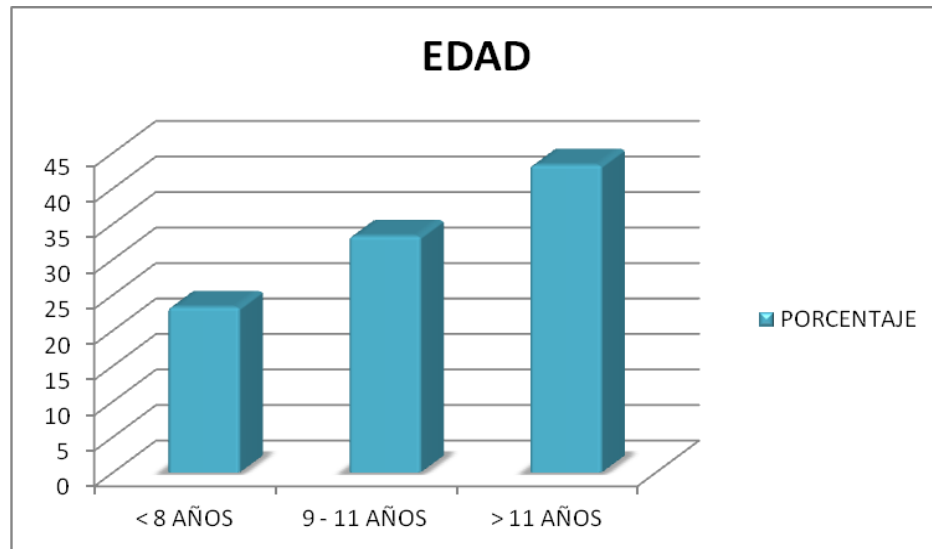


Gráfico 3. FRECUENCIA DE LAS NEOPLASIAS MAMARIAS SEGÚN LA EDAD

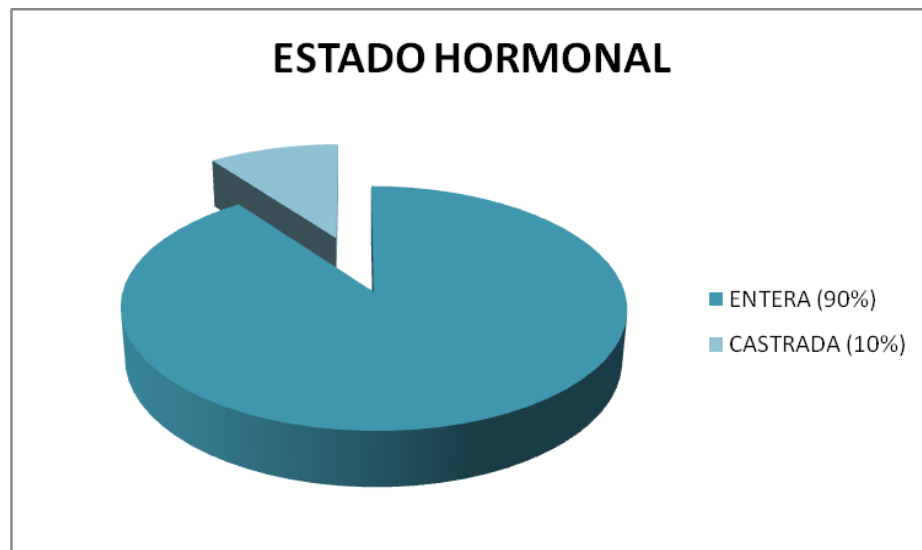


Gráfico 4. ESTADO HORMONAL DE LAS PERRAS CON TUMOR MAMARIO.

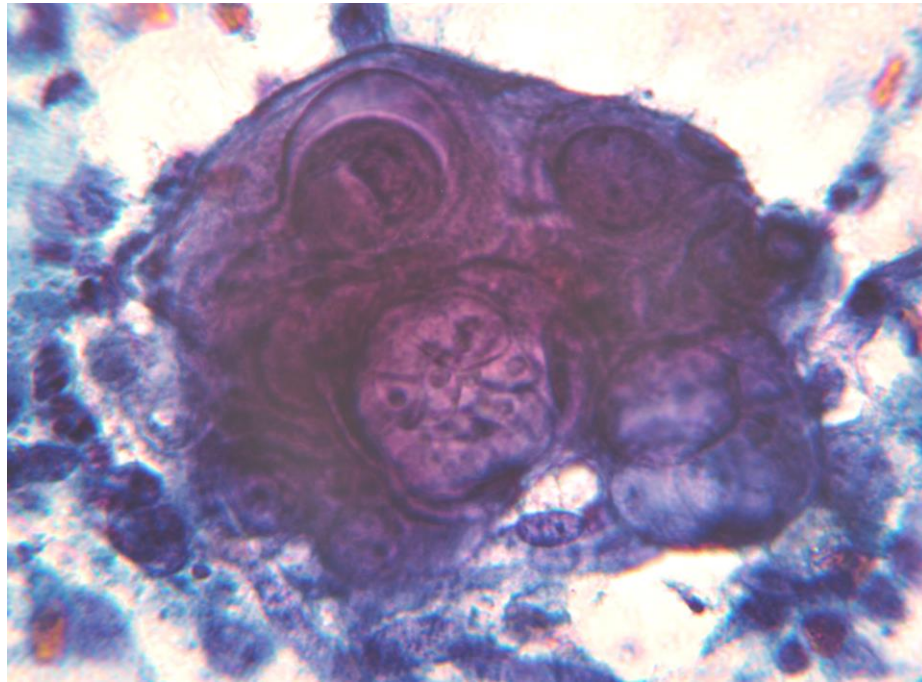


Imagen 1. Células atípicas dispuestas en mórula. Muestran canibalismo, reforzamiento de la membrana citoplasmática, citoplasma vacuolado e indentaciones nucleares, en un adenoma complejo. PAP, 100x.

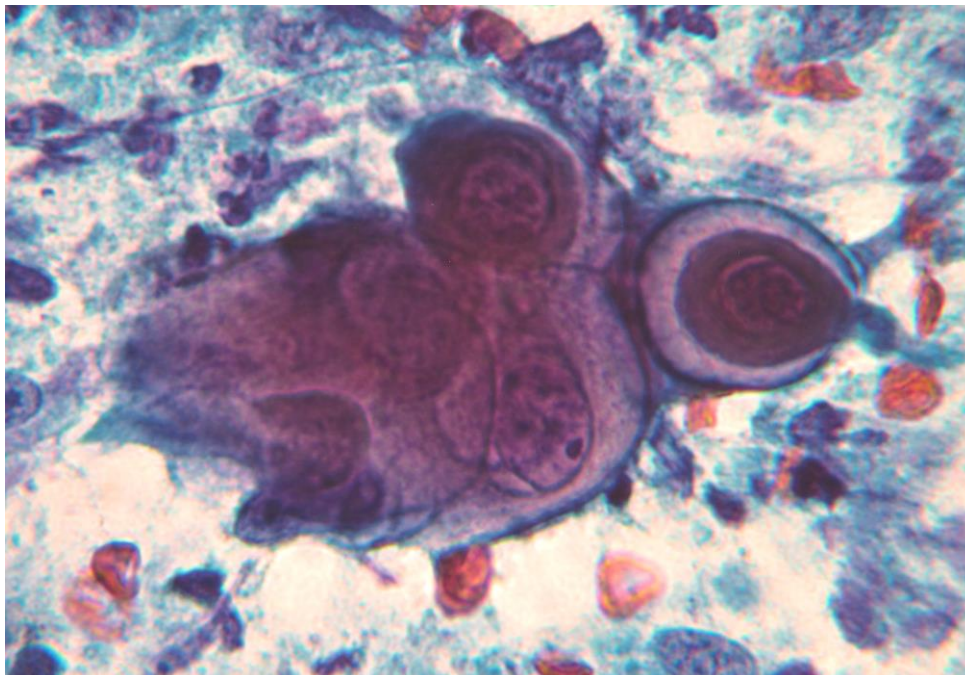


Imagen 2. Células epiteliales pleomórficas, con reforzamiento citoplasmático, moldeamiento nuclear, cromatina gruesa, múltiples nucléolos, de un adenoma complejo. PAP, 100x.

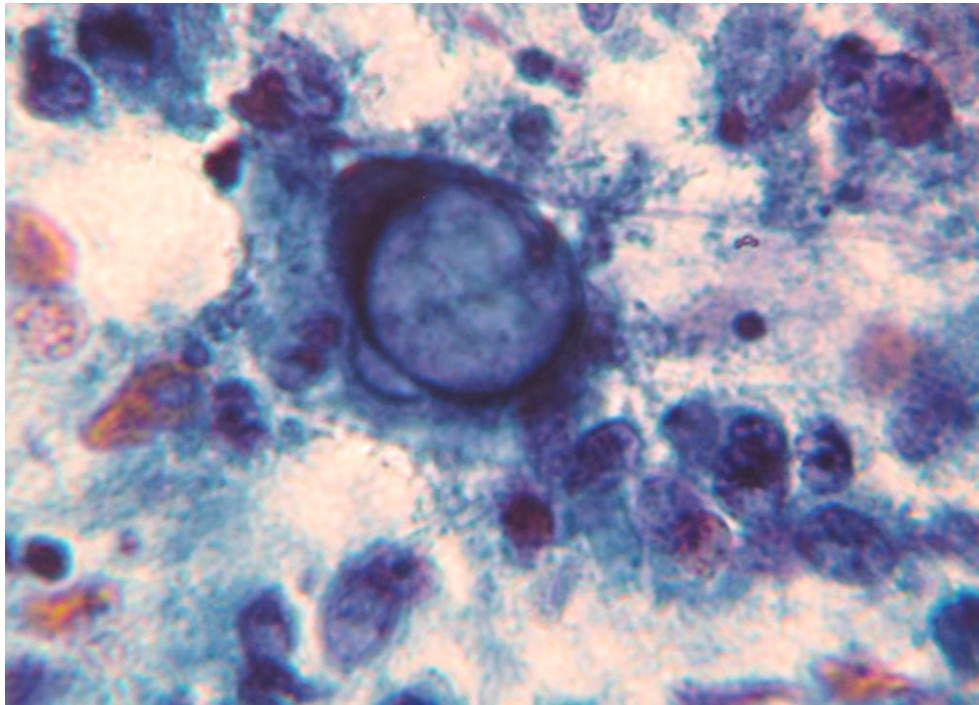


Imagen 3. Célula en anillo de sello de un carcinoma tubulopapilar. PAP, 100x.

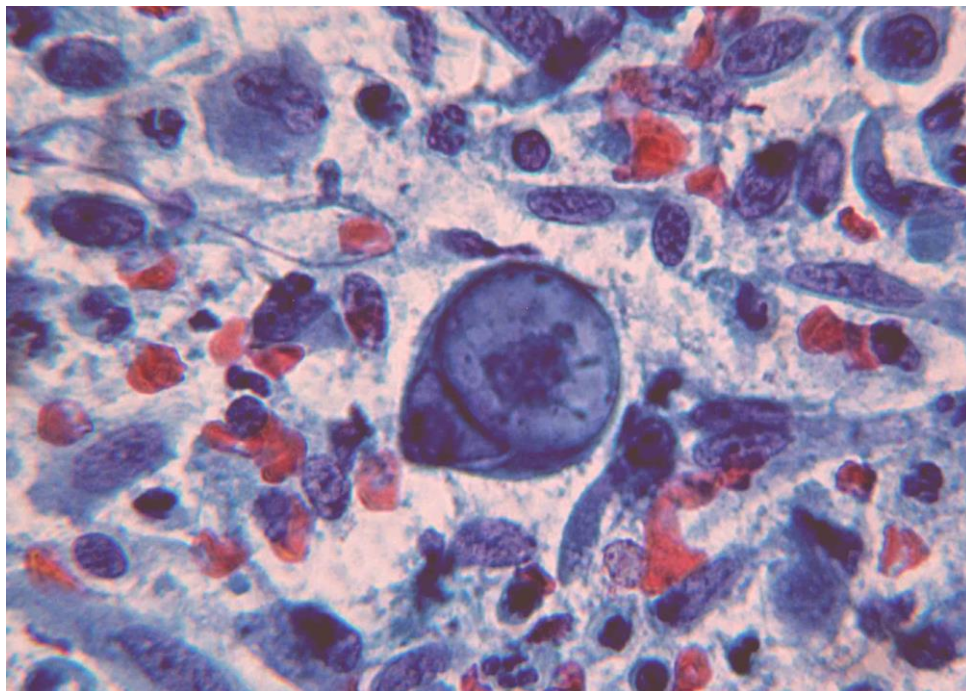


Imagen 4. Canibalismo celular, de un osteosarcoma. PAP, 100x.

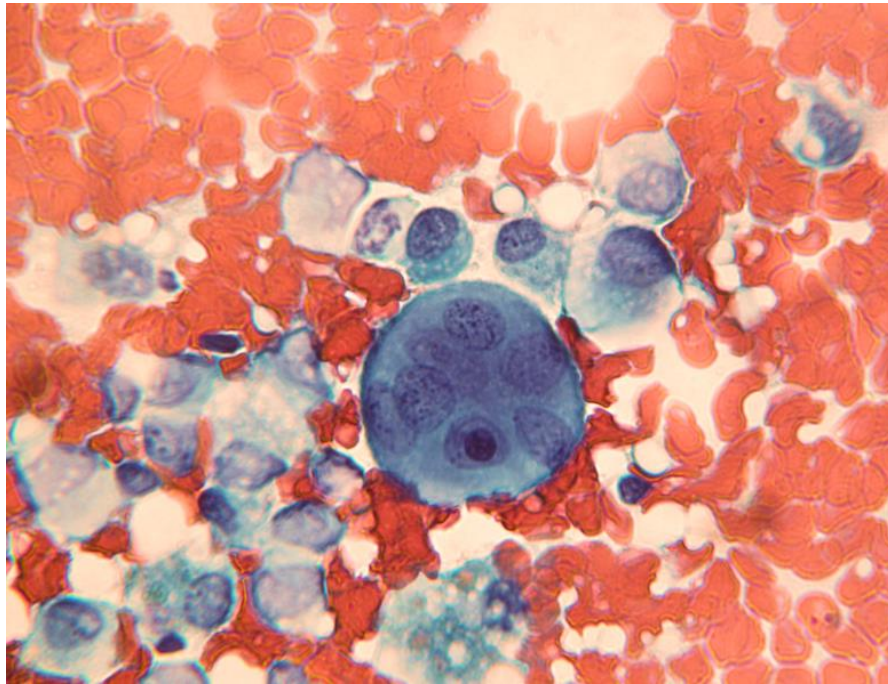


Imagen 5. Osteoblastos asociados a un osteoclasto en un fondo hemorrágico de un osteosarcoma. PAP, 100x.

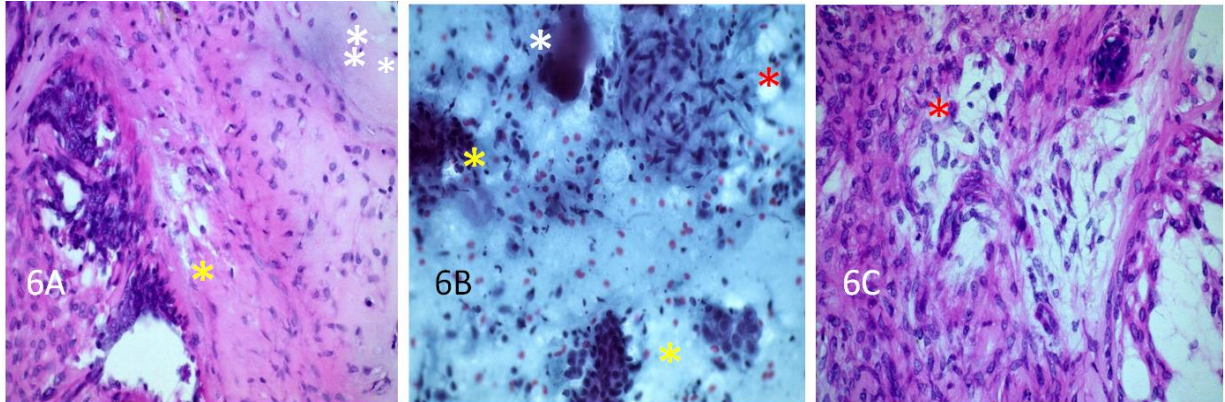
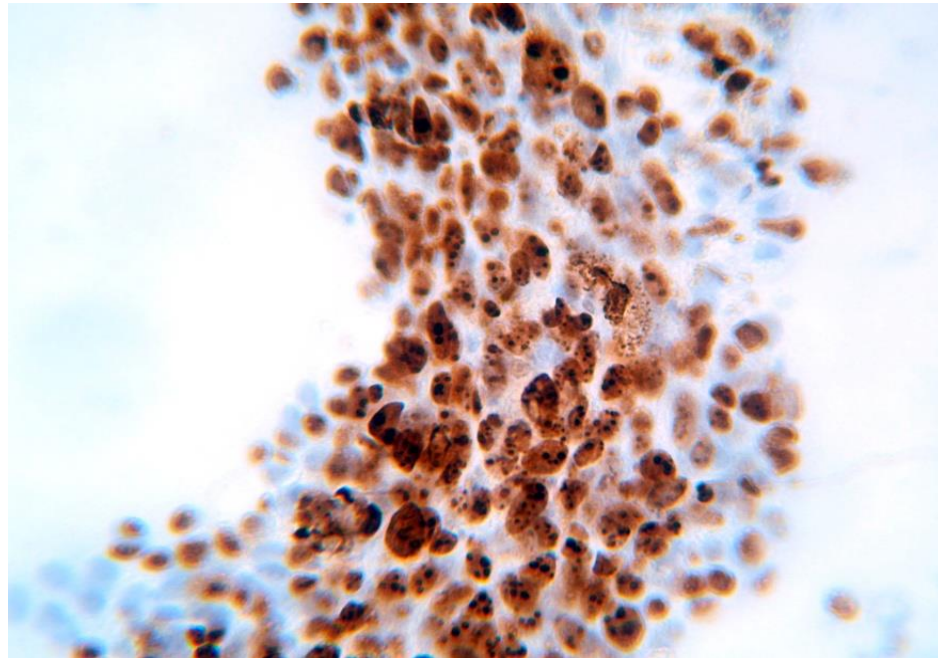
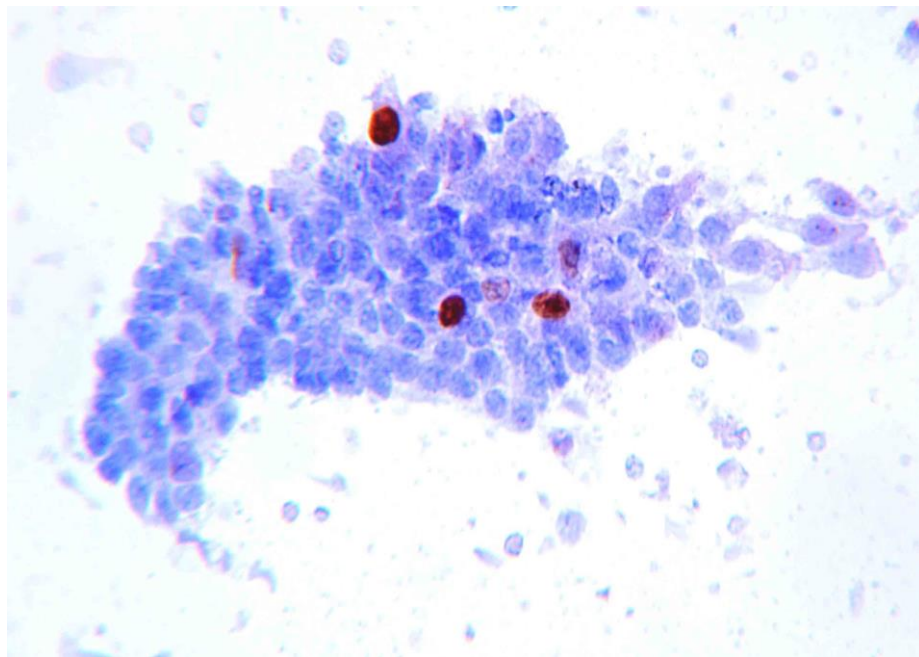


Imagen 6. Correlación cito-histológica. A. Carcinoma tipo mixto (H&E, 40x). B. Imagen citológica donde se observa heterogeneidad celular (PAP, 40x). C. Carcinoma complejo (H&E, 40x). Los asteriscos indican la correlación cito-histológica de las imágenes (amarillo: células epiteliales, blanco: matriz extracelular, rojo: células mioepiteliales).



**Imagen 7. Índice de proliferación alto en un carcinosarcoma.
Tinción inmunocitoquímica para Ki67, 40x.**



**Imagen 8. Adenoma mamario simple con índice de proliferación bajo.
Tinción inmunocitoquímica para Ki67, 40x.**

Hoja de datos 1. Recolección de los casos evaluados en el estudio.

N°	CASO	DIAGNOSTICO CITOLOGICO (PATOLOGO1)	DIAGNOSTICO CITOLOGICO (PATOLOGO 2)	DIAGNOSTICO CITOLOGICO CONSENSO	DIAGNOSTICO HISTOLOGICO	CORRELACION CITO-HISTOLOGICA	COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO	INDICE Ki67	RAZA	EDAD (AÑOS)	ESTADO HORMONAL
1	PI13-0942	Lesión mesenquimal maligna	Lesión mesenquimal maligna	Lesión mesenquimal maligna	Quiste seroso	Positiva	Maligno	78.7	Poodle	13	Entera
2	PI13-0578	Lesión epitelial maligna y mesenquimal benigna	Lesión epitelial benigna	Lesión epitelial maligna y mesenquimal benigna	Adenoma complejo	Positiva	Benigno	10.2	Pastor alemán	7	Entera
3	PI14-0254-A	Lesión epitelial y mesenquimal maligna	Lesión mesenquimal maligna	Lesión epitelial y mesenquimal maligna	Quiste seroso	Positiva	Maligno	69.0	Schnauzer	10	Entera
4	PI3-2253	Lesión epitelial maligna	Lesión epitelial maligna	Lesión epitelial maligna	Carcinoma tubulopapilar	Positiva	Maligno	71.1	Maztizo	7	Entera
5	PI3-2384	Lesión epitelial maligna y mesenquimal benigna	Lesión epitelial maligna y mesenquimal benigna	Lesión epitelial maligna y mesenquimal benigna	Carcinoma complejo	Positiva	Maligno	30.8	Maztizo	10	Entera
6	PI3-2568	Lesión epitelial maligna	Lesión epitelial maligna	Lesión epitelial maligna	Quiste seroso	Negativa	Maligno	39.0	Chihuahua	9	Entera
7	PI3-2883	Lesión epitelial maligna	Lesión epitelial maligna	Lesión epitelial maligna	Carcinoma atípico	Positiva	Maligno	18.9	Poodle	16	Entera
8	PI3-3015-A	Lesión epitelial maligna y mesenquimal benigna	Lesión epitelial maligna	Lesión epitelial maligna y mesenquimal benigna	Adenoma complejo	Negativa	Benigno	19.5	Poodle	10	Entera
9	PI3-3015-B	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Adenoma complejo	Positiva	Benigno	19.7	Poodle	10	Entera
10	PI3-3015-C	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Tumor mixto benigno	Positiva	Benigno	10.7	Poodle	10	Entera
11	PI3-3373	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Lesión epitelial benigna	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Carcinoma sólido	Negativa	Maligno	36.9	Maztizo	7	Entera
12	PI3-3606-C	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Lesión epitelial benigna	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Tumor mixto benigno	Positiva	Benigno	40.6	Schnauzer	15	Entera
13	PI3-3606-A	Lesión epitelial benigna	Lesión epitelial benigna	Lesión epitelial benigna	Carcinoma sólido	Negativa	Maligno	15.7	Schnauzer	15	Entera
14	PI3-3978	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Adenoma complejo	Positiva	Benigno	23.3	Cocker	11	Entera
15	PI3-4066	Lesión epitelial maligna y mesenquimal benigna	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Lesión epitelial maligna	Carcinoma tubulopapilar	Positiva	Maligno	85.1	Staffordshire	11	Entera

16	P13-4081-F	Lesión epitelial y mesenquimal maligna	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Lesión epitelial y mesenquimal maligna	Carcinoma simple	Positiva	Maligno	25.4	Cocker	9	Entera
17	P13-4364	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Lesión epitelial benigna	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Carcinoma tubulopapilar	Negativa	Maligno	10.6	Pastor alemán	8	Entera
18	P13-4552	Lesión epitelial maligna	Lesión epitelial maligna	Lesión epitelial maligna y mesenquimal maligna	Carcinoma simple	Positiva	Maligno	48.2	Cocker	8	Entera
19	P13-4560-A	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Adenoma complejo	Positiva	Benigno	8.3	Cocker	9	Entera
20	P13-4621	Lesión epitelial benigna	Lesión epitelial benigna	Lesión epitelial benigna	Adenoma simple	Positiva	Benigno	48.9	Chihuahua	8	Entera
21	P13-4749-D	Lesión epitelial maligna y mesenquimal maligna	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Lesión epitelial maligna y mesenquimal maligna	Osteosarcoma	Positiva	Maligno	34.1	Dachshund	14	Entera
22	P13-4839	Lesión epitelial benigna y mesenquimal benigna	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Lesión epitelial benigna y mesenquimal benigna	Tumor mixto benigno	Positiva	Benigno	25.0	Poodle	12	Entera
23	P13-5091	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Adenoma complejo	Positiva	Benigno	17.2	Martino	4	Entera
24	P13-5123-A	Lesión epitelial y mesenquimal maligna	Lesión epitelial y mesenquimal maligna	Lesión epitelial y mesenquimal maligna	Carcinoma complejo	Positiva	Maligno	29.9	Pastor alemán	14	Castrada
25	P13-5123-B	Lesión epitelial y mesenquimal maligna	Lesión epitelial benigna	Lesión epitelial y mesenquimal maligna	Carcinoma complejo	Negativa	Maligno	4.1	Pastor alemán	14	Castrada
26	P13-5254-A	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Carcinoma tipo mixto	Negativa	Maligno	9.9	Poodle	11	Entera
27	P13-5254-B	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Carcinoma complejo	Negativa	Maligno	32.2	Poodle	11	Entera
28	P13-5819	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Lesión epitelial y mesenquimal benigna	Adenoma complejo	Positiva	Benigno	35.7	Dachshund	13	Castrada
29	IP14-272-B	Lesión epitelial maligna	Lesión epitelial maligna	Lesión epitelial maligna	Carcinoma complejo	Positiva	Maligno	49.8	Pastor alemán	NR	Entera
30	IP14-364-A	Lesión epitelial maligna	Lesión epitelial maligna	Lesión epitelial maligna	Carcinoma complejo	Positiva	Maligno	25.2	Boxer	NR	Entera