



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**INCORPORACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES EN EL
DIAGNÓSTICO, CLASIFICACIÓN Y PRONÓSTICO DEL CÁNCER
DE MAMA EN PERRAS**

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

YARITZA JOSEFINA SALAS ARAUJO

TUTOR PRINCIPAL

Laura Patricia Romero Romero
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

COMITE TUTOR

Rogelio Alonso Morales
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Enrique Aburto Fernández
University of Prince Edward Island. Canada

MEXICO, CD.MX. MAYO 2016



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.

DEDICATORIA

Este logro lo dedico a mi esposo Adelys Antonio, a mis hijos Santiago y Maia Itzel
y a mis queridos e incondicionales padres

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios que guía mis pasos

A mis padres por enseñarme el valor de la vida

A mi tutora Laura Romero porque además de ser soporte indispensable en el logro de esta meta, me ha brindado su amistad y calidez humana

Al comité tutor por su oportuna y acertada orientación

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – UNAM por brindarme las herramientas necesarias para lograr esta meta.

A la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”, mi casa de estudios.

DATOS BIOGRÁFICOS

Yaritza Josefina Salas Araujo

Profesor Asociado de pre y posgrado del Decanato de Ciencias Veterinarias (DCV) de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA).
Barquisimeto estado Lara, Venezuela, 2003 -2015.

Fecha y lugar de nacimiento: 01 de diciembre de 1977, Valera estado Trujillo,
Venezuela.

Grados Académicos: Médico Veterinario (DCV-UCLA, 2001), Magister Scientiarum en Medicina y Cirugía de Pequeños Animales (DCV-UCLA, 2008),
Diplomado en Citología Veterinaria (FMVZ-UNAM, 2013).

CONTENIDO

	Pag
Resumen	7
Abstract	9
Abreviaturas	10
Introducción	11
Revisión de la literatura	15
Receptor de Estrógenos	15
Oncogén erbB2	19
Índice de proliferación ki67	21
Clasificación molecular	23
CD31	25
Gen de susceptibilidad al cáncer de mama	26
Referencias	31
 CAPITULO I	 38
Estudio epidemiológico del tumor mamario en perras diagnosticadas durante el periodo 2002-2012: Un problema creciente de salud animal	
 Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem	
 CAPITULO II	 54
Asociación de características histológicas con los posibles factores de riesgo y la sobrevivida en tumores mamarios caninos	
 Association of histological features with potential risk factors and	

survival in canine mammary tumors

CAPITULO III	70
El Uso de Biomarcadores y Clasificación Molecular como un Indicador Pronostico en Pacientes con Tumor Mamario Canino en México	
Resumen	71
Introducción	72
Metodología	74
Resultados	
• Densidad microvascular	80
• Expresión del Reα	80
• Expresión del erbB2	82
• Índice de proliferación celular (% ki67)	83
• Clasificación del sub-tipo molecular	85
• Análisis de sobrevida	87
Discusión	89
Conclusion	93
Referencias	94
CAPITULO IV	97
Expresión del gen <i>BRCA 1</i> y <i>2</i> en neoplasias mamarias de perras y su asociación con parámetros clínico-patológicos	
Resumen	98
Introducción	99
Metodología	101
Resultados	
• Expresión del <i>BRCA 1</i> y <i>2</i> en el tumor mamario	104
• Asociación de la expresión del <i>BRCA 1</i> y <i>2</i> con parámetros	107

clínico-patológicos	
Discusión	109
Conclusión	112
Referencias	113
Discusión general	115
Conclusiones generales	119
Referencias	120
Anexos	122

RESUMEN

Los tumores de glándula mamaria son las neoplasias más comunes en perras no castradas. Con el fin de aportar herramientas que fortalezcan la oncología veterinaria, definir las características del tumor mamario y consolidar el uso de biomarcadores en el cáncer de mama en perras como soporte para ampliar las oportunidades de tratamiento de esta enfermedad; en este estudio se planteó como objetivo general establecer aspectos epidemiológicos del tumor mamario canino e incorporar biomarcadores en su diagnóstico, clasificación y pronóstico, en perras diagnosticadas. El cual se ejecutó en seis objetivos específicos, planteados en cuatro capítulos. En este estudio se pudo observar que el tumor mamario canino tiene una incidencia alta, con presentación similar de neoplasias benignas y malignas, mostrando las malignas un incremento en los últimos años del estudio. En los últimos 14 años las razas más comúnmente afectadas por tumor mamario canino son el Poodle, Cocker Spaniel, Pastor Alemán y Labrador Retriever; con mayor predisposición en perras adultas gerontes y con un alto riesgo de malignidad en las perras gerontes y las mestizas. Por otra parte, no se demostró que la paridad está directamente relacionada con la predisposición a la enfermedad. Se evidenció como factor de mal pronóstico el tamaño del tumor y la infiltración vascular. Asimismo, entre los tumores malignos de peor pronóstico se encontró el carcinosarcoma, osteosarcoma, comedocarcinoma y el carcinoma sólido y de los menos agresivos el carcinoma tipo mixto, carcinoma tubulopapilar y el carcinoma complejo. Por otra parte, el Ki67 y RE α son marcadores pronósticos por excelencia, el ki67 es de gran utilidad en la clasificación del subtipo molecular. Se encontró que la expresión del *BRCA 1* y *2* resulta heterogénea en cada paciente, su estudio se puede enfocar en aquellas razas con clara predisposición a la enfermedad y correlacionar mutaciones específicas con la expresión del gen puede resultar útil para el pronóstico en la clínica veterinaria. A la vez se podría definir las razas más adecuadas como modelo animal para el estudio del cáncer de mama en mujeres. Así mismo, el tumor mamario canino es heterogéneo en cuanto a morfología y expresión molecular, por lo que la oncología veterinaria debe apuntar al diagnóstico individualizado procurando una terapéutica más adecuada con el fin de mejor calidad de vida a las pacientes.

Palabras claves: Tumor mamario canino, Biomarcadores, *BRCA 1/2*, epidemiología, sobrevida

ABSTRACT

Mammary tumors are the most common malignant neoplasms in intact female dogs. In order to contribute with tools that strengthen veterinary oncology, such as to define specific characteristics of these tumors in female dogs, and to consolidate the use of biomarkers in the diagnosis of the disease to support the therapy each patient is going to received, the aim of this study was to stablish epidemiological aspects of the mammary tumor in our canine population, and to incorporate biomarkers for the diagnosis, clasification and prognosis in female dogs diagnosed in the Department of Pathology of the FMVZ-UNAM. The project covered six specific objectives integrated in four Chapters. In the study we observed that canine mammary tumor exhibits a high incidence, with a similar presentation between benign and malignant neoplasms, even though malignant tumors showed an increase during the last years of the study. The Poodle, Cocker spaniel, German sheperd and Labrador retriever were the breeds more commonly affected, with higher predisposition in elderly bitches, and a higher risk of malignancy in elderly and crossbreed dogs. In our study, we could not demonstrate that parturition is related with the presentation of the disease, but we proved that the size of the tumor is directly related with malignancy and vascular invasión, likewise, the carcinosarcoma, osteosarcoma, comedocarcinoma and solid carcinoma, were the malignant neoplasias with worst prognosis; among the less aggressive tumors we found the carcinoma-mixed type, the tubulopapillary carcinoma and the complex carcinoma. Also, this study proves that Ki67 y RE α are golden pronostic markers, Ki67 being useful for the classification of the molecular subtype. It was found that BRCA1 and 2 expression is heterogenous in each patient; its study should focus on breeds with obvious predisposition to the disease. To correlate specific mutations with gene expression could be useful to stablish the prognosis in canine patients, but also to define appropriate breeds as animal models for the study of the disease in women. As to morphology and molecular expresión, canine mammary tumors are highly heterogenous, so that veterinary oncology most work towards individualized diagnosis to secure the best treatment with the purpose to improve life quality for every patient.

Key words: Canine Mammary Tumor, Epidemiology, Biomarkers, BRCA 1/2, survival.

ABREVIATURAS

AC: Adenomas complejos

API: Adenoma papilar intraductal

AS: Adenoma simple

BRCA: *Breast cáncer*

CARS: Carcinosarcoma

CC: Carcinomas complejo

CD31: Cúmulo de diferenciación 31 o *Platelet endothelial cell adhesion molecule* (PECAM-1)

COMD: Comedocarcinoma

CS: Carcinoma simple (carcinomas tubular, tubulopapilar, quisticopapilar y cribiforme)

CSD: Carcinoma solido

CTE: Carcinomas especiales (carcinoma inflamatorio, rico en lípidos y el adenoescamoso)

CTM: Carcinomas tipo mixto

DMV: Densidad microvascular

DSBs: Rupturas del DNA de doble cadena

ErbB2: erb-b2 receptor tyrosine kinase 2

FA: Fibroadenoma

HR: Recombinación homóloga

Ki-67: proteína ki-67

RE: Receptor de estrógeno

SAR: Sarcomas

TMB: Tumores mixtos benignos

TMC: Tumor mamario canino

INTRODUCCIÓN

Las neoplasias originadas a partir de la glándula mamaria representan en Medicina Veterinaria la forma más común de enfermedad neoplásica en perras enteras. Varían en tamaño desde unos pocos milímetros hasta unos cuantos centímetros, y al menos el 50% de los casos presentan masas múltiples, principalmente en las glándulas caudales (Wey *et al.*, 2000). Histológicamente, se clasifican en neoplasias epiteliales malignas, tipos especiales de neoplasias epiteliales, neoplasias mesenquimales malignas, carcinosarcoma y neoplasias benignas (Goldschmidt *et al.*, 2011).

Las causas del cáncer de mama se enmarcan en causas de origen genético y no genético; en relación a las causas genéticas se encuentran la activación de oncogenes así como el silenciamiento de genes supresores de tumor. Ambas alteraciones, en los oncogenes y genes supresores tumorales, trae como consecuencia aumento de la probabilidad de desarrollar un tumor (Narod y Rodríguez, 2011).

Entre los factores de riesgo asociados a las neoplasias de glándula mamaria en perras, se encuentra en primer lugar el sexo; es bien conocido que las hembras tienen predisposición de presentar esta enfermedad debido al tropismo por la glándula mamaria que presentan los estrógenos naturales (Yu FL *et al.*, 2002).

Estudios epidemiológicos frecuentemente reportan mayor susceptibilidad en animales de razas de talla pequeña, aunque se ha ido incrementando la presentación en animales de talla grande; las más reportadas incluyen al Poodle, Maltés, Chihuahua, Beagle, Yorkshire Terrier, Bichon Frise, Cocker Spaniel, Springer Spaniel Inglés, Setter, Hound y Pastor Alemán, entre otras (Bronden *et al.*, 2010).

Por otra parte, en el cáncer de mama en perras ha sido de utilidad evaluar el papel de los marcadores moleculares. Estos son considerados caracteres o

genes que debido al ligamiento puede usarse para indicar la presencia de otros genes, o cuya expresión permite un efecto cuantificable, observable y son detectados fácilmente (Solis y Andrade, 2005). Vinothini *et al.* (2009) analizaron marcadores moleculares implicados en la carcinogénesis mamaria en un modelo canino y observaron cambios en la expresión, evidenciando que el aumento de expresión de receptores de estrógeno (RE), estradiol, así como las proteínas implicadas en la proliferación celular, evasión de la apoptosis, la invasión y la angiogénesis, puede conferir una ventaja de crecimiento selectivo de los tumores mamarios caninos.

El incremento en los casos de enfermedad neoplásica en Medicina Veterinaria ejerce mayor demanda y desarrollo de la oncología veterinaria, tanto con fines diagnósticos como terapéuticos. Los estudios con enfoque epidemiológico son de gran ayuda y representan una importante fuente de información, que permite analizar el comportamiento de las enfermedades neoplásicas al transcurrir del tiempo, establecer factores de riesgo y criterios pronósticos a partir de características clínico-patológicas que aporten información científica de utilidad en estudios experimentales.

Asimismo, conocer el pronóstico de un paciente con cáncer permite, entre otras cosas, elegir la terapéutica más apropiada, evaluar la eficacia del tratamiento, la posible evolución, y manejar racionalmente las eventuales complicaciones que puedan aparecer en el curso de la enfermedad.

El auge de la oncología veterinaria, el desarrollo de aspectos epidemiológicos de la enfermedad, de técnicas diagnósticas y el uso de marcadores moleculares implica un beneficio sustancial tanto en los pacientes animales, como para pacientes humanos debido a su comportamiento similar, los tumores mamarios caninos han sido propuestos como modelo animal adecuado para el estudio del cáncer de mama en mujeres (Cassali *et al.*, 2006; Vinothini *et al.*, 2009).

Por lo antes expuesto y teniendo en cuenta la importancia del uso de marcadores moleculares en el diagnóstico, clasificación y pronóstico del cáncer de mama, así como la posibilidad de ampliar las oportunidades de tratamiento para este tipo de neoplasia en las perras, se plantea lo siguiente:

Hipótesis: La correlación epidemiológica, clasificación histológica y el uso de la expresión de biomarcadores moleculares en los tumores mamarios caninos permitirá establecer un pronóstico más preciso.

Objetivo General:

Establecer aspectos epidemiológicos del tumor mamario canino e incorporar biomarcadores en el diagnóstico, clasificación y pronóstico de perras diagnosticadas en el Departamento de Patología, de la FMVZ – UNAM.

Objetivos Específicos:

1. Investigar los antecedentes epidemiológicos en perras con tumor mamario diagnosticadas en el departamento de patología, de la FMVZ - UNAM.
2. Determinar los factores de riesgo (edad, raza, condición corporal, datos ginecológicos) de las pacientes con tumor mamario canino.
3. Clasificar las neoplasias mamarias caninas según parámetros clínico-patológicos tales como: número y tamaño de los tumores y tipo histológico.
4. Clasificar las neoplasias mamarias caninas mediante la identificación de biomarcadores moleculares (RE, erbB2, Ki67, CD31) y el sub-tipo molecular, a través de inmunohistoquímica.
5. Determinar los niveles de expresión por PCR en tiempo real de los genes *BRCA 1* y *2* en tejido mamario neoplásico.

6. Relacionar la expresión de los biomarcadores moleculares (ER, erbB2, Ki67, BRCA1/2) y el sub-tipo molecular, con las características clínico-patológicas en el tumor mamario canino.

REVISIÓN DE LA LITERATURA

Receptor de Estrógenos (RE) en el TMC

Entre los factores carcinogénicos asociados al desarrollo de cáncer de mama en perras se encuentran las hormonas sexuales; estudios previos reportan que las perras no castradas tienen 7 veces mayor predisposición de presentar neoplasias mamarias que las castradas (Schneider *et al.*, 1969). Estudios epidemiológicos en animales indican que el 17 beta-estradiol (E₂) está implicado en el cáncer de mama, sin embargo, el mecanismo no está claro, Yu *et al.* (2002) señalan que E₂ puede ser activado por epoxidación y obtiene la capacidad de inhibir la síntesis de ARN nuclear dependiente de ADN, y de unirse al ADN formando aductos, tanto *in vivo* como *in vitro*, ejerciendo así su papel como iniciador en la carcinogénesis del cáncer de mama.

Los estrógenos naturales, el 17 β Estradiol (E₂), Estron (E₁) y Estriol (E₃) son esteroides derivados del colesterol, la reacción es catalizada por el complejo enzimático P450 aromatasa. La primera fuente de estrógeno son las células de la granulosa y teca y las células luteales; las células de la teca secretan andrógenos que difunden a la granulosa donde es aromatizado a estrógenos, en el hígado el E₁ y E₃ son transformados en E₂, adicionalmente, con la edad se incrementa la síntesis extra-gonadal (Gruber *et al.*, 2002).

Los estrógenos estimulan el crecimiento celular, el flujo sanguíneo, la retención de líquido en los órganos reproductores y están involucrados en el cáncer de mama, endometrio y colon. En el hígado, los estrógenos incrementan los receptores a lipoproteínas resultando en una disminución de la concentración sérica de proteínas de baja densidad del colesterol y en la piel incrementan la síntesis de colágeno. En el tejido mamario los estrógenos tienen un efecto similar a la histamina en la microcirculación del tejido mamario, asimismo, estimulan el crecimiento y diferenciación del epitelio ductal, inducen actividad mitótica de las células cilíndricas ductales y estimulan el crecimiento del tejido conectivo (Yue *et al.*, 1999); por su parte, el sistema lobar depende de la secreción de progesterona;

cuando ambas hormonas se secretan de forma adecuada permiten el desarrollo de la glándula mamaria. La progesterona puede tener un efecto antagonista disminuyendo la reposición de los RE y la síntesis de 17 beta-hydroxysteroideshidrogenasa acelerando el metabolismo de E₂ y E₁, lo que hace suponer que largos periodos de una fase lútea puede conducir a un efecto estrogénico mantenido y ser promotor de la carcinogénesis mamaria (Mauvais-Jarvis P *et al.*, 1986). Las hormonas ováricas juegan un rol importante en el desarrollo y progresión de los tumores mamarios en perras y humanos, esto ha sido demostrado por el efecto protector de la ovario histerectomía (Hayden *et al.*, 1989).

Las hormonas esteroideas pueden actuar en una etapa temprana en el desarrollo de tumores mediante la estimulación de la proliferación de epitelio normal. Esto se traduce en un aumento en el número de células susceptibles, asimismo, la acción estimulante del crecimiento puede ser ejercida sobre las células que se han iniciado en la transformación neoplásica, este efecto posiblemente sea menor en las células ya transformadas o en la etapa tardía del desarrollo del tumor, es por ello que en cáncer de mama avanzado, los receptores de esteroides con frecuencia están ausentes, probablemente debido a un patrón autónomo de crecimiento neoplásico maligno; es por ello que en perras una vez detectado el cáncer de mama, no hay garantía de que la ovario histerectomía reducirá el riesgo de metástasis (Rutteman, 1992).

Los receptores de estrógeno pertenecen a la superfamilia de receptores hormonales, se conocen dos isoformas el α y el β , varían en su estructura y están codificados en cromosomas diferentes, la localización también varía; el RE β se encuentra en las células de la granulosa y espermátides inmaduras, también en tejidos no clásicos como pulmón, riñón, médula ósea, mucosa intestinal, hueso, cerebro, células endoteliales y próstata; en contraste el RE α se encuentra más comúnmente en endometrio, estroma ovárico y tejido mamario neoplásico (Enmark *et al.*, 1997). Los mecanismos de activación de ambos receptores son complejos, por ejemplo, el tamoxifen y relaxifen sirven como activadores de la

transcripción al formar complejos con el RE β , pero suprimen la transcripción al formar complejo con el RE α , por su parte el estradiol activa la transcripción al unirse al RE α , pero ejerce efecto opuesto al unirse al RE β (Paech *et al.* 1997).

En la mujer, la producción de estrógenos varía cíclicamente con el ciclo menstrual, la concentración sérica es mayor durante la fase folicular y pre-ovulatoria y más bajas en la fase lútea y premenstrual (Baird *et al.*, 1974). La variación cíclica del RE y RP ha sido observada en el tejido mamario en diferentes fases del ciclo estral en mujeres sanas y en cáncer mamario; Mohammad *et al.*, (2006) reportaron en tejido con cáncer de mama variación en la frecuencia de pacientes RE positivos, en la fase lútea temprana (80%) y folicular temprana (48%), folicular tardía (51.2%) y lútea tardía (48.9%). Por otra parte, se ha reportado que el cáncer mamario de mujeres post-menopaúsicas presenta mayor RE que las pre-menopaúsicas (Pujol *et al.*, 1998).

En perras, el estatus hormonal influye significativamente en la expresión de RE en el tejido mamario normal, las perras enteras tienen altas concentraciones de RE en la fase lútea del ciclo estral (69 +/- 62 fmol/mg), que perras ovariectomizadas (24 +/- 19 fmol/mg) y en anestro (38 +/- 45 fmol/mg) o en la fase folicular (13 +/- 7 fmol/mg), así mismo, la concentración de RE ha sido reportada significativamente más alta (46 +/- 47 fmol/mg vs 27 +/- 24 fmol/mg de proteína citosólica; P = 0.0002) en el tejido normal que en el neoplásico, así como en las glándulas caudales que en las axilares en el tejido normal; no reportan diferencias entre la edad, historia hormonal, número y localización de las lesiones (Donnay *et al.*, 1995). Cuando la concentración de E₂ en el cáncer de mama es alta, se debe a que ocurre aromatización *in situ*, independientemente de las concentraciones de estradiol (Yue *et al.*, 1999). Los diferentes patrones de expresión del RE pueden ser relevantes para la selección del sujeto que puede beneficiarse de la terapia hormonal y para estudios de protocolos terapéuticos basados en la administración de antagonistas de RE (Millanta *et al.*, 2010).

La estimulación de receptores para estrógenos o diferencias en los niveles de expresión, puede contribuir al desarrollo y comportamiento clínico de las

neoplasias mamarias en perras. En general, la hipótesis de la influencia del receptor de esteroides sobre la carcinogénesis mamaria se basa en la observación de que las perras esterilizadas en edad joven tienen una prevalencia menor de tumores mamarios (Sorenmo *et al.*, 2000). Aunque hay conflictos en la literatura, la mayoría de los estudios reportan una disminución en la expresión del receptor de estrógeno con el aumento en el grado de malignidad, en comparación con las glándulas normales (Chang *et al.*, 2009). Por lo tanto, las células en las neoplasias mamarias en perras al progresar en malignidad parecen ser cada vez más resistentes a los efectos estimulantes proliferativos estrogénicos.

Sin embargo, existe controversia en cuanto al valor pronóstico de los receptores de estrógenos, aunque autores han encontrado que estos receptores no fueron factores pronósticos en la supervivencia general (De Las Mulas *et al.*, 2005), otros autores encontraron disminución de estos y un incremento en receptores de progesterona asociado a peor comportamiento clínico en carcinomas caninos (Chang *et al.*, 2009).

Por otra parte se ha demostrado que los rodenticidas son contaminantes ambientales involucrados en el desarrollo de neoplasias, incluido el cáncer de mama (Environmental Protection Agency - EPA: Health Effect Division, 2006). El hecho de que en los últimos años se registre un aumento del número de diagnósticos malignos puede estar asociado a los hábitos de los dueños de las mascotas, que ocasionalmente las exponen a sustancias oncogénicas, tal como ocurre con los casos de neoplasias en humanos. Andrade *et al.* (2010) en su estudio observaron niveles de piretroides en el tejido adiposo adyacente a los tumores mamarios en 33,3% de los casos evaluados, tumores que a su vez mostraban mayor agresividad y concluyen que el incrementando en la casuística de tumores mamarios en las perras, probablemente se deba a la exposición continua a sustancias químicas.

Además, probablemente en el desarrollo de tumores mamarios en perras, al igual que en humanos, exista interacción entre la dieta, masa corporal y los

estrógenos. La dieta, la grasa y las hormonas se combinan de forma que podrían promover o inducir cáncer de mama por daño genómico. La dieta, además de presentar carcinógenos también proporciona Fito estrógenos, que pueden servir como anti estrógenos débiles que afectan la acción de los estrógenos naturales. La relación entre la ingesta de grasa y el cáncer es compleja, debido a que algunos metabolitos de la grasa se unen a receptores de esteroides y pueden aumentar o bajar las funciones de la transcripción de las células, así mismo, los depósitos de grasa corporal también pueden alterar el estado hormonal debido a que los adipocitos son fuente importante del metabolismo de la testosterona, por ende de la síntesis de estrógenos y la conversión de andrógenos a estrógenos puede ser proporcional a la masa corporal y el grado de grasa en el cuerpo (Coffey *et al.*, 2001).

Oncogén erbB2

También conocido como HER2/neu, es un oncogén que codifica una glicoproteína transmembrana con actividad tirosina quinasa. Pertenece a la familia del receptor de crecimiento epidérmico (por sus siglas en inglés conocido como EGFR) que involucra cuatro grupos (HER1 o erbB1, HER-2/neu o erbB2, HER3 o erbB3, y HER4 o erbB4) (Ross y Fletcher, 1999). Los miembros de la familia erbB tienen una estructura común que incluye un dominio extracelular, uno segmento transmembrana helicoidal, el dominio tirosina quinasa intracelular y la cola C-terminal (Ferguson, 2008).

Los receptores erbB están en la membrana como monómeros o pre-dímeros inactivos y requiere la unión con el ligando para pasar a un estado activo de dimerización (Ferguson, 2008). La activación promueve la autofosforilación del receptor en su cola C-terminal e induce a la activación de numerosas vías de señalización río abajo (Yu Li *et al.*, 2012).

Recktenwald *et al.* (2012) en su estudio observaron que la alteración en la expresión del erbB2 tiene relación directa con regulación a la baja de la expresión de otras proteínas importantes en la progresión del cáncer de mama, como lo es la

proteína de la matriz extracelular biglicano (BGN), que es un proteoglicano involucrado en el ensamblaje de la matriz, adhesión y migración celular, el crecimiento celular, y la apoptosis. Utilizaron un modelo *in vitro* de células murinas y de humano con transformación oncogénica del erbB2, y observaron que el silenciamiento de la expresión BGN mediada por erbB2 puede promover la proliferación de células tumorales y la migración.

Se ha demostrado que existe reactividad cruzada entre el anticuerpo erbB2 usado en de tejido mamario humano con el tejido mamario canino y sobre-expresión del mismo similar a lo reportado en carcinomas mamarios humanos por inmunohistoquímica (De las Mulas *et al.*, 2002). La expresión del erbB2 en los tumores mamarios caninos, puede ser un factor importante en la carcinogénesis mamaria. En humanos se ha implicado en las fases iniciales del cáncer y es usado como un blanco terapéutico (Campone *et al.*, 2003). De igual forma, se ha observado correlación entre el la expresión histoquímica del erbB2 y el grado histológico en el tumor mamario canino, la sobreexpresión fue encontrada en el 38.5% (5/13) de tumores grado II, en 23% (3/13) grado III y en 38.5% (5/13) grado I. La morfología celular y la expresión del erbB2 tiene una estrecha relación (Dutra *et al.*, 2004)

Por otra parte, Ressel *et al.*, (2013) estudiaron la expresión del erbB2 en tejido mamario canino y observaron sobre-expresión en 3/10 adenomas y 10/35 carcinomas y positividad en el tejido mamario normal, hiperplásico y displásico; así como, correlación positiva entre la sobreexpresión y el índice mitótico, más no con el grado histológico en los carcinomas. En cuanto al análisis de sobrevida dos años después de la cirugía, asociaron a un peor pronóstico el carcinomas simple, los tumores mayores de 5 cm, el índice mitótico por encima de la media y la invasión linfática, más sin embargo, la sobre-expresión del erbB2 no fue asociado a un tiempo de sobrevida más corto.

Los tumores mamarios humanos que sobre-expresan erbB2 pueden ser tratados con inmunoterapia mediante el uso del trastuzumab, un anticuerpo IgG1 humanizado; sin embargo, su utilidad en el cáncer mamario de perras ha sido

poco estudiado. Singer *et al.* (2012) observaron que la estructura del anticuerpo erbB2 solo varía en un aminoácido, el sitio de unión del trastuzumab es idéntico al del humano y es capaz de inhibir la proliferación celular en las células de carcinoma mamario canino (CF33, CF41, Sh1b y P114) por la detención del crecimiento en la fase G_0 / G_1 . La homología entre el erbB2 humano y canino puede facilitar la inmunoterapia basada en anticuerpos en las perras con cáncer de mama que sobre-expresan dicho oncogén, lo cual, abre posibilidades de terapia específica en el TMC.

Índice de proliferación Ki67

El Ki67 comúnmente visualizado con el anticuerpo MIB1 Ki67 (Yerushalmi *et al.*, 2010), es una proteína que está presente en la matriz nuclear durante la fase G_1 , S, G_2 y M del ciclo celular y está estrictamente asociada con la proliferación celular, sin embargo, el significado funcional no está claro pero se cree que la expresión de la proteína Ki-67 es un requisito fundamental para la progresión de las células dentro del ciclo de división celular (Scholzen y Gerdes, 2000). La función biológica de la proteína Ki67 no está del todo dilucidada, pero se sabe que forma parte de la red compleja que regula la proliferación celular (Scholzen y Gerdes, 2000)

Durante la interface, el antígeno se puede detectar exclusivamente dentro del núcleo, mientras que en la mitosis la mayor parte de la proteína se traslada a la superficie de los cromosomas. El hecho de que la proteína Ki-67 está presente durante todas las fases activas del ciclo celular (G_1 , S, G_2 y la mitosis), y está ausente en las células en reposo (G_0), hace que sea un excelente marcador para la determinación de la llamada fracción de crecimiento de una población celular o índice de proliferación celular (Scholzen y Gerdes, 2000). Aunque los mecanismos de proliferación celular incontrolados en las neoplasias mamarias en perras no están completamente dilucidados, el aumento de la proliferación celular es una característica clara de las neoplasias mamarias malignas, que tienen una fracción

mayor de células en ciclo celular activo y presenta un pico de expresión en la fase M del ciclo celular (Yerushalmi *et al.*, 2010).

El índice de proliferación celular Ki67 tiene ventajas sobre otros indicadores de proliferación celular, como el índice mitótico, el cual requiere de experiencia del observador para identificar una figura mitótica, mientras que con el anticuerpo Ki67 fácilmente se pueden evidenciar todas las células cíclicas activas (Scholzen y Gerdes, 2000); también es superior a otros marcadores de proliferación como el antígeno nuclear de proliferación celular (por sus siglas en inglés conocido como PCNA) debido a que éste último está involucrado no sólo en la replicación de DNA sino también en la reparación, característica que genera desventaja como un marcador fiable exclusivo de proliferación celular (Prosperi, 1997).

El PCNA se encuentra en el núcleo y actúa como un co-factor de la ADN polimerasa, incrementando la creciente replicación del ADN; además, desempeña un papel en la reparación del RAD6 ADN-dependiente y la inhibición de la apoptosis a través de la regulación negativa de la tirosina quinasa, pero debido a su participación en la reparación del ADN, el PCNA puede ser detectado en las células acíclicas (He *et. al.*, 2009).

El valor pronóstico del índice de proliferación celular Ki67 es importante en las neoplasias cuando el curso clínico es difícil de predecir por criterios histológicos, como en el cáncer prostático, colonorectal, linfoma y carcinoma mamario, entre otros. La función biológica de la proteína Ki67 no está del todo dilucidada, pero se sabe que forma parte de la red compleja que regula la proliferación celular (Scholzen y Gerdes, 2000).

Existe evidencia científica sobre el importante papel de la expresión de Ki67 en la valoración de la paciente con cáncer de mama, como factor pronóstico y predictivo. Se ha encontrado relación entre la expresión de Ki67 y algunas otras variables pronósticas en el cáncer de mama humano, como lo son: el tamaño del tumor (tumores mayores a 15 mm), una baja expresión de receptores hormonales (RE y RP) y un grado histológico alto, están asociados con mayor expresión de

ki67. Así mismo, el Ki67 ha demostrado una relación inversa entre su sobreexpresión y la expresión del RE (Panal, et al., 2014).

Clasificación molecular

Las perras han demostrado ser un excelente modelo animal para el estudio de cáncer de mama en humanos, debido a su similar comportamiento clínico (Cassali *et al.*, 2006). Es por ello que investigar en las perras con cáncer mamario la aplicación de la clasificación molecular preestablecida en mujeres, representa importantes avances para ambas especies. El objetivo de establecer la clasificación molecular en el cáncer de mama en perras es identificar un subgrupo de tumores más homogéneos que presentan similar comportamiento clínico y sensibilidad a agentes terapéuticos. Para la medicina veterinaria es un impulso para el desarrollo de la oncología, así como, permitir la cercanía a un mejor pronóstico y terapéutica más acertada que ofrezca calidad de vida a las pacientes y la posibilidad de una terapia personalizada para las perras con cáncer de mama, el cual en la actualidad aún se limita a la cirugía, como tratamiento fundamental y la ovario histerectomía como coadyuvante, acompañada en pocos casos de quimioterapia no específicas.

Por otra parte, para la medicina humana avances de los estudios moleculares en cáncer, ha proporcionado argumentos para establecer sub-clasificaciones de importancia diagnóstica y terapéutica, además se han desarrollado líneas de investigación molecular a fin de estudiar la expresión génica de estos tumores. Sin embargo, a pesar de ello, en mujeres existe variabilidad de respuesta terapéutica entre los tumores de un mismo grupo (Imigo *et al.* 2011).

La sub-clasificación molecular se basa en dos grandes grupos dependiendo del RE, en positivos y negativos, los tumores RE positivos se han caracterizado por tener mejor pronóstico que los RE negativos. Los RE positivos comprende los tumores tipo Luminales; los cuales poseen un patrón inmunofenotípico similar al componente epitelial luminal de la glándula mamaria. Expresan citoqueratinas

luminales, receptores de estrógeno y generalmente son de bajo grado histológico. Se han considerado varios subtipos, el Luminal A y B. El subtipo Luminal A además de ser positivo a receptores hormonales y es de baja expresión de genes relacionados con la proliferación celular. A diferencia del subtipo Luminal B que presenta altos niveles de genes de proliferación. Y el subtipo Luminal erbB2, que se caracteriza además, por expresar erbB2 (Cheang *et al.*, 2009).

En el estudio de los tumores Luminales, Cheang *et al.* (2009) en humanos probaron un panel de inmunotinción que consistió de cuatro marcadores. Los tumores luminales fueron divididos en tres grupos: Luminal A (RE o RP positivos, HER2/neu negativo, y bajo índice de proliferación), Luminal B (RE o RP positivos, HER2/neu negativo e índice de proliferación alto), el tercer grupo fue denominado Luminal HER2/neu positivo. Determinaron que un punto de corte del Ki-67 de 14% o más podía discriminar entre los subtipos Luminal A y B.

De los RE negativos existen dos grandes grupos: El subtipo basal y el subtipo con sobre-expresión de erbB2. El subtipo basal, se describió originalmente por su patrón de expresión inmunohistoquímico, al comprobarse que expresan citoqueratinas de alto peso molecular en sus células mioepiteliales. Ha sido reconocido como triple negativo por ser RE negativo, RP negativo y HER2/neu negativo (Soutiriou *et al.*, 2009). Por otra parte el subtipo HER2/neu o erbB2 además de no poseer receptores hormonales sobre-expresa genes de proliferación y presenta escasos genes asociados al fenotipo Luminal (McCaffrey *et al.*, 2009).

Anteriormente en humanos el carcinoma basal era conocido como triple negativo, por ser negativo a RE, RP y c-erbB2, además de ser similares en el comportamiento clínico y respuesta a la terapia, sin embargo, estudios recientes han diferenciado los tumores triple negativos de los basales con el fin de tener mayor agudeza pronóstica al adicional al panel de anticuerpos marcadores de células basales como CK14, Ck5/6, p63 (Rakha, 2009).

Avances en el estudio molecular del cáncer mamario en perras representa a su vez la posibilidad de aclarar las dudas que aún persisten en relación al cáncer

de mama en mujeres y beneficiarse mutuamente. Existen algunos investigadores que han aportado importantes resultados. Sassi *et al.* (2010), observaron que los sub-grupos moleculares Luminal A, Luminal B y Basal, no mostraron diferencias en el análisis de supervivencia, sin embargo, a pesar de no ser estadísticamente significativo, los tumores de tipo basal mostraron mayor supervivencia que los grupos Luminal A y Luminal B. Mientras que la invasión vascular sí fue significativamente asociada con menor supervivencia y peor pronóstico. Concluyeron que el carcinoma mamario canino es heterogéneo desde el punto de vista morfológico y grado de invasión y no se asocia directamente con la sub-clasificación molecular, siendo esta sub-clasificación de mayor utilidad pronóstica al relacionarla con el grado histológico del tumor.

Al igual que en humanos, los carcinomas clasificados como basales se asocian a un bajo nivel de supervivencia y corta etapa libre de enfermedad. Basado en esta clasificación, las neoplasias mamarias en perras pueden ser usadas como modelo natural de estudio para este subtipo de carcinoma en humanos. Gama *et al.* (2008) reportaron en una serie de carcinomas mamarios caninos, basado en una clasificación molecular dada por el RE, c-erbB2 y su expresión genética, que los Luminales A se caracterizaron por ser de bajo grado y baja tasa de proliferación, mientras que los de tipo Basal eran en su mayoría de alto grado y alta proliferación.

Densidad Microvascular (DMV)

El CD31 también conocido como PECAM-1 (molécula de adhesión 1 de las plaquetas/células endoteliales), es una proteína transmembranal de tipo 1, de una sola cadena, con una masa molecular de aproximadamente 135 kDa, que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas, desempeña un papel en las interacciones adhesivas entre células endoteliales adyacentes, y también entre leucocitos y células endoteliales. La unión del CD31 a las superficies de los leucocitos produce la regulación al alza de las integrinas leucocitarias funcionales, y en la diapédesis leucocitaria a través del endotelio. Se expresa en todos los

endotelios continuos, incluidos los de las arterias, arteriolas, vénulas, venas y capilares no sinusoidales, pero no se expresa en los endotelios discontinuos, por ejemplo, en la pulpa roja esplénica. Por lo tanto, es utilizado para marcar principalmente las células endoteliales, y es una herramienta útil para la identificación de estructuras vasculares en los diferentes tejidos sanos y neoplásicos; permite determinar la angiogénesis en diversos tipos de tumores (Parums *et al.*, 1990). Lavallo *et al.* (2009) en un estudio determinaron la DMV en tumores mamarios caninos; observaron positividad al anticuerpo CD31 en el 100% de las muestras analizadas, sin embargo, a pesar de que no observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tipos de tumores, sí observaron menor sobrevida en las pacientes con mayor DMV.

Por otra parte, la angiogénesis es fundamental en el desarrollo de metástasis, la presencia de marcada neo vascularización en las imágenes histológicas de los tumores es considerada de valor pronóstico en medicina humana (Leek, 2001), así como en medicina veterinaria (Queiroga y Lopes., 2002). Recientemente se ha descrito otra forma de angiogénesis en neoplasias mamarias en perras, denominada mimetismo vasculogénico; en este proceso los canales microvasculares son producidos por las células tumorales, llamadas célula endotelio-similar, sin participación de las células endoteliales pre-existentes. Estas células endoteliales expresan citoqueratinas AE1/AE3 y 14, y son en su mayoría negativos a marcadores endoteliales (Clemente *et al.*, 2010).

Gen de susceptibilidad al cáncer de mama (BRCA)

El gen BRCA1 se localiza en el cromosoma 17q21, contiene 24 exones, 22 de los cuales codifican para una fosfoproteína nuclear de 220KDa y 1862 aminoácidos (Yang y Lippman, 1999). Numerosas funciones adicionales se le han atribuido a la BRCA1, como replicación del DNA, puntos de control del ciclo celular, apoptosis, regulación de la transcripción (Jasin, 2002).

El BRCA2 se encuentra en el cromosoma 13q, es un gen con 26 exones en 70kDa de DNA genómico, y codifica una proteína de 3418 aminoácidos (Wooster

et al., 1994). Esta proteína está directamente implicada en la reparación del DNA dañado.

Las mutaciones en los genes *BRCA1/2* se caracterizan a nivel celular por fallas en la reparación, por procesos de recombinación homóloga (HR), de rupturas del DNA de doble cadena (DSBs), conllevando a la acumulación de aberraciones cromosómicas que contribuyen a la tumorigénesis (Pierce et al., 2001). En mujeres con carcinoma seroso de ovario asociado a *BRCA1/2* mutado, se ha analizado la expresión de microRNAs (miRNAs) que regulan los genes reparadores de daño al DNA a través de recombinación homóloga, y se ha encontrado que tumores con alta expresión de los miRNAs se asociaron con alta deficiencia de recombinación homóloga, encontrando una relación estadísticamente significativa entre la expresión de estos miRNAs y el fenotipo mutado de *BRCA1/2* (Jianping et al., 2014).

La función más claramente reportada de la proteína *BRCA 2* es la reparación del DNA por HR del DNA de doble cadena roto, a través de la regulación de la proteína Rad51. La proteína *BRCA2* cuenta con varios sitios de unión a Rad51 y a la cadena sencilla del DNA (ssDNA) y media la HR; el *BRCA2* facilita la unión del Rad51 y la ssDNA. (Thorslund y West, 2007).

Ambos genes han sido implicados en el cáncer de mama heredo familiar, sin embargo, también se ha demostrado disminución de la expresión nuclear o distribución aberrante de la proteína *BRCA1* y *BRCA2* en tumores no heredofamiliares (Yang y Lippman, 1999). Durante el metabolismo estrogénico se generan especies altamente reactivas capaces de formar estructuras aberrantes (aductos) en el DNA. Estos productos se encuentran en mayor cantidad en aquéllos órganos que responden fuertemente a estrógenos, como la mama y el ovario. En pacientes con mutaciones germinales en *BRCA1/2* los mecanismos básicos para detección y reparación de daño están alterados, lo cual permite el cúmulo de mutaciones asociadas a la formación de estos aductos (Venkitaraman, 2001).

En humanos se han identificado más de 800 mutaciones en el gen *BRCA2*, muchas de las cuales están asociadas con un mayor riesgo de cáncer de mama, la proteína defectuosa es incapaz de ayudar a reparar el DNA dañado o corregir las mutaciones que se producen en otros genes. A medida que estos defectos se acumulan, pueden permitir que las células crezcan y se dividan sin control (Venkitaraman, 2002).

Las técnicas más comúnmente utilizadas para detección de mutaciones son la de análisis de proteínas truncadas (por sus siglas en inglés PTT), la desnaturalización de cromatografía líquida de alto rendimiento, amplificación múltiple de sondas ligando-dependientes y la secuenciación directa de DNA. La técnica del PTT ha dado buenos resultados pero, aunque su costo es más elevado, el método del chip de DNA (microarreglos) es rápido y puede potencialmente identificar todas las variantes en una secuencia, al igual que la secuenciación completa del gen, la cual aunque sigue siendo costosa, es la mejor prueba (Narod y Foulkes, 2014).

En el cáncer no hereditario o esporádico, los posibles mecanismos en la disfunción de *BRCA1* incluyen mecanismos epigenéticos que resultan en silenciamiento transcripcional y disminución de la expresión y estabilidad de la proteína (Futreal, *et al.*, 1994). En el cáncer de mama esporádico, proteínas sobre-expresadas pueden silenciar al *BRCA1* por regulación negativa, como ocurre con la sobre-expresión de ID4 que genera silenciamiento del promotor del *BRCA1* (Beger *et al.*, 2001).

La proteína EMSY se ha asociado al rol del *BRCA2* en el cáncer esporádico humano de mama y ovario, la EMSY se une al exón 3 del *BRCA2* y suprime su actividad (Hughes-Davies *et al.*, 2003). Se cree que la sobre-expresión tiene efectos similares o equivalentes a la pérdida del *BRCA2* en el cáncer hereditario, la EMSY es un modulador del *BRCA2* y sobre-expresado ejerce regulación negativa del mismo (Yao y Polyak, 2004). Zahra *et al.* (2014) evaluaron la expresión y el patrón de localización de la proteína EMSY por inmunohistoquímica en 116 carcinomas de mama y detectaron la expresión de

EMSY en 76% de los tumores con localizada nuclear (18%), citoplásmica (35%) o en ambos sitios (23%). También observaron que la expresión de EMSY se correlaciona con el aumento de tamaño del tumor y metástasis a linfonodos.

El *BRCA* junto con la Poly (ADP-ribosa) polimerasa (PARP1) evitan la acumulación de lesiones recombinogénicas espontáneas en las células. Líneas celulares de cáncer de mama humano con *BRCA 1* y *2* no funcional, son susceptibles a niveles tóxicos de inhibidores de PARP1, lo cual resulta letal para las células por la ausencia de recombinación homóloga. La supervivencia clonogénica se reduce significativamente cuando ambas proteínas PARP1 y *BRCA2* se encuentran agotadas (Helen et al., 2005).

Por otra parte, el sub-tipo molecular de cáncer de mama en mujeres se ha asociado con el fenotipo mutacional *BRCA1* y *2*; se ha establecido que mujeres con mutaciones en el *BRCA1* generalmente presentan tumores de alto grado histológico (grado III; 75%), RE negativo (75%), expresión de *erbB2* negativo (95%), *p53* positivo (50%) y rara presencia en carcinoma *in situ*. Por su parte, mujeres con fenotipo asociado a mutaciones en el *BRCA2* presentan carcinomas mamarios de grado histológico intermedio a alto (II, 45% - III, 45%), RE positivo (75%), *erbB2* negativo (95%), expresión de *p53* positiva (40%) y es común en carcinoma *in situ* (Foulkes et al., 2004).

En perros, el gen *BRCA2* se ha asociado a cáncer de mama debido a polimorfismo de nucleótidos, mutaciones, pérdida de heterocigosidad como mecanismo de silenciamiento e inactivación del gen. Un grupo de investigadores detectaron en ovario y testículo de animales sanos, seis polimorfismos de nucleótidos simples (516 T > C, 1366 T > G, 2428, T > G, 2609A > C, 4481A > C y 8257 T > C) y dos inserciones/deleciones (7126ins/delGTT y 10204ins/delAAA) con posibilidad de generar riesgo al cáncer de mama (Yasunaga et al., 2005). Rivera et al., 2009, evaluaron 10 genes conocidos por estar involucrados en el cáncer de mama en humanos (*BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *ErbB2*, *FGFR2*, *LSP1*, *MAP3K1*, *RCAS1*, *TOX3*, y *TP53*) y asociarlos con el TMC. Utilizaron SNPs para genotipificar perras Springer Spaniel Ingles (ESS), 212 con tumor mamario y 143

controles. Se observaron que dos genes, *BRCA1* y *BRCA2*, se asociaron significativamente con el TMC y cierto límite de la asociación para el FGFR2. Las perras *BRCA1* y *BRCA2* mostraron un ODDS ratio de 4 y en los casos de malignidad una asociación fuerte con el gen *BRCA1*. Esto demuestra que el *BRCA1* y *BRCA2* contribuyen al riesgo del TMC en los ESS.

Yasunaga *et al.* (2012) basados en la comprensión del mecanismo por el cual la alteración en la relación del *BRCA2*, las proteínas reparadoras del cáncer de mama (*BRC*) y el *RAD51*, incrementan el riesgo del cáncer de mama en humanos y perras, realizaron un estudio comparativo, 2 mutaciones en el *BRCA2* asociadas al *BRC3* (T1425P y K1435R) del tumor mamario canino y 2 mutaciones en *BRC3* (K1440R y K1440E) del cáncer de mama humano. Ambas mutaciones afectan la función *BRC3*. Así mismo, las mutaciones en el *BRC3* (T1430P y K1440R) humano corresponden a las mutaciones *BRC3* (T1425P y K1435R) canino y conllevan a resultados similares. Por lo tanto, mutaciones en las *BRC* disminuyen la afinidad del *RAD51* al *BRCA2* canino, haciendo a las perras un modelo para el estudio de cáncer de mama humano causado por mutaciones en *BRCA2*.

Por otra parte, niveles de expresión de los *BRCA1* han sido asociados al cáncer de mama en perras. En tejido neoplásico, normal y displásico de perras ha sido estudiado por inmunohistoquímica la expresión del *BRCA1* y han observado que el tejido normal presenta tinción nuclear a diferencia del neoplásico, donde se observa tinción tanto en el núcleo como en el citoplasma, con disminución considerable en la expresión del *BRCA1* en el tejido neoplásico maligno, la cual a su vez, fue asociada con alto grado histológico e índice de proliferación celular Ki67. Estos resultados conllevan a los investigadores a concluir sobre el rol potencial del *BRCA1* en los tumores mamarios caninos malignos. Estudios en tumores mamarios caninos esporádicos y heredofamiliares pueden contribuir al entendimiento de la carcinogénesis mamaria (Nieto *et al.*, 2003).

REFEFENCIAS

1. Andrade F, Figueiroa F, Bersano P, Bissacot D, Rocha N. 2010. Malignant mammary tumor in female dogs: environmental contaminants. *Diagnostic Pathology* 5:45.
2. Baird DT, Fraser IS. Blood production and ovarian secretion rates of estradiol-17 β and estrone in women throughout the menstrual cycle. 1974. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 38:1009-17.
3. Beger C, Pierce L, Kruger M, Marcusson E, Robbins J, Welch P, Welch PJ, Welte K, King M, Barber J, Wong-Staal. 2001. Identification of Id4 as a regulator of BRCA1 expression by using a ribozyme-library-based inverse genomics approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* Jan 2;98(1):130-5.
4. Bronden LB, Nielsen SS, Toft N, Kristensen AT. 2010. Data from the Danish veterinary cancer registry on the occurrence and distribution of neoplasms in dogs in Denmark. *Veterinary Record* 166:586–590.
5. Campone M, Merlin JL & Fumoleau P. 2003. Role of the combination of trastuzumab in the therapeutic management of cancer of the breast: from preclinical data to clinical application. *Bulletin of Cancer* 90: 614-622.
6. Cassali G, Gobbi H, Malm C, Schmitt F. 2006. Evaluation of accuracy of fine needle aspiration biopsy for diagnosis of canine mammary tumors: comparative features with the human tumors. *Cytopathology* 17:1–7.
7. Chang CC, Tsai MH, Liao JW, Chan JP, Wong ML, Chang SC. 2009. Evaluation of hormone receptor expression for use in predicting survival of female dogs with malignant mammary gland tumors. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 235:391–396.
8. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO. 2009. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 101: 736e50
9. Clemente M, Perez-Alenza MD, Illera JC, Peña L. 2010. Histological, immunohistological, and ultrastructural description of vasculogenic mimicry in canine mammary cancer. *Veterinary Pathology* 47:265–274.

10. Coffey DS. 2001. Similarities of prostate and breast cancer: evolution, diet, and estrogens. *Urology* 57 (Supplement 4A) 31-38.
11. De Las Mulas JM, Millan Y, Dios R. 2005. 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. *Veterinary Pathology* 42:200–212.
12. Donnay I, Rauis J, Devleeschouwer N, Wouters-Ballman P, Leclercq G, Versteegen J. Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. *American Journal of Veterinary Research* 1995 Sep;56(9):1188-94.
13. Dutra, Granja, Schmitt, Cassali. 2004. c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37, 11.
14. Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson JA. 1997. Human estrogen receptor b-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 82:4258-65.
15. Environmental Protection Agency – EPA. 2006. Health Effect Division. Office of Pesticide Programs. *Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential Informative*. 49.
16. Ferguson, K. M. 2008. Structure-based view of epidermal growth factor receptor regulation. *Annual Review of Biophysics* 37, 353–373.
17. Foulkes W.D, Metcalfe K, Sun P, Hanna W.M, Lynch H.T. Ghadirian P, Tung N, Narod S.A. 2004. Estrogen Receptor Status in BRCA1- and BRCA2-Related Breast Cancer: The Influence of Age, Grade, and Histological Type. *Clinic Cancer Research* 10:2029-2034.
18. Futreal PA, Liu Q, Shattuck-Eidens D, Cochran C, Harshman K, Tavtigian S, Bennett LM, Haugen-Strano A, Swensen J, Miki Y, et al. 1994. BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science* 266:120 –122.
19. Gama A, Alves A, Schmitt F. 2008. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Archiv* 453(2):123-132.
20. Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R, Zappulli V. 2011. Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology* 48:117-131.

21. Gruber C, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber J. 2002. Production and actions of estrogens. *The New England Journal of Medicine* (346) 5:340-352.
22. Hayden D.W, Barnes D.M, Johnson K.H. 1989. Morphologic changes in the mammary gland of megestrol acetate-treated and untreated cats: a retrospective study. *Veterinary Pathology* 26:104–113.
23. He X, Wei C, Song T, Yuan J, Zhang Y, Ma Q, Shi W, Zhong H. 2009. Proliferating cell nuclear antigen destabilizes c-Abl tyrosine kinase and regulates cell apoptosis in response to DNA damage. *Apoptosis* 14:268–275.
24. Helen E. Bryant, Niklas Schultz, Huw D. Thomas, Kayan M. Parker, Dan Flower, Elena Lopez, Suzanne Kyle, Mark Meuth, Nicola J. Curtin, Thomas Helleday. 2005. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase. *Nature* 434:913-916.
25. Hughes-Davies L. 2003. The BRCA2-EMSY Connection: Implications for Breast and Ovarian Tumorigenesis. *Cell*, 115, 507-12
26. Imigo F, Mansilla E, Delama I, Poblete M, Fonfach C. 2011. Clasificación molecular del cáncer de mama. *Cuadernos de Cirugía* 25: 67-74.
27. Jasin M. 2002. Homologous repair of DNA damage and tumorigenesis: the BRCA connection. *Oncogene* 21:8981– 8993.
28. Jianping Lu, Di Wu, Chuanxing Li, Meng Zhou, Dapeng Hao. 2014. Correlation between gene expression and mutator phenotype predicts homologous recombination deficiency and outcome in ovarian cancer. *Journal of Molecular Medicine* Julio. DOI 10.1007/s00109-014-1191-9.
29. Lavallo, A. C. Bertagnolli, W. L. F. Tavares, And G. D. Cassali G. E. 2009. Cox-2 Expression in Canine Mammary Carcinomas: Correlation with Angiogenesis and Overall Survival. *Veterinary Pathology* 46:1275–1280.
30. Mauvais-Jarvis P, Kuttann F, Gompel A. 1986. Estradiol/progesterone interaction in normal and pathologic breast cells. *The New York Academy of Sciences* 464:152-67.
31. McCafferty M; Healy N; Kerin M. 2009. Breast cancer subtypes and molecular biomarkers. *Diagnostic Histopathology* 15(10):485-9.
32. Millanta F, Caneschi V, Ressel L, Citi S, Poli A. 2010. Expression of vascular endothelial growth factor in canine inflammatory and non-inflammatory mammary carcinoma. *Journal of Comparative Pathology* 142: 36–42.

33. Mohammad Vasei MD, Negar Azarpira MD, Abdolrasoul Talei MD. 2006. Status Of Estrogen And Progesterone Receptors In Various Phases Of The Menstrual Cycle In Breast Cancer. *Archives of Iranian Medicine* 9 (3): 250 – 253.
34. Narod S, Foulkes W. 2004. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nature Reviews Cancer* 4:665-676.
35. Narod SA, Rodríguez A. 2011. Predisposición genética para el cáncer de mama: genes BRCA1 y BRCA2. *Salud Publica de México* 53:420-429.
36. Nieto, M. Perez-Alenza, N. Del Castillo, E. Tabanera, M. Castaño, L. Peña. 2003. BRCA1 Expression in Canine Mammary Dysplasias and Tumours: Relationship with Prognostic Variables. *Journal of Comparative Pathology* 128:260-268. doi:10.1053/jcpa.2002.0631.
37. Leek RD. 2001. The prognostic role of angiogenesis in breast cancer. *Anticancer Research*; 21:4325–4331.
38. Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner P, Scanlan T. 1997. Differential ligand activation of estrogen receptors ERa and ERb at AP1 sites. *Science* 277:1508-10.
39. Panal, Herrera, Hardisson, Choqueneira, de Santiago. 2014. Correlación entre la expresión de Ki67 con factores clásicos pronósticos y predictivos en el cáncer de mama precoz. *Revista de Senología y Patología Mamaria* 27(4):163-169.
40. Parums DV, Cordell JL, Micklem K, Heryet AR, Gatter KC, Mason DY. 1990. JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *Journal of Clinical Pathology* 43:752-7.
41. Pierce AJ, Stark JM, Araujo FD, Moynahan ME, Berwick M, Jasin M. 2001. Double-strand breaks and tumorigenesis. *Trends in Cell Biology* 11:S52–S59.
42. Prosperi E. 1997. Multiple roles of the proliferating cell nuclear antigen: DNA replication, repair and cell cycle control. *Progress in Cell Cycle Research* 3:193–210.
43. Pujol P, Daures JP, Thezenas S, Guilleux F, Rouanet P, Grenier J. 1998. Changing estrogen and progesterone receptor patterns in breast carcinoma during the menstrual cycle and menopause. *Cancer* 83: 698 – 705.
44. Queiroga F, Lopes C. 2002. Tumores mamarios caninos, pesquisa de novos fatores prognosticos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 97:119–127.
45. Rakha EA, Elsheikh SE, Aleskandarany MA, Habashi HO, Green AR, Powe DG, El-Sayed ME, Benhasouna A, Brunet JS, Akslen LA, Evans AJ, Blamey R, Reis-Filho

- JS, Foulkes WD, Ellis IO. 2009 Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. *Clinical Cancer Research* 15:2302-2310.
46. Recktenwald, Sandra Leisz, André Steven, Kousaku Mimura, Anja Müller, Seliger Jens Wulfänger, Rolf Kiessling and Barbara Seliger. 2012. Glycobiology and Extracellular Matrices: HER-2/neu-mediated Down-regulation of Biglycan Associated with Altered Growth Properties. *Journal of Biological Chemistry* (287:24320-24329. doi: 10.1074/jbc.M111.334425.
 47. Ressel, Puleio, Ruggero Loria, Vannozzi, Millanta, Caracappa, Poli. 2013. HER-2 expression in canine morphologically normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissues and its correlation with the clinical outcome. *Research in Veterinary Science* 94, 299–305.
 48. Rivera P, Melin M, Biagi T, Fall T, Haäggstroöm J, Lindblad-Toh K, von Euler H. 2009. Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. *Cancer Research* 69:8770–8774.
 49. Ross JS, Fletcher JA. 1999. HER-2/neu (C-erbB-2) gene and protein in breast cancer. *American Journal of Clinical Pathology* 112:53-67.
 50. Rutteman GR. 1992. Hormones and mammary tumors in the bitch: a review. *Tijdschr Diergeneeskde* 117(3):71-7, 81.
 51. Sassi F, Benazzi C, Castellani G, Sarli G. 2010. Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *BMC Veterinary Research* 6:5.
 52. Schneider R, Dorn CR, Taylor DO. 1969. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *Journal of the National Cancer Institute* 43:1249–1261.
 53. Scholzen, T. and Gerdes, J. 2000. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology* 182: 311–322. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9
 54. Singer, Weichselbaumer, Stockner, Mechtcheriakova, Sobanov, Bajna, Wrba, Horvat, Thalhammer, Willmann, Jensen-Jarolim. 2012. Comparative oncology: ErbB-1 and ErbB-2 homologues in canine cancer are susceptible to cetuximab and trastuzumab targeting. *Molecular Immunology* 50:200–209.
 55. Solis L y Andrade A. 2005. Que son los marcadores moleculares. *Revista de divulgación científica de la Universidad de Veracruz* Vol. XVIII. N°1.

56. Sorenmo KU, Shofer FS, Goldschmidt MH. 2000. Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 14:266–270.
57. Soutiriu C. and Pusztai L. Gene-Expression Signatures in Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine* 2009; 360: 790-800.
58. Thorslund T, West SC. 2007. BRCA2: a universal recombinase regulator. *Oncogene* 26:7720 –7730.
59. Venkitaraman AR. 2001. Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage. *Journal of Cell Science* 114, 3591-3598.
60. Venkitaraman AR. 2002. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 108:171–182.
61. Vinothini G, Balachandran C, Nagini S. 2009. Evaluation of molecular markers in canine mammary tumors: correlation with histological grading. *Oncology Research* 18(5-6):193-201.
62. Wey N, Gutberlet K, Khon B. 2000. Mammatumore bei der huding: Hormolle abh angigkeit unter besonderer berucksichtigung von 17 β ostradiol und progesteron. *Kleintierpraxis* 45:19-31.
63. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N. 1994. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12–13. *Science* 265:2088–2090.
64. Yang, X. and Lippman, M. E. 1999. BRCA1 and BRCA2 in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 54:1-10.
65. Yao J, Polyak K. 2004. EMSY links breast cancer gene 2 to the ‘Royal Family’. *Breast Cancer Research* 6:201-3.
66. Yasunaga Yoshikawa, Kazuhiko Ochiai, Masami Morimatsu, Yu Suzuki, Takahiro Taoda, Satomi Iwai, Seishiro Chikazawa, Koichi Orino, Seiichi Wada, Kiyotaka Watanabe. 2012. Effects of the Missense Mutations in Canine BRCA2 on BRC Repeat 3 Functions and Comparative Analyses between Canine and Human BRC Repeat 3. PLOS ONE | www.plosone.org. (7): 1-9. Issue 10. e45833.
67. Yasunaga Yoshikawa, Masami Morimatsu, Kazuhiko Ochiai, kazuhiko Ochiai, Masashi nagano, Yoshihisa Yamane, Nobuyuki Tomizawa, Nobuo SaSaki, Kazuyoshi Hashizume. 2005. Analysis of Genetic Variation in the Exon 27 Region of Canine BRCA2 Locus. *Journal Veterinary. Medicin Science* 67(10): 1013-1017.

68. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. 2010. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncology* 11:174–183.
69. Yu FL. 2002. 17Beta-estradiol epoxidation as the molecular basis for breast cancer initiation and prevention. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 11 Suppl 7:S460-466.
70. Yu Li, Jennifer Macdonald-Obermann, Corey Westfall, David Piwnica-Worms and Linda J Pike. 2012. Quantitation of the Effect of ErbB2 on Binding and Dimerization Epidermal Growth Factor Receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 287(37): 31116–31125.
71. Yue W, Santen RJ, Wang JP, Hamilton CJ, Demers LM. 1999. Aromatase within the breast. *Endocrine-Related Cancer* 6:157-64.
72. Zahra Madjd, Mohammad Esmaeil Akbari Amir Hassan Zarnani, Maryam Khayamzadeh, Elham Kalantari, Nazanin Mojtavavi. 2014. Expression of EMSY, a Novel BRCA2-link Protein, is Associated with Lymph Node Metastasis and Increased Tumor Size in Breast Carcinomas. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15 (4), 1783-1789.

Capítulo I

Estudio epidemiológico del tumor mamario en perras diagnosticadas durante el periodo 2002-2012: Un problema creciente de salud animal

Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem

En el presente capítulo se desarrolla el objetivo específico N° 1, Investigar los antecedentes epidemiológicos en perras con tumor mamario, diagnosticados en el Departamento de Patología, de la FMVZ – UNAM (periodo 2002- 2012). Cuyos resultados se publicaron en PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0127381 May 18, 2015.

RESUMEN

Los estudios epidemiológicos permiten analizar el comportamiento de una enfermedad, establecer factores de riesgo y criterios pronósticos fundamentales para el estudio de las enfermedades. El objetivo de este capítulo fue determinar las características epidemiológicas de los tumores mamarios en perras diagnosticados en el Departamento de Patología de la FMVZ – UNAM, durante el periodo 2002-2012. Se basó en un estudio retrospectivo, tomando 1,917 biopsias de perros con lesión en glándula mamaria remitidas al servicio de diagnóstico. Se observó una frecuencia anual de tumores mamarios de 16.8%; el 47.7 % benignos y 47.5% malignos; el mayor número de casos fueron epiteliales, seguidos de los mixtos. Los tumores más diagnosticados fueron el adenoma tubular, adenoma papilar, carcinoma tubular, carcinoma papilar, carcinoma sólido, carcinoma complejo y carcinosarcoma. Las razas puras representaron el 80%, estando frecuentemente afectados los Poodle, Cocker Spaniel y Pastor Alemán. Las más afectadas fueron las perras adultas entre nueve y 12 años de edad, seguidas por las de cinco a ocho años. Se observó cierta asociación entre algunas razas con los tipos histológicos de neoplasias malignas, no siendo así con las benignas. Las neoplasias mamarias en perras tienen una alta incidencia; las neoplasias benignas y malignas presentan frecuencias similares, con un despunte de las neoplasias malignas en los últimos años; son más comunes las epiteliales y las más afectadas son las hembras adultas a gerontes de raza pura y talla pequeña. Las neoplasias mamarias en perras son un problema de salud animal pendiente por atender que ejerce mayor demanda y desarrollo de la oncología veterinaria en México.

Keywords: Factores de riesgo, oncología, cáncer, mama, perras.

RESEARCH ARTICLE

Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem



OPEN ACCESS

Citation: Salas Y, Márquez A, Diaz D, Romero L (2015) Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem. PLoS ONE 10(5): e0127381. doi:10.1371/journal.pone.0127381

Academic Editor: Tiffany Seagroves, University of Tennessee Health Science Center, UNITED STATES

Received: September 29, 2014
Accepted: April 14, 2015

Published: May 18, 2015

Copyright: © 2015 Salas et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: The authors have no support or funding to report.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Yaritza Salas^{1,2*}, Adelys Márquez^{1,3}, Daniel Diaz⁴, Laura Romero⁵

1 Doctoral Program in Production Science and Animal Health, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico, **2** Pathology Department, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA), Barquisimeto, Lara, Venezuela, **3** Physiology Department, UCLA, Barquisimeto, Lara, Venezuela, **4** Biology Cellular and Physiology Department, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Mexico City, Mexico, **5** Pathology Department, FMVZ, UNAM, Mexico City, Mexico.

* ysalas@ucla.edu.ve

Abstract

Epidemiological studies enable us to analyze disease behavior, define risk factors and establish fundamental prognostic criteria, with the purpose of studying different types of diseases. The aim of this study was to determine the epidemiological characteristics of canine mammary tumors diagnosed during the period 2002-2012. The study was based on a retrospective study consisting of 1,917 biopsies of intact dogs that Presented mammary gland lesions. Biopsies were sent to the Department of Pathology FMVZ-UNAM diagnostic service. The annual incidence of mammary tumors was 16.8%: 47.7%(benign) and 47.5%(malignant). The highest number of cases was epithelial, followed by mixed tumors. The most commonly diagnosed tumors were tubular adenoma, papillary adenoma, tubular carcinoma, papillary Carcinoma, solid carcinoma, complex carcinoma and carcinosarcoma. Pure breeds accounted for 80% of submissions, and the Poodle, Cocker Spaniel and German Shepherd were consistently affected. Adult female dogs (9 to 12 years old) were most frequently involved, followed by 5- to 8-year-old females. Some association between breeds with histological types of malignant tumors was observed, but no association was found between breeds and BN. Mammary tumors in intact dogs had a high incidence. Benign and malignant tumors had similar frequencies, with an increase in malignant tumors in the past four years of the study. Epithelial tumors were more common, and the most affected were old adult females, purebreds and small-sized dogs. Mammary tumors in dogs are an important animal health problem that needs to be solved by improving veterinary oncology services in Mexico.

Introduction

In Veterinary medicine, mammary tumors represent the most frequently diagnosed neoplasm in intact female dogs, and 50% of these are malignant [1]. A study focusing on the incidence of canine mammary tumors found tumors in approximately 0.05% of females that were spayed before their first heat cycle. This figure increased to 8% or 26% when the animals were spayed after their first or second heat, respectively. However, if the animals were spayed later, the risk of developing malignant tumors (MN) was the same as for an intact bitch [2]. Mammary tumors can vary in size from a few millimeters to over a few centimeters, and at least 50% of the cases present multiple masses mainly located at the caudal glands [3]. As in humans, canine mammary cancer is a heterogeneous group of diseases linked to morphology and biological behavior.

Histologically, mammary tumors are classified as malignant epithelial tumors, special types of epithelial tumors (Squamous cell carcinoma, Adenosquamous carcinoma, Mucinous carcinoma, Lipid-rich (secretory) carcinoma, Spindle cell carcinomas and inflammatory carcinoma), malignant mesenchymal tumors, carcinosarcoma and benign tumors (BN) [4].

Mammary gland tumors share common features between dogs and humans. For this reason, they are excellent models for human breast cancer studies and comparative studies in relation to breast cancer prognosis and treatment [1]. Generally, in canine mammary tumors (CMT), especially in metastatic tumors, genes in charge of DNA repair show genetic instability with unknown causes. Nevertheless, it is believed that aberrant tumor cell division with damaged DNA replication, hypoxia, mutations accumulation and DNA repair genes, epigenetic modifications can contribute to this phenomenon [5]. The continuous cell proliferation caused by mutationally activated proto-oncogenes or tumor suppressor gene inactivation induces the replication of damaged DNA [6]. Additionally, chronic hypoxia or hypoxia and re-oxygenation cycles contribute to genomic instability [7].

In accordance with the Minister of Health, in Mexico City, there are an estimated 1.2 million dogs. However, animal rights organizations declared an estimate between 3 and 5.5 million dogs [8]. Taking into consideration the canine population and the high incidence of mammary tumors in this species, the disease can be considered a major animal health problem, requiring diagnostic and therapeutic alternatives as well as an outstanding infrastructure to address the issue. Given this scenario, it is mandatory that public and private veterinary hospitals diagnosing canine mammary tumors should increase their investment in order to properly manage the increasing number of patients affected by this disease. In this context, the veterinary professional's preparation, along with scientific breakthroughs, provides adequate support for diagnostic and therapeutic strategies, which are essential to guarantee the dog's quality of life and health.

In Veterinary medicine, the increase in the incidence of neoplastic disease (including mammary tumors) requires continuous development from veterinary oncology specialists. In this respect, retrospective epidemiological studies represent a helpful approach and an important source of information for analyzing neoplastic disease behavior over time. These studies are also useful for establishing risk factors and prognosticating criteria from clinical and histopathological features. Therefore, these may be translated into relevant scientific information that may be used as a basis for experimental studies. This work aimed to determine the epidemiological behavior of canine mammary tumors diagnosed at the Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine (FMVZ) of the National Autonomous University of Mexico (UNAM) during the period from January 2002 to December 2012.

Material and Methods

Epidemiology of Mammary Tumors in Female Dogs This retrospective study focused on reviewing 11,544 dog biopsy samples processed at the Department of Pathology, FMVZ-UNAM (January 2002 to December 2012). The study included 1,917 biopsies of mammary lesions from female dogs. Biopsy files were reviewed, and all of the information regarding mammary tumors (histological types: benign or malignant [9].; nonneoplastic lesions: hyperplasia, dysplasia and / or inflammation) was collected. In every case study, the information about age, sex, breed and hormonal status was obtained. None of the dogs were spayed before the third heat. In fact, most of the animals

were spayed at the time of the mastectomy. Breeds were classified in accordance to their cross height (i.e., the highest point at the loin, where it crosses two imaginary lines, a vertical line (front legs) and a horizontal line (spine), in the following way: small (<35 cm), medium (35–50 cm) and large (> 50 cm), in accordance with the FCI (Federation Cynologique Internationale [10]) Breeds Nomenclature. It should be mentioned that the same height parameter was used for the classification of mixed-breed dogs. The specific anatomical location of the tumor was not considered because such information was not always available.

Statistical analyses

The analysis of data was performed using descriptive statistics and an analysis of variance (ANOVA), as well as bivariate and multivariate analyses. Absolute and relative annual frequencies of the cases were obtained to compare the mammary tumor frequency in female dogs. Cumulative frequencies were compared by fitting Gaussian curves and using the extra sum-of-squares F test to determine if the curves were similar. Furthermore, X² analysis was used for the proportions differentiation to determine if the frequencies of benign or MT (same tissue of origin) were similar.

The studied population was divided in accordance to their size: small, medium and large dogs. Diagnosed females were also classified by age using frequency distributions and constructing histograms.

X² (trend analyses) were used to determine the strength of the associations between the presence of benign or malignant neoplasms and the breed, age group or size category.

A two-way ANOVA, followed by a Sidak's multiple comparison test, was used to evaluate the differences of the mean annual frequency in benign or MT (according to the tissue of origin). The data are presented as the means ± SE or mean and 95% CI.

Lastly, a correspondence analysis (COA) was used to assess the pattern of association among variables exhibited by the female dog breed, size category, tumor morphology and tissue of origin of the mammary lesion. A modification of a previously reported method was used to achieve this objective [11]. This multivariate analysis uses X²-calculated distances to determine the association between groups of variables; for example, a particular breed and any morpho-logical type of mammary lesion. The analysis assumes that, for each group of variables, there is no association between categories. Therefore, the null hypothesis was based on equal distances between variables. In such a case, whenever two categories of a defined variable were closer than any other category, the null hypothesis was rejected, and a correspondence or association

was defined for these adjacent points. The correspondence analysis established sets of combinations amongst the variables. The first combination (first factor or Dim 1) defined a scale of variation that helped discriminate groups of variables. The second combination (second factor or Dim 2) defined the separation of non-related groups. The sum of Dim 1 and Dim 2 explained the percentage of the total variance shown by the data.

In all of the cases, a value of $p < 0.05$ was considered significant. Data were analyzed using SAS 9.0 (Statistical Analysis System, SAS Institute, USA) and Prism 6.0 (Graph Pad Inc., USA).

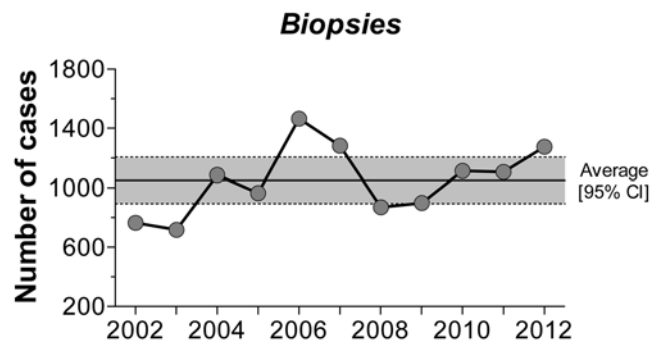


Fig 1. Annual incidence of canine biopsies registered at the Department of Pathology, FMVZ-UNAM (2002–2012).

doi:10.1371/journal.pone.0127381.g001

Results

Frequency of canine mammary tumors during the time of the study

During the 11 years that the study covered, a total of 11,544 tissue biopsies were processed, with an annual average of 1,049 [95% CI: 893.4 to 1206] biopsies (Fig 1). A total of 1,917 processed samples corresponded to mammary gland lesions from intact female dogs (99% of cases of canine mammary tumors—CMT). Of these lesions, 47.8% were BN and 47.5% were MN.

Other lesions accounted for the remaining 4.7% and were diagnosed as non-neoplastic disorders, including hyperplasia, dysplasia or inflammation (Fig 2). Fig 3 presents the time series of the total annual frequency of CMTs during the years of study, in accordance with their biological behavior. The average annual frequency of CMTs was 16.8% [95% CI: 15.3 to 18.2]. The mean average frequencies of BN and MN were 8% [95% CI: 6.5 to 7.9] and 7.8% [IC95% CI:6.5 to 9.1], respectively. Although the frequency of both tumor types was quite similar, the time series showed substantial differences in relation to the biological behavior. The comparison of the adjusted cumulative frequencies depicted in Fig 4 shows that 53% of the cumulative cases of BN were obtained during the period from 2002 to 2006. Conversely, during this period, only 35% of cumulative cases were registered for MN, showing large differences ($p < 0.001$) between the fitted curves and a shift in the accumulation of MN.

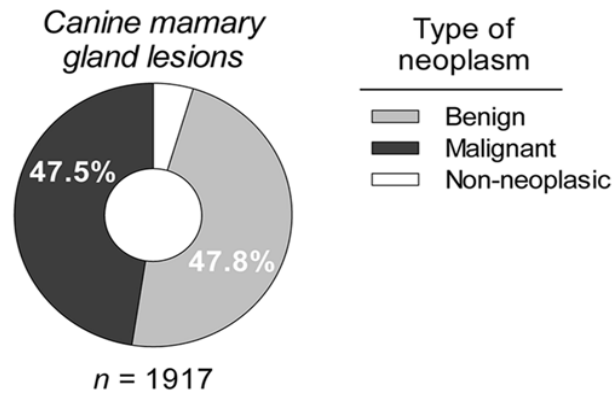


Fig 2. Relative incidence of mammary gland lesions according to biological behavior. doi:10.1371/journal.pone.0127381.g002

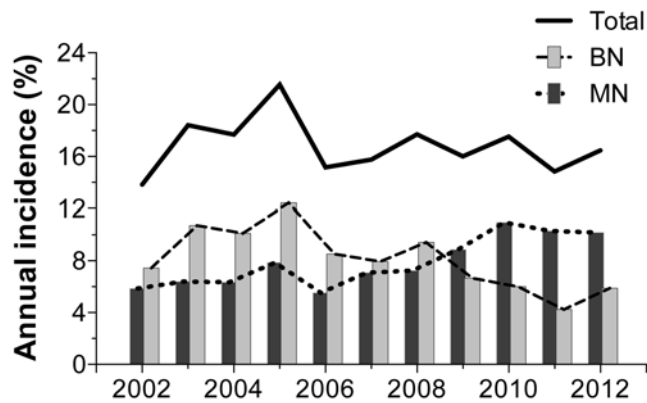


Fig 3. Total annual incidence of canine mammary tumors according to biological behavior. doi:10.1371/journal.pone.0127381.g003

Frequency of occurrence of mammary tumors according to the tissue of Origin

During the study period, the comparison of the frequency of occurrence (CMT) with their tissue of origin presented certain changes in the biological behavior of mammary tumors (Fig 5a– 5c). MN of epithelial origin showed the highest number of cases, followed by mixed tumors.

During 2006 and 2008, a sustained increase was recorded for the occurrence of epithelial and malignant mixed tumors. BN were mostly represented by mixed-origin mammary lesions, and least frequently by epithelial type. Consistently, both MN and BN lesions (mesenchymal origin) were the less frequent. Since 2006, there was a clear decrease in benign mammary lesions (mixed origin), in contrast to the increased number of cases of MN. (Fig 5a–5c). The relative frequency of histological types differed between MN and BN (Fig 6; $p < 0.01$). Epithelial tumors occurred in 69% of the malignant lesions, while benign mixed tumors were more plentiful in comparison to MN (56% and 29%, respectively). The annual frequency of epithelial and mixed tumors was different ($p < 0.001$) between benign and MN (see Table 1). Despite the fact that mesenchymal MN showed an annual prevalence four times higher than BN, no significant difference was found ($p > 0.05$). It is important to mention that highly significant differences were found ($p < 0.001$) when comparing the average annual frequencies of the three histological types for each biological behavior.

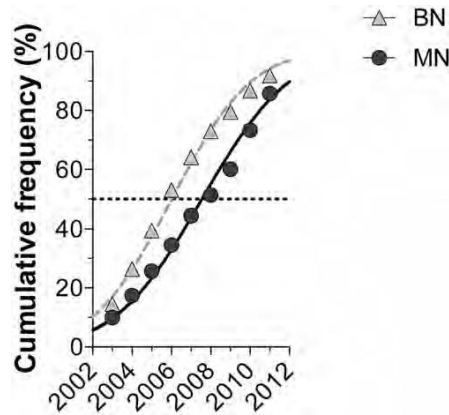


Fig 4. Gaussian-fitted annual cumulative frequency of mammary tumors. BN: Benign tumor; MN: Malignant tumor.
doi:10.1371/journal.pone.0127381.g004

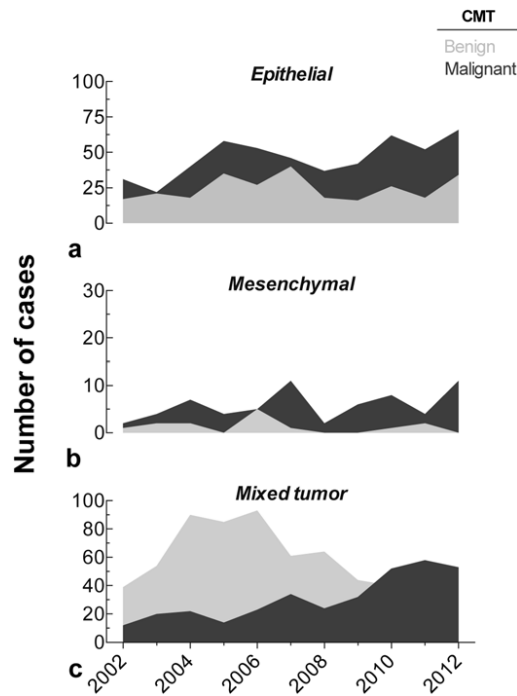


Fig 5. Time series of the number of benign or malignant cases of canine mammary tumors classified according to the tissue of origin: (a) Epithelial, (b) Mesenchymal or (c) Mixed tumor.
doi:10.1371/journal.pone.0127381.g005

Table 1. Annual frequency of canine mammary tumors according to the tissue of origin (2002–2012).

Tissue of origin	CMT Benign (%)	CMT Malignant (%)	p value
Epithelial	30.4 ± 8.9 ^b	56.8 ± 9.7 ^a	< 0.001
Mesenchymal	1.5 ± 1.5 ^c	6.9 ± 2.7 ^c	> 0.05
Mixed tumor	68.0 ± 8.9 ^a	36.2 ± 9.1 ^b	< 0.001

^{a,b,c} For benign or malignant neoplasm, uncommon superscript between tissue origin indicates differences at $p < 0.001$.

doi:10.1371/journal.pone.0127381.t001

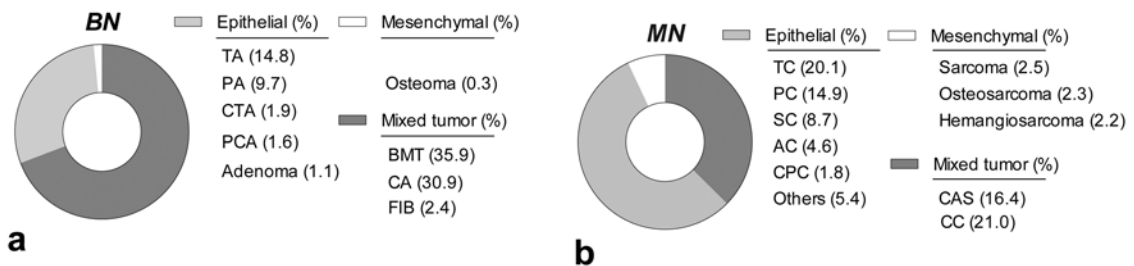


Fig 7. Relative frequency of the main morphological types of canine mammary tumors classified according to the tissue of origin: (a) benign and (b) malignant neoplasms.

doi:10.1371/journal.pone.0127381.g007

Main morphological diagnosis in canine mammary tumors

Figs 7–9 show the relative occurrence of a variety of morphological types of CMTs. As mentioned above, mixed BN accounted for the highest number of the total cases, of which 35.9%, 30.9% and 2.4% were benign mixed tumors (BMT), complex adenoma (CA) and fibroadenoma (FIB), respectively. The most frequent benign lesions (epithelial origin) were tubular adenomas (TA), followed by papillary adenomas (PA), cystic tubular adenomas (CTA), papillary cystic adenomas (PCA) and adenoma. Hemangioma and osteoma represented the benign mesenchymal tumors (Fig 7a). From the malignant epithelial tumors group, the most frequent morphological diagnoses corresponded to tubular carcinoma (TC), papillary carcinoma (PC), solid carcinoma (SC), anaplastic carcinoma (AC) and cystic papillary carcinoma (CPC), among others.

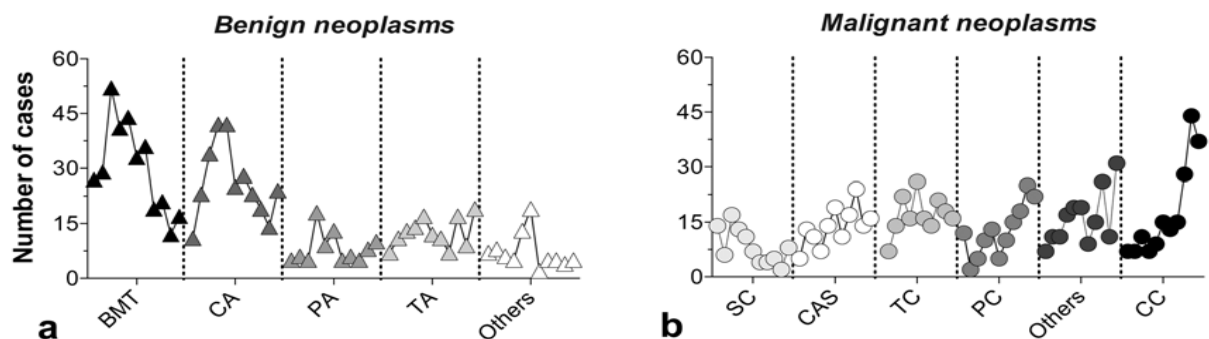


Fig 8. Temporal changes in the frequency of the main morphological types: (a) benign and (b) malignant canine mammary tumors.

doi:10.1371/journal.pone.0127381.g008

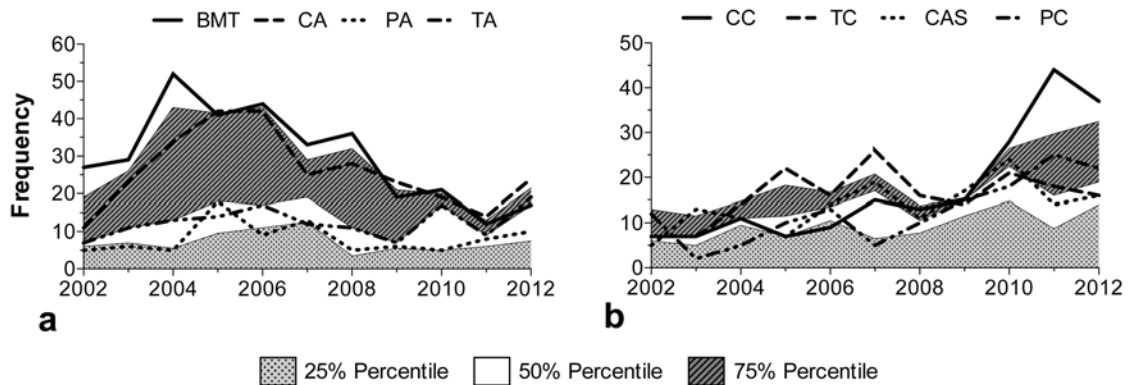


Fig 9. Times series showing the annual frequency allocation of the main morphological types: (a) benign and (b) MN in the epidemiological curves, formed with the 25th, 50th and 7th percentiles for the total frequency of mammary lesions.
doi:10.1371/journal.pone.0127381.g009

The mixed-origin MN were complex carcinoma (CC) and carcinosarcoma (CAS). Finally, osteosarcoma, sarcoma and hemangiosarcoma were diagnosed within the mesenchymal MN (Fig 7b).

Fig 8a and 8b present the time series in relation to the BN and MN main morphological types. BNA clear reduction in BN was observed over time, and reductions also occurred for BMT and CA, representing the two main types of BN. Over time, the behavior of epithelial tumors was essentially alike. In regards to MN, four out of the five major morphological diagnoses showed sustained increases in the frequency of occurrence. Moreover, to corroborate the abovementioned epidemiological trends, the 25th, 50th and 75th percentiles of all cases of CMT for BN and MN were plotted. The information is summarized in Fig 9a and 9b. For BN, the BMT and CA curves were located above the region corresponding to the 75th percentile, while the PA and TA curves were located within the 50th percentile. This area comprised the average frequency of all of the types of BN (Fig 9a). It is important to note that the MN curves had higher variability due to the recent upsurge in the occurrence of this type of lesion. Indeed, the curves corresponding to CAS, CC and TC were positioned over the 75th percentile, indicating an increase in the occurrence of these morphological types (Fig 9b).

Female dog's breed and age and their connection with the presence of canine mammary tumors

Fig 10 shows a summary of the affected breeds according to animal size. The predominant category corresponded to small breed female dogs (48.4%). From this category, the Poodle and Cocker Spaniel breeds stood out in terms of frequency ($n = 299$ and 256 , respectively), representing a total of 33.3%. Medium breeds represented 29.1% and were characterized by mixedbreed animals. This category presented the highest frequency among the total CMT; 332 cases and 20.1% of the evaluated tumors. It is important to highlight that the CMT frequency according to the breed showed a higher percentage among those phenotypically purebred animals in comparison to mixed-breed animals (80% vs. 20%, respectively). Finally, large-sized female dogs had the lowest frequency of occurrence (22.3%). The principal breeds within this group were the German Shepherd, Labrador Retriever and Rottweiler. No association was found ($p > 0.05$) when the occurrence of BN and MN tumors was compared to the size category. The studied population was divided into four age groups (Fig 11). Interestingly, adult animals (aged 9–12 years) showed the highest CMT frequency, followed by the group of 5- to 8-year-olds. Both groups included more than 70% of the cases. Despite obtaining these results, no significant strength of association ($p > 0.05$) between age groups and MN or BN presence (within the three evaluated sizes) was detected through X2 analysis and the odds ratio calculation.

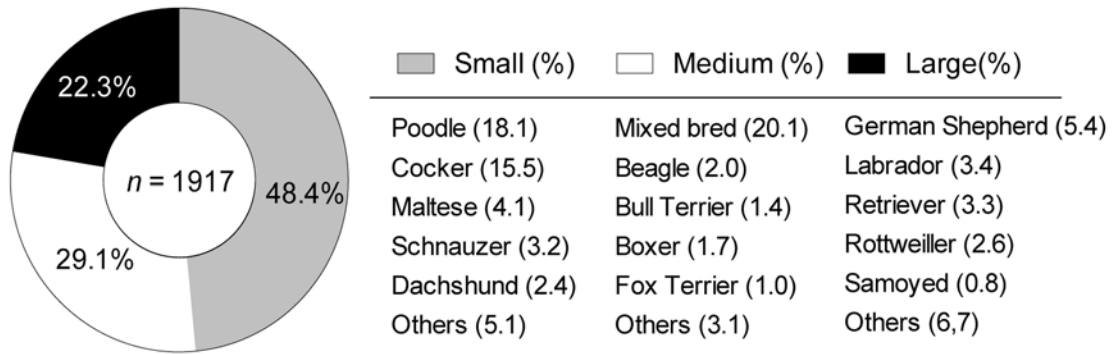


Fig 10. Percentage of female dogs showing mammary tumors classified according to their breed and categorized by size group.

doi:10.1371/journal.pone.0127381.g010

Fig 12 shows the CMT frequency distribution according to the biological behavior for each age group. A lack of association ($p > 0.05$) between these variables is shown, as the curves registered a very similar behavior. Jointly, these results suggested that the presence of benign or MN was independent from the affected animal age and/or size.

Correspondence analysis (COA) was used to assess the strength of association between breeds, tissue of origin and morphological type of CMT. This multivariate analysis was performed according to the tumor size category and biological behavior. In this respect, COA is an extremely useful multivariate statistical tool to use to find patterns of association between nominal variables, such as those included in this work.

For small-sized breeds, the Poodle and Schnauzer showed the strongest CC and TC association, judging by the proximity between the variables included in the analysis and formed groups. Meanwhile, the Cocker Spaniel showed a higher correspondence or association with CAS and mesenchymal origin tumors.

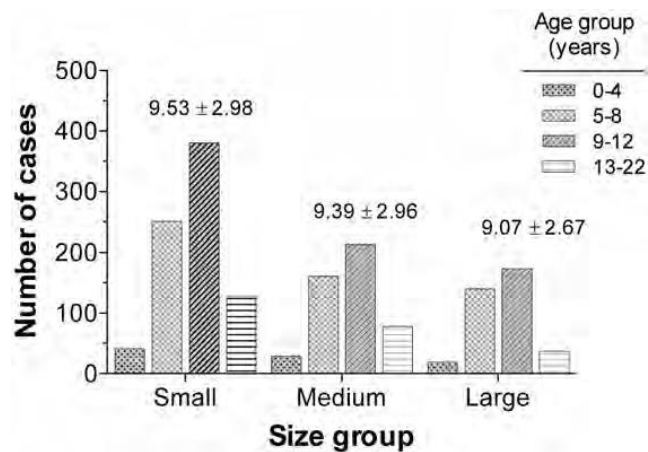


Fig 11. Age group distribution. Female dogs diagnosed with mammary lesions classified according to their size.

doi:10.1371/journal.pone.0127381.g011

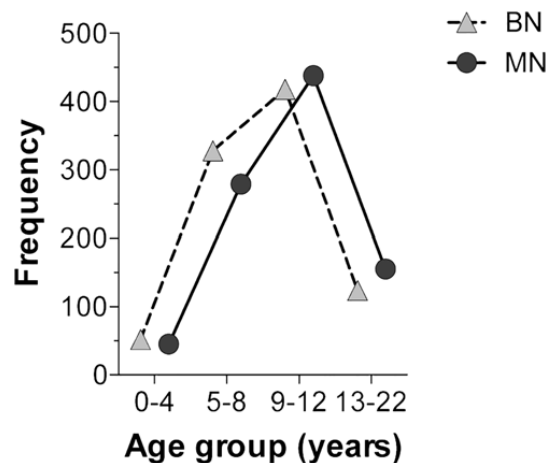


Fig 12. Age group distribution. Female dogs diagnosed with benign or malignant neoplasm.
doi:10.1371/journal.pone.0127381.g012

Maltese dogs were mainly associated with epithelial tumors (Fig 13a). Medium-sized dogs (e.g., Mixed breed, Beagle and Boxer) formed a well-defined group, showing a strong association with mixed-origin tumors (CAS and CC) and two of the main epithelial tumors (Fig 13b).

Lastly, large-sized breeds showed a pattern consistent with the one shown in medium-sized breeds. A compact group was formed by the mixed-origin tumor and two of the main epithelial tumors (PC and CT), and these tumors were all closely associated with German Shepherds and Rottweilers (Fig 13c).

We must consider that within BN, mixed-origin tumors (MBT and CA) represent approximately 60–70% of all of the observations for all breeds. For this reason, the correspondence analysis did not show any association between breeds, tissue of origin or morphological type of cancer.

Discussion

This study allowed us to confirm that females were mainly affected by CMT. In veterinary medicine, mammary tumors represent the most frequently diagnosed neoplasm in intact female dogs [5]. A study of the incidence of canine mammary tumors showed that tumors occurred in 0.05% of females spayed before the first heat cycle, and this incidence increased to 8% or 26% when the animals were spayed after the first or second heat. If the animal was spayed after this period of time, the risk of developing MN was the same as for an unsplayed bitch [2].

It is widely known that females are predisposed to present this disease because of the tropism of natural estrogens in relation to the mammary gland that are capable of stimulating cell proliferation and generating carcinogenesis through potential cells. Likewise, it represents stimulation in transformed or pre-initiated cells in order to promote its expression [12]. Epidemiological studies performed on animals indicated that 17 beta-estradiol (E2) was linked to breast cancer. It is known that E2 can be activated by epoxidation and that it is surely capable of inhibiting DNA synthesis for DNA-binding and adduct formation (in vivo and in vitro), playing an important role as a mammary carcinogenesis promoter [13].

CMT frequency reported in different countries may vary according to the place where the study was conducted. The study performed in Mexico (16% CMT frequency) was similar to the one conducted in Venezuela [14]. (17.1% CMT frequency). These studies both reported the presence of mammary gland tumors in 221 biopsies from dogs. Currently, in developed countries, the frequency of female dog mammary tumors has diminished due to reproductive health policies. These programs are responsible for spaying animals at an early age, and as a result, there are fewer chances of developing the disease. In female dogs, mammary cancer is a heterogeneous group in terms of morphology and biological behavior [4]. Mammary tumors represent 50% of all malignancies affecting unsplayed female dogs [15]. This information is consistent with our report, which found 41–53% MN [16]. A previous study clearly showed 28 malignant and 57 BN, despite the fact that in 15 of the cases, the tumor behavior was unclassified [17].

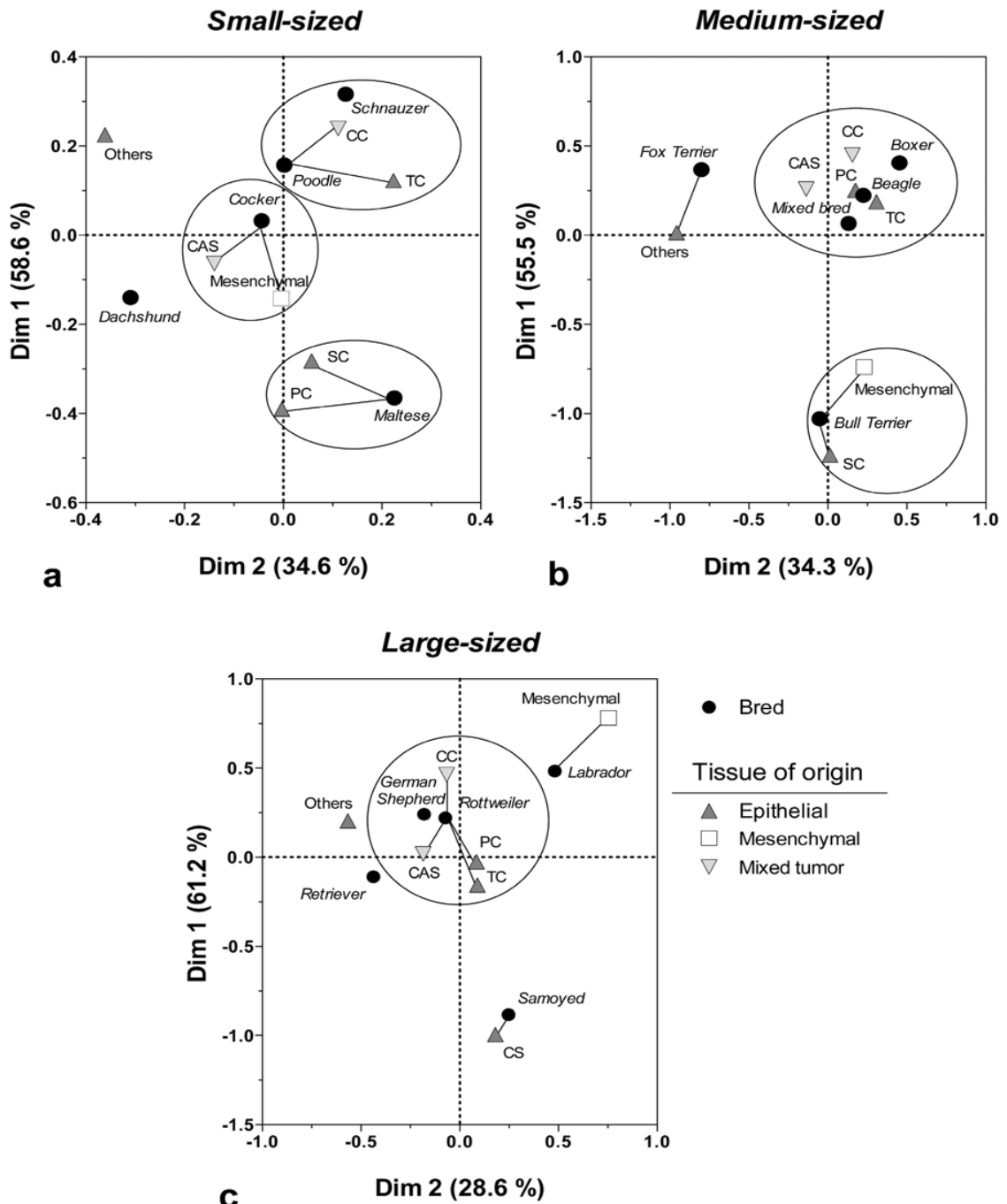


Fig 13. Correspondence analysis of the pattern of association between breed, morphological type and tissue of origin, in relation to canine mammary tumors: (a) small-sized, (b) medium-sized, and (c) large-sized female dogs diagnosed with malignant neoplasm. The association between variables is interpreted according to the distance that separates the adjacent categories of each variable. Thus, the lesser the distance, the greater the correspondence or association between groups of variables. Dim 1 and Dim 2 were defined as the main variance components within the multivariate analysis, accounting for 89–93% of the explanation of the total variation exhibited by the data.

doi:10.1371/journal.pone.0127381.g013

Recently, the number of malignant diagnoses increased, and this situation can be linked to the habits of pet owners, who may expose their dogs to oncogenic substances. In recent years, the incidence of mammary tumors has increased in female dogs, perhaps due to environmental pollution and, more specifically, due to chemical exposure [18]. Furthermore, epidemiological studies showed that rodenticides were environmental pollutants involved in the development of tumors, including mammary cancer [19]. Moreover, it is extremely probable that diet, body mass and estrogens may be the cause of mammary cancer in female dogs, as in humans. When diet, fat and hormones are combined, these factors can induce or promote mammary cancer by genomic damage. The relationship between dietary fat and cancer is very complex, as certain fat metabolites binding to steroid receptors are capable of raising or lowering DNA transcription functions. Body fat deposits may also alter the hormonal balance, as adipocytes are important sources of testosterone and thus estrogen synthesis. Androgen conversion into estrogen can be proportional to the body mass and body fat degree [20].

In regards to the histological type of the CMT, this study mainly observed mixed epithelial tumors. The most common tumors were of epithelial origin, followed by mesenchymal, representing almost 1% of mammary cancers [21]. Adenocarcinoma was reported as the most common lesion (52.3%), followed by mixed tumors (44.7%) and fibrosarcoma (2.7%) [14]. Other researchers have included histologic diagnoses among seven carcinomas in situ: 19 simple carcinomas, 25 complex/mixed carcinomas (16 complex tubulopapillary carcinomas and four mixed types) and squamous cell carcinoma [22]. Likewise, another review was classified as single carcinoma (33.3%) and complex carcinoma (66.7%) [18]. Finally, a higher frequency of MN (78.3%) was reported as follows: simple carcinoma (28.3%), complex carcinoma (15.09%), mixed type carcinoma (15.06%) and carcinosarcoma (13.85%); second, benign: (12.27%) benign mixed tumor (4.72%), adenoma (3.3%) and fibroadenoma (2.83%); and to a lesser extent non-neoplastic lesions (8.2%) and 1.4% tumors were unclassified [23].

A number of epidemiologic studies were consistent with our report. The most affected breeds are the small breeds, according to the location of the study. Nevertheless, the problem is increasing in large-sized animals. In our study, the breeds most commonly affected by CMT were the Poodle, Cocker Spaniel, German Shepherd and Labrador Retriever, which were among the most popular breeds affected by CMT, as well as Dachshund, Yorkshire Terrier, Shih Tzu, Beagle and Boxer [24]. In other studies the most commonly reported breeds affected by CMT include Poodle, Maltese, Chihuahua, Beagle, Yorkshire Terrier, Bichon Frisé, Cocker Spaniel, English Springer Spaniel, Setter, Hound and German Shepherd [25]. A study conducted in Sweden noted that English Springer Spaniels had a clear predisposition to mammary cancer (36%), [17] followed by Spaniel Cocker, Doberman, German Shepherd and Boxer [26].

Venezuela has mainly reported CMT in purebred dogs, including Cocker Spaniel, Poodle and German Shepherd [14]. Mammary tumors were observed on 155 patients as follows: Poodles (83 cases); Cocker Spaniels (11 cases); Crossbreeds (10 cases); Boxers (6 cases); and German Shepherds (5 cases) [23]. In India, the disease was reported in crossbreed dogs (19.61%), German Shepherds (17.66%) and Labrador Retrievers (13.73%) [27].

There is a wide age range for presenting CMT. Some studies reported that CMT presented between approximately 3 and 22 years, with an average of 9 years [23]. The current study had a range from 3 to 15 years old, with an average age of occurrence from 9 to 12 years old. However, some breeds may develop CMT at younger ages. For example, the Springer Spaniel (Swedish population) had an average age of 6.9 years old [26]. Similarly, certain researchers found that in a group of 45 female dogs, the most affected were the dogs between 4 to 15 years old [22].

Another study reported the disease in dogs between 2 and 16 years old, with an average of 9 years old. The higher incidence presented in animals between 10 to 12 years old (31.37%), followed by animals between 8 and 10 years old (23.53%). A lower incidence was reported in dogs over 14 years old. The disease was not present in patients less than 2 years old [27]. In both women and female dogs, mammary tumors rarely occur before 25 years old and 5 years old, respectively [28].

Additionally, there is no statistically significant relationship between the different histologic diagnoses and breed, age, tumor size, reproductive history and exogenous hormone treatment application. This observation was congruent with our results, as we did not find a relationship between the CMT and the affected dog's age. Nevertheless, we did observe a certain degree of association in some breeds that presented histological types of CMT. This

situation requires widening the research in regards to family inherited mammary cancer through molecular genetics [23].

This study noted that the CMTs average annual frequency did not appear to have suffered any alteration (Fig 10). However, this study is important, as Mexico has manifested a canine population growth within the last few years. According to the Federation Cynologique Internationale (FCI), [10] over the past few years, the pure breeds' records have increased. A total of 486,246 pure breed dogs were registered during 2008. In 2012, this number increased to 634,944. The INFOMEX System of Mexico City (INFOMED) stated that there are an estimated 1.2 million dogs in the city.

During April 2014, Consulta Mitofsky (a private polling firm) was in charge of conducting a survey in Mexico. This survey confirmed that over the last 3 years, a significant number of Mexican homes contained pet dogs (3%), regardless of their economic status (87.4%- low socioeconomic status and 88.6%-high socioeconomic status). The survey indicated an estimated average of 2.5 visits to the veterinary doctor per year. Owners with the lowest socioeconomic status led this practice [29]. In addition, Mexico does not have canine reproduction laws, and for this reason, Mexican people are not accustomed to neutering bitches. Often, the animal reaches the age of maturity without being spayed, becoming more susceptible to different types of diseases, including CMTs.

Conclusions

The results of this study supported the conclusion that, in female dogs, mammary tumors are a major animal health problem that is increasing, and further development and research using veterinary oncology is required. In dogs, mammary tumors frequently present as benign and malignant lesions, often showing similar frequencies. Nevertheless, in recent years, there has been a significant tendency toward MN. It should be stressed that the most common mammary cancers were epithelial, that the most affected patients are adult females to elderly individuals, and that there was no direct relationship between age and biological behavior. Likewise, purebred small-sized (Poodle and Cocker Spaniel) female dogs had higher frequencies of CMT.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: YS AAM DD LPR. Performed the experiments: YS AAM DD LPR. Analyzed the data: YS AAM DD LPR. Contributed reagents/materials/analysis tools: YS AAM DD LPR. Wrote the paper: YS AAM DD LPR.

References

1. Moe L. Population-based incidence of mammary tumors in some dog breeds. *J Reprod Fertil Suppl.* 2001; (57): 439–443. PMID: [11787188](#)
2. Schneider R, Dorn CR, Taylor DO. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J Natl Cancer Inst.* 1969; (43):1249–61. PMID: [4319248](#)
3. Wey N, Gutberlet K, Khon B. Mamma tumore bei der huding: Hormolle abh angigkeit unter besonderer berucksichtigung von 17 β ostradiol und progesteron. *Kleintierpraxis.* 2000; (45):19–31.
4. Goldschmidt M, Pe a L, Rasotto R. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol.* 2011; (48):117–131. doi: [10.1177/0300985810393258](#) PMID: [21266722](#)
5. Klopffleisch R, Lenze D, Hummel M, Gruber A. Metastatic canine mammary carcinomas can be identified by a gene expression profile that partly overlaps with human breast cancer profiles. *BMC Cancer.* 2010; (10):618. doi: [10.1186/1471-2407-10-618](#) PMID: [21062462](#)
6. Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science.* 2008; (319): 1352–1355. doi: [10.1126/science.1140735](#) PMID: [18323444](#)
7. Bristow RG, Hill RP. Hypoxia and metabolism: hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat Rev Cancer.* 2008; (8):180–192. doi: [10.1038/nrc2344](#) PMID: [18273037](#)
8. Sosa I, Sarabia D. Perros Callejeros Invaden la Ciudad de M xico. *Reforma.* Available: <http://noticias.terra.com.mx/mexico/df/perros-callejeros-invaden-la-ciudad-de-mexico, e9c28e8d9dc6d310VgnVCM3000009accebb0aRCRD.html>. 04.11.13

9. Misdorp W, Else RW, Hellmen E, Lipscomb TP. Histologic Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat. Armed Force Institute of Pathology and World Health Organization. 2nd ser., vol. 7. Washington, DC; 1999.
10. Federation Cynologique Internationale. Available: <http://www.fci.be/en/Statistics-from-our-memberscontract-partners-79.html>. Accessed 16 January 2015.
11. Rodriguez-Lara V, Peña-Mirabal E, Baez-Saldaña R, Esparza-Silva AL, García-Zepeda E, Cerbon Cervantes MA, et al. Estrogen Receptor Beta and CXCR4/CXCL12 Expression: Differences by Sex and Hormonal Status in Lung Adenocarcinoma. *Archives of medical research*. 2014; 45(2): 158–169. doi:10.1016/j.arcmed.2014.01.001 PMID: 24486245
12. Nitin T, Meena K, Leon B. Estradiol Metabolism: An Endocrine Biomarker for Modulation of Human Mammary Carcinogenesis. *EPH*. 1997; (105): Supplement 3.
13. Yu FL. 17Beta-estradiol epoxidation as the molecular basis for breast cancer initiation and prevention. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2002; (11) Suppl 7:S460–6. PMID: 12492635
14. Corro A, Salas Y, Méndez D, Orlando O, Colmenárez V. Neoplasias de glándula mamaria en caninos diagnosticadas por histopatología en el Hospital Veterinario "Dr. Humberto Ramirez Daza" durante el periodo de Enero 2004 Julio 2005. III Jornadas estudiantiles de investigación y desarrollo de la UCLA. 2005.
15. Oliveira LO, Oliveira RT, Loretto A. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. *Act Sci Vet*. 2003; (31):105–110.
16. Fonseca CS, Daleck CR. Neoplasias mamárias em cadelas: influencia hormonal e efeitos da ovariectomia como terapia adjuvante. *Ciência Rural*. 2000; (30):731–735.
17. Rivera P, Melin M, Biagi T., Fall T, Häggström J, Lindblad-Toh K. Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. *Cancer Res*. 2009; (69):8770–8774. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1725 PMID: 19887619
18. Andrade F, Figueroa F, Bersano P. Malignant mammary tumor in female dogs: environmental contaminants. *Diagn Pathol*. 2010; (5):45. doi: 10.1186/1746-1596-5-45 PMID: 20587072
19. Environmental Protection Agency—EPA: Health Effect Division. Office of Pesticide Programs. Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential. Informative, 2006; 49.
20. Coffey DS, Walsh PC. Clinical experimental studies of benign prostatic hyperplasia. *Urol Clin North Am*. 1990; (17):461–475. PMID: 1695775
21. Blanchard DK, Reynolds CA, Grant CS. Primary non-phyllodes breast sarcomas. *Amer J Surg Pathol*. 2003; (186) 359–361.
22. Sassi F, Benazzi C, Castellani G. Molecular-based tumor subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *BMC Vet Res*. 2010; (6):5. doi: 10.1186/1746-6148-6-5 PMID:20109214
23. Sontasa, Ozyogurtcub H, Gurelb A. Evaluation of clinical and pathological characteristics of 155 canines with mammary tumors: a retrospective study. *Arch Med Vet*. 2009; (41):53–59.
24. Perrospedia, Las diez razas de perros más populares. Available: <http://www.perrospedia.com/las-10razas-de-perros-mas-populares>. Accessed 17 November 2014.
25. Bronden LB, Nielsen SS, Toft N, Kristensen AT. Data from the Danish veterinary cancer registry on the occurrence and distribution of tumors in dogs in Denmark. *Vet Record*. 2010; (166):586–590. doi: 10.1136/vr.b4808 PMID: 20453236
26. Egenvall A, Bonnett BN, Ohagen P. 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):109–27. PMID: 15899300
27. Kuldip G, Naresh K, Sanjeev K, Mohindroo J, Mahajan M, Raghunath M. Epidemiological Studies on Canine Mammary Tumor and its Relevance for Breast Cancer Studies. *IOSR-PHR*. 2012; (1):322–333.
28. Cohen D, Reif JS, Brodey RS. Epidemiological analysis of the most prevalent sites and types of canine neoplasia observed in a veterinary hospital. *Cancer Res*. 1974; (34):2859–68. PMID: 4529096
29. Consulta Mitofsky, México: Las mascotas en nuestros hogares. Available: <http://consulta.mx/web/index.php/estudios-e-investigaciones/mexico-opina/191-mexico-58-de-los-hogares-tiene-mascotas>. Accessed 16 January 2015.

Capitulo II

Asociación de las características histológicas con los posibles factores de riesgo y la sobrevivida en tumores mamarios caninos

Association of histological featureswith potential risk factors and survivalin canine mammary tumors

En el presente capitulo se desarrolla el objetivo específico N° 2 y 3. Determinar los factores de riesgo (edad, raza, condición corporal, datos ginecológicos) de las pacientes con tumor mamario canino. Y Clasificar las neoplasias mamarias según parámetros clínico-patológicos tales como: número y tamaño de los tumores y tipo histológico. Publicado en Veterinaria México OA Vol. 3; No. 1 January-March 2016

RESUMEN

Las características epidemiológicas y clínico-patológicas del Tumor Mamario Canino presentan información valiosa para analizar el comportamiento de la enfermedad y son un recurso potencial para los avances del cáncer de mama en mujeres. El objetivo de este trabajo fue asociar las características histológicas, factores de riesgo y sobrevida en perras con Tumor Mamario. De 80 perras enteras, se recolectaron 178 tumores mamarios, los cuales fueron evaluados según el número y tamaño de los tumores y clasificados histológicamente; de cada paciente se obtuvo información referente a edad, raza, condición corporal, datos ginecológicos, recidiva y sobrevida a los 18 meses post-cirugía. En nuestro estudio, la mayoría de las pacientes fueron mayores de ocho años de edad, con al menos un tumor maligno, que solía ser solitario, de gran tamaño y de mal pronóstico. Los tumores más frecuentes fueron los de origen mixto, los benignos, y los epiteliales malignos (adenoma complejo, tumor mixto benigno, carcinoma complejo y carcinoma tipo mixto). Las razas más frecuentemente afectadas fueron el Poodle, Cocker Spaniel y Dachshund; sólo el Cocker, Labrador y Pastor Alemán presentaron mayor riesgo. En general los datos indican que el Tumor Mamario Canino afecta principalmente hembras enteras, adultas mayores de 8 años, se presenta en diversas razas; cursa con mortalidad alta y sobrevida corta en pacientes con tumor maligno de gran tamaño; por otra parte, las razas más frecuentemente afectadas no necesariamente son las más predispuestas. Nuestros datos no apoyan la hipótesis de mayor riesgo de Tumor Mamario Canino en perras nulíparas.

Palabras claves: Tumor mamario canino, epidemiología, sobrevida, características clínico-patológicas.

¹Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud y Producción Animal
 Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
 Universidad Nacional Autónoma de México
 Av. Universidad 3000, Ciudad de México
 04510, México

²Departamento de Patología
⁵Departamento de Fisiología
 Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado"
 Núcleo Héctor Ochoa Zuleta
 Final Avenida Ribereña
 Cabudare 3023, Lara, Venezuela

³ Department of Pathology and Microbiology
 University of Prince Edward Island
 550 University Avenue, Charlottetown
 Prince Edward Island, Canada C1A 4P3

⁴Departamento de Genética y Bioestadística
⁶Departamento de Medicina, Cirugía y Zootecnia en Pequeñas Especies
⁷Departamento de Patología
 Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
 Universidad Nacional Autónoma de México
 Av. Universidad 3000, Ciudad de México
 04510, México

***Corresponding author:**
 Tel: 044-55-4554-1442
 Email address:
 ysalas@ucla.edu.ve

Association of histological features with potential risk factors and survival in canine mammary tumors

Abstract The epidemiological and clinicopathological features of canine mammary tumors may provide valuable information to facilitate analysis of the behavior of the disease and represent a potential tool for the study of breast cancer in women. The aim of this study was to associate the histological features of canine mammary tumors with potential risk factors and survival. One hundred and seventy-eight mammary tumors were collected from 80 female dogs. The statistical analyses consisted of a series of univariate studies and frequencies of the different study variables, such as a bivariate analysis with the Chi squared test (χ^2), a relative risk and Kaplan Meier survival analysis, and a multiple correspondence analysis was used to correlate the tumor's biological behavior with the dogs' breed. Most patients were older than 8 years and had at least one malignant tumor, which was usually solitary and measured more than 6 cm; these patients had poor survival. The most frequent tumors were a complex adenoma, benign mixed tumor, carcinoma complex and mixed type carcinoma. The most commonly affected breeds were Poodle, Cocker Spaniel and Dachshund, and the breeds at the highest risk of tumor development were Cocker Spaniel, Labrador Retriever and German Shepherd. Overall, the data indicated that mammary tumors in dogs mainly affected older females with malignant tumors and that there were high mortality and short-term survival rates. However, the most commonly affected breeds were not necessarily the most susceptible. Our data do not support the hypothesis of an increased risk of canine mammary tumors in nulliparous female dogs.

Keywords: Canine mammary tumor; Epidemiology; Survival; Clinicopathological features.

Received: 2015-07-30
 Accepted: 2016-03-14
 Published: 2016-03-28
 Additional information and declarations can be found on page 12

© Copyright 2016
 Yaritza Salas *et al.*
 open access 
 Distributed under Creative Commons CC-BY 4.0

Yaritza Salas^{1,2*}
 0000-0003-2129-3124
 Enrique Aburto³
 0000-0001-9190-0044
 Rogelio A. Alonso⁴
 0000-0002-4159-1682
 Adelys Márquez⁵
 0000-0001-6286-6043
 Hortensia Corona⁶
 0000-0002-3751-8319
 Laura Romero⁷
 0000-0002-5158-8129

Introduction

Mammary cancer is the most common malignant neoplasm in intact dogs. Canine mammary tumors (CMTs) can vary in size from a few millimeters to several centimeters; they can exist in multiples (at least in 50% of the cases) and usually involve the caudal glands (Wey *et al.*, 2000). Histologically, CMTs are classified as malignant epithelial neoplasms (carcinomas), special types of carcinomas, malignant

mesenchymal neoplasms (sarcomas), carcinosarcomas and benign neoplasms (Goldschmidt *et al.*, 2011).

Some risk factors associated with mammary gland tumors in dogs include gender and breed; it is well known that females are predisposed to the disease due to the tropism of natural estrogens for the mammary gland (Yu *et al.*, 2002). Epidemiological studies often report a higher susceptibility in small-size breeds, although the number of reports in large-size breeds is increasing. The most frequently affected breeds include Poodle, Maltese, Chihuahua, Beagle, Yorkshire Terrier, Bichon Frisé, Cocker Spaniel, Springer Spaniel, Irish Setter and German Shepherd, among others (Bronden *et al.*, 2010). In a retrospective study of biopsies of lesions in the mammary gland of female dogs, Salas *et al.* (2015) observed the epidemiological characteristics of canine mammary tumors and concluded the following: (1) mammary tumors in intact dogs had a high incidence (16.8%); (2) benign and malignant tumors had similar frequencies (47.7% vs. 47.5%, respectively); (3) epithelial tumors were the most common; (4) the most commonly affected dogs were old adult females (9 to 12 years old), purebreds (Poodle and Cocker Spaniel) and small-size dogs; and (5) there was an increase in malignant tumors in the last four years of the study. Therefore, mammary tumors in dogs are an important animal health problem that needs to be solved by improving veterinary oncology services in Mexico.

The increasing number of neoplastic conditions found in veterinary medicine, including mammary neoplasms, justifies further research efforts in the field of veterinary oncology. In this regard, it is necessary to develop studies that correlate histological features with a clinical outcome and to establish the most significant risk factors associated with the development and clinical behavior of canine mammary tumors. This development would provide valuable information that could be used to improve the diagnosis, prognosis and treatment of CMT patients. In addition, this information could be compared to data from other countries. It is also important to identify molecular markers that may help to achieve more accurate

diagnoses, provide prognostic information, and offer better treatment options for canine patients with mammary cancer. In turn, because dogs with spontaneous mammary tumors have proven to be an animal model *par excellence* (Gama *et al.*, 2008; Cassali *et al.*, 2006), defining the most significant clinicopathological features of CMTs may offer valuable information for the study of breast cancer in women. We hypothesized that there is an association among histological features, risk factors and survival in female dogs with mammary tumors.

Material and methods

Eighty patients with mammary tumors undergoing lumpectomy or mastectomy at the Teaching Animal Hospital in FMVZ-UNAM from February 2012 to October 2013 were included in this study with the consent of their owners. Sampling was performed by convenience, as the typical cases were selected (Casal *et al.*, 2003).

Because most patients had more than one tumoral mass, a total of 178 different mammary tumors were analyzed. To calculate the relative risk (RR), 80 patients over 4 years of age were randomly selected from hospital files, and these patients did not have a medical appointment not related to a mammary neoplasia during the same period of time were added to this study. Information on age, breed, body condition score and gynecological data (OVH and parity) was obtained from these patients.

The number and size (largest dimension) of tumors was obtained from each patient. Tissue specimens were fixed for 48 hours in 10% buffered formalin; they were trimmed, processed, embedded in paraffin, cut at 5 mm and stained with hematoxylin and eosin (H&E) (Thomas, 1995). Histological sections were reviewed and classified according to the grading of canine mammary tumors proposed by Goldsmith *et al.* (2011), which includes histogenesis, differentiation and anaplasia, and evidence of local invasion (stromal and vascular). Histological classification was established by the consensus of three experts. Risk factors included age, breed, body condition (based on a scale of 1 to 5, where: 1 = emaciated, 2 = underweight, 3 = ideal, 4 = overweight, and 5 = obese) and gynecological data.

To determine the biological behavior of the tumors, these 80 patients

were followed up with regard to their general health status, evidence of recurrence or metastasis, and survival every 6 months during a period of 18 months after the initial surgery (patients were excluded if they died from suggestive causes of mammary disease, based on evidence of metastasis from clinical data. Some of the follow-up patients had X-ray analysis, others had X-rays and ultrasounds, and other patients were only examined physically.

Statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics 22 (IBM Corporation, 1994- 2016, USA) and consisted of a series of univariate analyses and frequencies of the different variables, bivariate analysis with the Chi Squared test (χ^2), relative risk and Kaplan Meier survival analysis. A $P < 0.05$ value was considered statistically significant. A multiple correspondence analysis (MCA) (Costa *et al.*, 2013) was performed between the biological behavior of the tumor and the dogs' breed (both purebreds and mixed-breeds were included). The graphs were built using the Prism 6.0 package (GraphPad Software, Inc., USA).

Results

Number and size of tumors

From the 80 dogs studied, 55 (68.7%) had multiple mammary masses in different mammary glands, whereas only 25 of them showed solitary tumors (31.3%). In total, 178 different tumors were analyzed. In most cases, the dogs had between 2 (59/178; 33.1%) to 3 tumoral masses (46/178; 25.8%), and a few patients showed 11 (5/178; 2.8%) to 18 (4/178; 2.2%) masses. Of these 178 tumors, 104 (58.4%) were benign tumors, and 74 were malignant (41.6%). In addition, it was observed that single malignant tumors (15/74; 20.3%) were more common than single benign tumors (10/104, 9.6%) ($\chi^2 P < 0.04$).

The sizes of the major tumoral masses varied; the most frequent size was < 3 cm (104/178; 58.4%), which was followed by tumors > 6 cm (43/178; 24.2%) and tumors between 4 to 5 cm (31/178; 17.4%). The biological behavior and size of the tumoral masses correlated, showing a highly significant difference ($\chi^2 P < 0.05$), with a trend for benign neoplasia < 3 cm and for malignant neoplasia > 6

cm (Fig. 1).

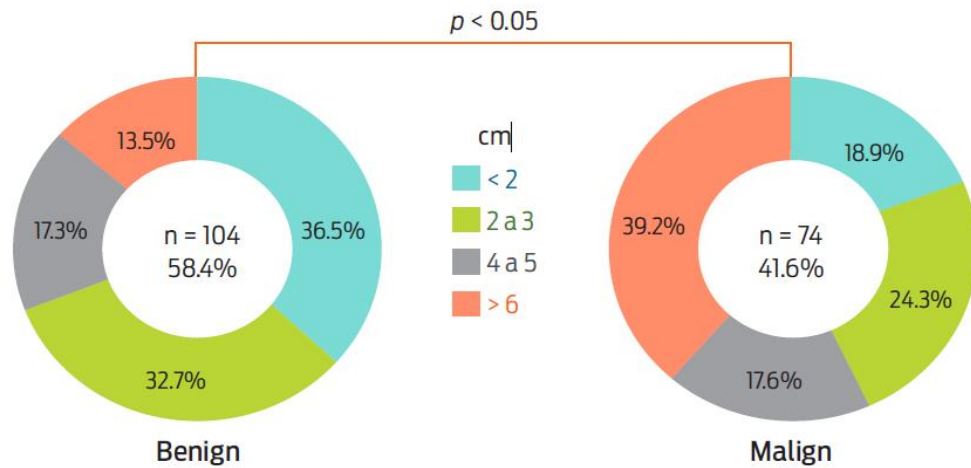


Figure 1. Frequency of canine mammary tumors according to their size (cm).

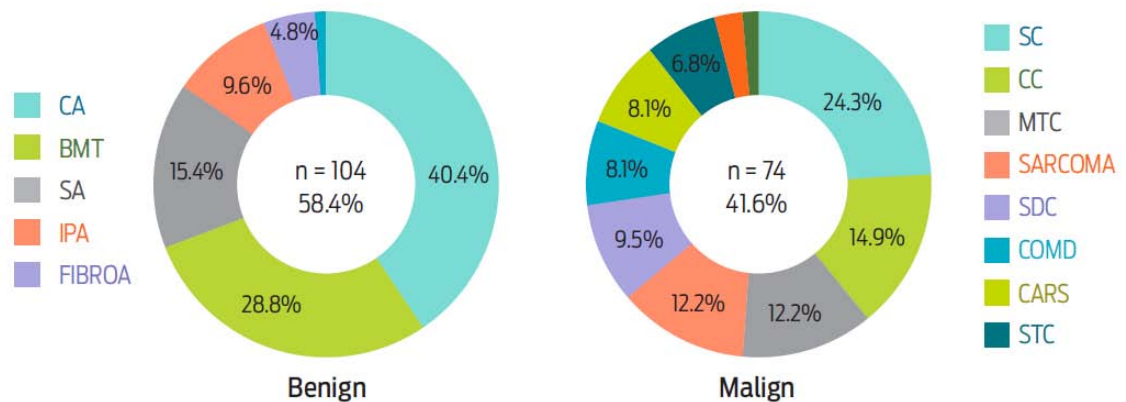


Figure 2. Frequency of canine mammary tumors according to their morphological classification.

CA: complex adenoma; BMT: benign mixed tumors; SA: simple adenoma; IPA: intraductal papillary adenoma; FIBROA: fibroadenoma; SC: simple carcinoma; CC: complex carcinoma; MTC: mixed type carcinomas; SARCOMA: sarcoma; SDC: solid carcinoma; COMD: comedocarcinoma; CARS: carcinosarcoma; STC: special type carcinomas.

CMT morphological classification. The histological analysis of the mammary tumors per dog showed a higher frequency of benign than malignant tumors; however, most of the dogs had multiple tumors, some of which were benign and some were malignant. We noted that more patients had at least one malignant mammary tumor (48/80; 60%), whereas those with only benign tumors

were fewer (32/80; 40%).

Figure 2 shows the frequency of the different histological tumor types that were found. The most frequent benign mammary tumor was the complex adenoma (CA) (42/104, 40.4%), which was followed by benign mixed tumors (BMT) (30/104, 28.8%). On the malignant side, the most frequent tumors

Table 1. Relative risk (RR) of mammary canine tumors according to age, size, breed and parity.

Variable	Total number	Number of CMT	Number of non-CMT	Number of MCMT	Number of BCMT	CMT RR	MCMT RR	
Age	<7 years	49	17	31	9	8	0.5	1.1
	8-12 years	91	50	41	25	25	1.2	1.0
	>13 years	20	13	8	12	1	1.9	12.0
Breed size	Small	105	50	55	28	22	0.9	1.3
	Medium	31	15	16	9	6	0.9	1.5
	Large	24	15	9	8	7	1.7	1.1
Breed	Mixed breed	23	9	14	7	2	0.6	3.5
	Pure	137	71	66	45	35	1.1	1.3
	Cocker	17	11	5	6	5	2.2	1.2
	Poodle	36	21	15	12	9	1.4	1.3
	Dachshund	14	8	6	5	3	1.3	1.7
	Schnauzer	15	4	11	2	2	0.4	1.0
	Labrador	8	6	2	4	2	3.0	2.0
	Rottweiler	3	3	0	1	2	-	0.5
Parity	German Shepherd	3	2	1	2	0	2.0	-
	No	110	57	53	31	26	1.1	1.2
Yes	50	23	27	14	9	0.9	1.6	

CMT: canine mammary tumor; MCMT: malignant canine mammary tumor; BCMT: benign canine mammary tumor.

were simple carcinomas (SC) (18/74, 24.3%), complex carcinomas (CC) (11/74, 14.9%) and mixed-type carcinomas (MTC) (9/74, 12.6%). Moreover, the analysis of the CMT frequency based on the tissue of origin produced a similar occurrence of mixed and epithelial tumors. According to the biological behavior of the CMT, the mixed-type neoplasm was the most frequent (67%) of benign tumors; malignant tumors tended to be mainly epithelial (51%), showing a highly significant difference between groups (χ^2 $P < 0.05$).

Risk factors associated with CMT

- Age: a wide range of ages was observed in patients with CMT (3-16 years); the highest frequencies were for 8 (20%), 12 (16.3%), 11 (13.7%), and 9 years old (10%). In general, the most affected patients were dogs > 7 years old (67.5%), and they showed both benign (50%) and malignant CMTs

(50%). In dogs > 13 years old, the ratio aligned towards malignant CMTs (92.3%), with a moderate risk of developing CMT and a higher risk that these tumors were malignant ($\chi^2 P < 0.05$) (Table 1).

- Breed: As Table 1 shows, a wide variety of breeds affected with CMT was observed. Although purebred dogs had a higher frequency than mixed breeds, a significant relative risk predisposing them to the disease was not evident. However, mixed-breed dogs showed a higher risk of malignant tumors. In relation to the size of purebred dogs, the most affected were the small- and medium- size dogs, which did not show a risk or it was a non-effective risk disease. Among purebreds, the Poodle was one of the most frequently affected breeds, although its risk of disease was relatively low; the Cocker Spaniel had a moderate risk; the Dachshund showed a moderate risk for malignant tumors, although it had a lower CMT risk; the Labrador Retriever had the least frequency of occurrence, but it showed a higher risk of mammary tumors and a moderate risk of malignant mammary tumors; the Rottweiler and the German Shepherd showed a moderate risk of developing CMT (Table 1).

Gynecological data

Almost none of the patients were neutered within the first year and a half (78/80, 97.5%), and most of them were ovary-hysterectomized at the time of mastectomy. It was also observed that most dogs with mammary tumors were nulliparous; however, this condition had a negligible risk for CMT (Table 1).

Body condition score

At the time of surgery, 53.8% (43/80) of the dogs studied showed a body condition score (BCS) of 3; 28.8% (23/80) had a BCS of 4; 10% (8/80) had a BCS of 5; and 7.5% (6/80) had a BCS of 2. None of the dogs had a BCS of 1. By relating the body condition of patients to the biological behavior of mammary neoplasms, 51.2% (22/43) and 48.8% (21/43) of the dogs with a BCS of 3 had benign and malignant tumors, respectively, whereas 73.9% (17/23) of the dogs with a BCS of 4 tended to have malignant tumors, although the difference was not statistically significant ($\chi^2 P > 0.05$).

Recurrence and survival

Eighteen months after surgery, 15/80 (18.8%) patients had new tumoral masses. Of these patients, 7/15 (46.7%) had benign tumors, and 8/15 (53.3%) had at least one malignant tumor ($P > 0.05$). The recurrence of benign and malignant tumors was proportionally similar. Twenty-four out of 48 patients (50%) with at least one malignant mammary tumor, died; vascular infiltration was observed in 18/24 (75%) of these patients, and 14/18 (77.8%) died within the study period ($P < 0.05$).

Patients with malignant mammary tumors had a significantly shorter survival time than those with benign tumors (Fig. 3). Of the patients with malignant mammary tumors, 19/74 (25.7%) died during the post-surgical follow-up; of these, 89.5% (17/19) exhibited an early death or died within a year. On the other hand, patients with tumors < 2 cm had higher survival proportions than those with tumors > 6 cm. Tumor size could thus be considered an important prognostic factor ($P = 0.009$) (Fig. 4), as the following data shows: patients with CARS, COMD, and CSD tumors had a survival time of less than 6 months (2, 5.5, and 6 months of median survival, respectively), whereas patients with SC, CC, and MTC tumors had a median survival time of 11 months (Fig. 5).

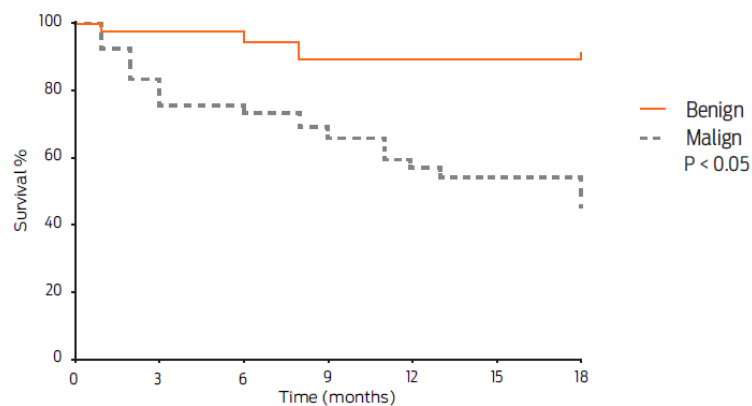


Figure 3. Survival analysis of patients with benign and malignant canine mammary tumors.

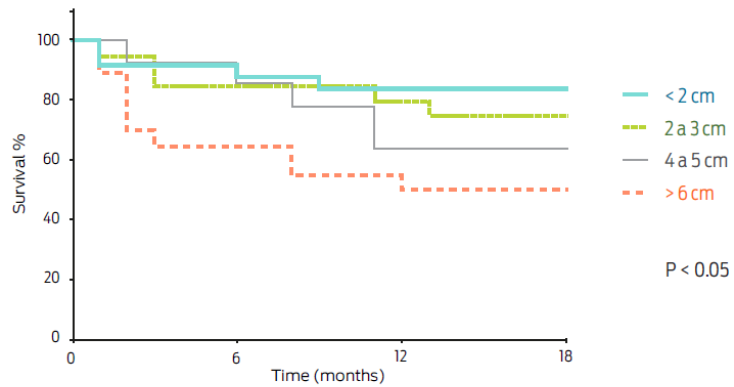


Figure 4. Survival analysis related to tumor size.

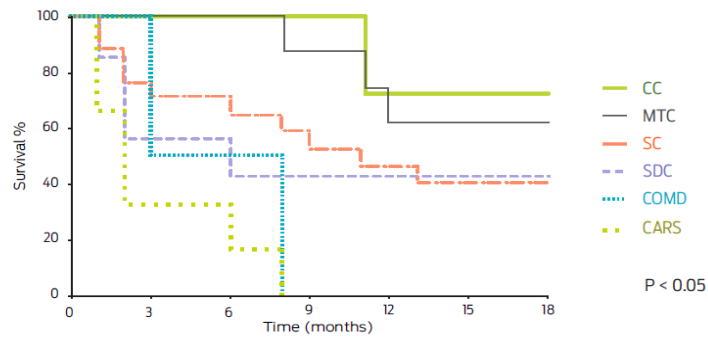


Figure 5. Survival analysis related to the morphological type of canine mammary tumors. SC: simple carcinoma; CC: complex carcinoma; MTC: mixed type carcinomas; SC: simple carcinoma; SDC: solid carcinoma; COMD: comedocarcinoma, CARS: carcinosarcoma.

Discussion

Similar to our findings, other researchers observed that tumor size is an important prognostic factor: small mammary masses tend to be benign, and larger tumors tend to be malignant. In our study, patients with tumors < 2 cm showed a higher survival period than those with tumors > 6 cm. Ferreirai *et al.* (2009) found that 80% of benign tumors were < 5 cm, whereas 87.1% of malignant tumors were > 5 cm, which emphasizes the importance of evaluating tumor size; this variable is inexpensive and simple to assess routinely. Similarly, Ressel *et al.* (2013) found that mammary carcinomas showed a larger diameter (8 cm) than adenomas (3 cm); a lower survival time was found in dogs with tumors > 5 cm.

Oliveira *et al.* (2003) reported that mammary tumors represent approximately 50% of neoplastic diseases in female dogs, and 41 to 53% of these are malignant (Fonseca and Daleck, 2000). In our study, 58.4% were benign tumors, and 41.6% were malignant tumors, which is similar to the observations of Salas *et al.* (2015), who performed an 11-year retrospective study (2002-2012) in Mexico City. In this study, 47.8% of the total of mammary tumors were benign, 47.5% were malignant and 4.7% were non-neoplastic mammary lesions (hyperplasia, dysplasia or mastitis).

Regarding histological variants, similar to this study, other researchers found that the most common benign variants include mixed tumors and complex adenomas. The most common malignant variants were carcinomas that originated with a previous benign tumor, simple carcinoma and complex carcinoma (Im *et al.*, 2014). In addition, Ressel *et al.* (2013) observed that complex adenomas were among the most common benign lesions, and simple carcinoma was the most common malignant variant.

Regarding the risk factors associated with mammary neoplasia, our results showed similarities with other epidemiological studies that had reported a wide age range in CMT patients. In our study, the range was from 3 to 15 years, with an average age of 8 to 12 years. Similarly, Kuldip *et al.* (2012) reported an age range from 2 to 16 years for mammary tumor development in dogs, with an average age of 9 years. The higher incidence was in dogs between 10 to 12 years old (31.37%). In addition, Zatloukal *et al.* (2005) found that dogs over 13 years of age showed the highest risk for the development of malignant tumors. The breed predisposition reported for CMT is very diverse. In this study, the most commonly affected animals pertained to a small-size breed; however, the occurrence of mammary tumors has recently been increasing in large-breed dogs according to some authors, probably as a result of breed popularity in different geographic areas (Bronden *et al.*, 2010). Rivera *et al.* (2009) reported that in Sweden, English Springer Spaniels showed a 36% predisposition for mammary cancer. Egenvall *et al.* (2005) reported a high incidence for mammary tumor development in Spaniels, Dobermans, German Shepherds and Boxers (Egenvall *et al.*, 2005).

It is well known that dog breed popularity varies according to each country, which may influence breed predisposition analyses (Salas *et al.*, 2015); however, we identified a moderate relative CMT risk in Cocker Spaniels. In addition, Dachshunds and mixed-breed dogs showed an increased risk of developing malignant mammary tumors. These breeds were also identified to be predisposed for CMT in a retrospective study performed in Mexico City

using data from canine patients from the last decade (Salas *et al.*, 2015). In a retrospective study conducted in the Czech Republic from 1977 to 2001, Zatloukal *et al.* (2005) reported that Poodles, Schnauzers, Cocker Spaniels, and Dachshunds were predisposed to developing mammary neoplasia. On the other hand, these authors did not find any CMT risk in large-breed dogs. This finding was contrary to our study in which we found a risk of disease even though those breeds are less popular. Furthermore, small-size breeds, particularly Poodles, did not show a significant risk despite being the most frequently affected breed. This demonstrates that a high CMT frequency in a popular breed does not necessarily indicate high breed susceptibility.

Several authors have reported an association between obesity, particularly in early life stages, and the development of mammary cancer in bitches (Sonnen-schein *et al.*, 1991; Perez *et al.*, 1998). We found that most fat dogs had malignant neoplasms; however, there was not a significant difference in cancer development between dogs with a healthy body condition and fat animals.

It appears that exposure to endogenous ovarian hormones early in life is the most important cause of mammary tumor development in dogs, and the protective benefit from ovarian hormonal ablation seems to be dose-dependent. This means that the protective effect of ovariohysterectomy is strongest in patients with no exposure to minimal hormonal exposure and diminishes quickly after the first few years of life. Estrogen can be activated by epoxidation, thus gaining the ability to damage DNA and initiate mammary carcinogenesis (Yu, 2002). None of the patients analyzed in our study were neutered before their first estrous, which allowed their mammary tissue to be under a significant hormonal influence.

In this study, most CMT patients were nulliparous; however, contrary to the belief that has been held in veterinary medicine and has been tested in women, this variable was not a predisposing risk factor for the disease, which overthrows the myth that dogs must gestate to decrease the incidence of mammary tumor. It is well known that women who give birth and breastfeed for 3 months or more have a reduced risk of developing breast cancer; therefore, breastfeeding and term pregnancy have a protective effect against breast cancer (Rojas, 2008).

In this study, we observed that vascular invasion and the presence of neoplastic emboli in the lumen of lymphatic and blood vessels were poor prognostic factors. Chang *et al.* (1995) found a correlation between the presence of neoplastic emboli and a survival time between 18 to 24 months in dogs with CMT. Furthermore, Diessler *et al.* (2009) observed that vascular

invasion can be used as an important CMT prognostic value.

The histological type is an important independent prognostic factor for CMT. Benjamin *et al.* (1999) reported fatal outcomes in Beagles associated with ductular carcinomas (62.5%) and adenocarcinomas of other origins (27.4%; solid, tubular, or papillary carcinomas; simple or complex). They also evaluated that in complex carcinomas, the rate of recurrence was 3.8%, and the rate of metastasis was 43.4%; for simple carcinomas, the numbers were 4% and 52%, respectively; and for ductular carcinomas, the numbers were 4.3% and 59.6%, respectively. The rate of metastasis for carcinosarcomas was 100%. In our study, the worst prognosis was observed in solid carcinomas, comedocarcinomas, and carcinosarcomas in decreasing survival time order. On the other hand, the least aggressive types were simple carcinomas, mixed carcinomas, and complex carcinomas; the latter histologic type showed the longest survival time. This observation coincides with a previous report that showed that complex carcinomas exhibited a low rate of local invasion and lymphatic permeation (Misdorp and Hart, 1976).

Conclusions

In the present study, the majority of patients had multiple mammary masses, and most tumors (58.4%) were benign. Most patients with multiple neoplastic masses had at least one malignant tumor. Canine mammary tumors often affected dogs older than 8 years of age, and geriatric dogs tended to present malignant tumors. Commonly affected breeds included Poodles, Cocker Spaniels and Dachshunds, but only Cocker Spaniels presented a significant risk for mammary tumor development, which demonstrates that the most commonly affected breeds are not necessarily the most susceptible. In this study, the increased risk of disease in nulliparous dogs was not corroborated. Mortality was the highest and the survival periods were the shortest in patients bearing malignant tumors larger than 6 cm. The shortest survival periods were also noted in animals with solid carcinomas, comedocarcinomas, and carcinosarcomas, in decreasing order.

Funding

Department of Pathology, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

Acknowledgements

We thank the staff of the Department of Pathology, the Veterinary Specialty Hospital and the Secretary for Research, Innovation and Technological Development of Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

Conflicts of interest

Laura Romero is head of the Department of Pathology, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. The rest of the authors declare that they do not have any conflict of interest.

Author contributions

Yaritza Salas and Laura Romero: Designed and conducted the research, contributed new analytical techniques, analyzed the data, and wrote the manuscript.

Enrique Aburto and Rogelio A. Alonso: Designed the research, analyzed the data, and wrote the manuscript.

Adelys Márquez: Contributed analytical techniques, analyzed the data, and wrote the manuscript.

Hortensia Corona: Contributed new reagents, helped with sample collection, and analyzed the data

References

- 1) Benjamin A, Lee AC, Saunders WJ. 1999. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in Beagles. *Veterinary Pathology*, 36:426-436.
- 2) Bronden LB, Nielsen SS, Toft N, Kristensen AT. 2010. Data from the Danish veterinary cancer registry on the occurrence and distribution of neoplasms in dogs in Denmark. *Veterinary Record*, 166:586-590.
- 3) Casal J, Mateu E. 2003. Tipos de muestreo. *Revista de Epidemiología de Medicina Preventiva*, 1:3-7.
- 4) Cassali G, Gobbi H, Malm C, Schmitt F. 2006. Evaluation of accuracy of fine needle aspiration biopsy for diagnosis of canine mammary tumors: Comparative features with the human tumors. *Cytopathology*, 17:1-7.
- 5) Chang S, Chang C, Chang T, Wong M. 2005. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (8-2002). *Journal of American Veterinary Medical Association*, 227(10):1625-1629.
- 6) Coffey DS, Walsh PC. 1990. Clinical experimental studies of benign prostatic

hyperplasia. *Urologic Clinics of North American*, 17:461-475.

- 7) Costa PS, Santos NC, Cunha P, Cotter J, Sousa N. 2013. The use of multiple correspondence analysis to explore associations between categories of qualitative variables in healthy ageing. *Journal of Aging Research*, Article ID 302163. DOI: 10.1155/2013/302163.
- 8) Diessler ME, Castelland MC, Portianskyl EL, Burns SL, Idiar JR. 2009. Invasión vascular, expresión del receptor 2 del factor de crecimiento de endotelios vasculares (VEGFR-2) y densidad de microvasos en carcinomas mamarios de perras. Valor pronóstico. *Ciencias Morfológicas*, 11(1):15-24.
- 9) Egenvall A, Bonnett BN, Ohagen P, Olson P, Hedhammar A, von Euler H. 2005. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Preventive Veterinary Medicine*, 69:109-127.
- 10) Ferreira E, Bertagnolli AC, Cavalcanti MF, Schmitt FC, Cassali GD. 2009. The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Veterinary Comparative Oncology*, 7:230-235.
- 11) Fonseca CS, Daleck CR. 2000. Neoplasias mamárias em cadelas: influencia hormonal e efeitos da ovariectomia como terapia adjuvante. *Ciência Rural*, 30:731-735.
- 12) Gama A, Alves A, Schmitt F. 2008. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: Application of the human classification. *Virchows Archives*, 453(2):123-132.
- 13) Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R, Zappulli V. 2011. Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 48:117-131.
- 14) Im KS, Kim NH, Lim HY, Kim HW, Shin JI, Sur JH. 2014. Analysis of a new histological and molecular-based classification of canine mammary neoplasia. *Veterinary Pathology*, 51(3):549-559.
- 15) Kuldip G, Naresh K, Sanjeev K, Jitender M, Shashikant M, Raghunath M, et al. 2012. Epidemiological studies on canine mammary tumour and its relevance for breast cancer studies. *IOSR Journal of Pharmacy*, 2(Issue 2):322-333.
- 16) Misdrop W, Hart AAM. 1976. Prognostic factors in canine mammary cancer. *Journal of The National Cancer Institute*, 56(4):779-785. doi:10.1093/jnci/56.4.779
- 17) Oliveira LO, Oliveira RT, Loretta A, Rodrigues R, Driemeier D. 2003. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. *Acta Scientiae Veterinariae*, 31:105-110.
- 18) Perez Alenza D, Rutteman GR, Pena L. 1998. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 12:132-139.
- 19) Ressel L, Puleio R, Ruggero Loria G, Vannozzi I, Millanta F, Caracappa S, et al. 2013. HER-2 expression in canine morphologically normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissues and its correlation with the clinical outcome. *Research in Veterinary Science*, 94:299-305.
- 20) Rivera P, Melin M, Biagi T, Fall T, Häggström J, Lindblad-Toh K, von Euler H. 2009. Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. *Cancer Research*, 69:8770-8774.
- 21) Rojas C. 2008. Lactancia materna y cáncer de mama: Un estudio caso-control en pacientes del Hospital Nacional Arzobispo Loayza, Lima-Perú. *Anales Facultad de Medicina*, 69(1):22-28.
- 22) Salas Y, Márquez A, Diaz D, Romero L. 2015. Epidemiological study of mammary tumors in female dogs diagnosed during the period 2002-2012: A growing animal health problem. *PLOS ONE*, 10(5):e0127381. DOI: 10.1371/journal.pone.0127381.
- 23) Schneider R, Dorn CR, Taylor DO. 1969 Factors influencing canine mammary

- cancer development and postsurgical survival. *Journal National Cancer Institute*, 43:1249-1261.
- 24) Sonnenschein EG, Glickman LT, Goldschmidt MH, McKee LJ. 1991. Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: A case-control study. *American Journal Epidemiology*, 133:694-703.
- 25) Sorenmo K. Canine mammary gland tumors. 2003. *Veterinary Clinical Small Animal*, 33:573-596.
- 26) Sorenmo KU, Shofer FS, Goldschmidt MH. 2000. Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14:266-270.
- 27) Thomas A. Hematoxilina y eosina. Métodos histotecnológicos. 1995. Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP) y el Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP), 55-58.
- 28) Wey N, Gutberlet K, Khon B. 2000. Mammatumore bei der huding: Hormolle abhängigkeit unter besonderer berucksichtigung von 17 β ostradiol und progesterone *Kleintierpraxis*, 45:19-31.
- 29) Yu FL. 2002. 17Beta-estradiol epoxidation as the molecular basis for breast cancer initiation and prevention. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 11(Suppl 7):S460-S466.
- 30) Zatloukal J, Lorenzová F, Tich A, Neâas H, Kecová P, Kohout. 2005. Breed and age as risk factors for canine mammary tumours. *Acta Veterinaria Brunensis*, 74:103-109.

Capítulo III

El Uso de Biomarcadores y el Sub-Tipo Molecular como un Indicador Pronóstico en Pacientes con Tumor Mamario Canino en México

En el presente capítulo se desarrollan los objetivos específicos N° 4 y parte del N° 6, Clasificar las neoplasias mamarias caninas mediante la identificación de biomarcadores moleculares (RE, erbB2, Ki67, CD31) y el sub-tipo molecular, a través de inmunohistoquímica. Y Relacionar la expresión de los biomarcadores y el sub-tipo molecular con las características clínico-patológicas en el tumor mamario canino.

RESUMEN

La clasificación del tumor mamario canino (TMC) basada en la expresión de biomarcadores pretende definir subgrupos en los diferentes tipos histológicos, con el fin de estudiar su comportamiento biológico, establecer criterios pronósticos y elegir la terapéutica apropiada. Nuestro objetivo consistió en evaluar la expresión de biomarcadores moleculares en TMC a través de inmunohistoquímica (IHQ) y con base en esto establecer una clasificación molecular y relacionarlos con las características clínico-patológicas. Se estudiaron 135 tumores, se evaluó receptor de estrógeno alfa (RE α), erbB2, ki-67 y CD31. Se observó que la mayoría de los TMC resultaron benignos, RE α positivo, de bajo índice de proliferación celular y con mayor tiempo de sobrevida; los tumores malignos fueron generalmente RE α negativos, con índices de proliferación celular alto y sobrevida menor. El erbB2 se sobre-expresó en tumores de tamaño pequeño y tuvo una baja expresión en los tumores de mayor tamaño. Los subtipos moleculares más frecuentes fueron el Luminal erbB2 y el erbB2. El carcinosarcoma, carcinoma sólido, resultaron subclasificados como tipo Basal y Luminal B; el comedocarcinoma, exclusivamente en el tipo erbB2; y el carcinoma complejo y el carcinoma simple fueron Luminal B-erbB2 y no calificables. Se concluye que el TMC es una enfermedad heterogénea y cada paciente requiere de la clasificación molecular. En el TMC observamos que el Ki67 y RE α son marcadores pronósticos por excelencia, el ki67 es de gran utilidad en la clasificación del subtipo molecular, permite discriminar entre los subtipos luminal A y B, y junto con el RE α permite considerar al sub-tipo Luminal erbB2, el cual, además de ser uno de los más frecuentes, las expectativas de vida son mejores que el sub-tipo erbB2.

Keywords: carcinoma mamario, biomarcadores, sub-tipo molecular, sobrevida, perras

INTRODUCCIÓN

Los biomarcadores, también conocidos como marcadores moleculares, son caracteres o genes que debido a su ligamiento con otras moléculas pueden ser detectados con el fin de indicar expresión de otros genes y permitir un efecto cuantificable (Solis y Andrade, 2005).

Vinothini *et al.* (2009) observaron que cambios en la expresión de moléculas implicadas en la carcinogénesis, como es el aumento de expresión de receptores de estrógeno (RE α), proteínas implicadas en la proliferación celular, evasión de la apoptosis, invasión y angiogénesis, pueden conferir una ventaja de crecimiento selectivo al tumor mamario canino.

En Medicina Veterinaria la clasificación del TMC basada en la expresión de biomarcadores implicados en la carcinogénesis puede llevar a definir sub-grupos tumorales en los diferentes tipos histológicos con comportamientos biológicos determinados, así como, establecer criterios pronósticos, elegir terapias más apropiadas y apoyan el estudio de la evolución natural del cáncer de mama en perras (Cassali *et al.*, 2006).

Por lo tanto, la identificación de sub-tipos moleculares tumorales puede ayudar a mejorar las perspectivas terapéuticas proponiendo tratamientos individualizados, basado en la expresión de proteínas implicadas en la evolución de la enfermedad. Por otra parte, el desarrollo y aplicación de técnicas diagnósticas apoyadas en el uso de marcadores moleculares en el TMC es el punto de partida para el estudio comparativo con el cáncer de mama en mujeres (Cassali *et al.*, 2006; Vinothini *et al.*, 2009).

Adicionalmente, a pesar del uso rutinario en países desarrollados de los biomarcadores en el TMC, no es así en países Latinoamericanos como México, probablemente debido a factores socio-económicos y la falta de estudios científicos en la población canina de cada región, que certifiquen y promuevan las ventajas que los biomarcadores y lo que el uso de la clasificación molecular representa en el diagnóstico y pronóstico para pacientes con TMC.

Con base a lo antes expuesto, en este capítulo se plantearon los siguientes objetivos:

- Clasificar las neoplasias mamarias mediante la identificación de biomarcadores (ER, c-erbB2, Ki67, CD31) y el sub-tipo molecular, a través de inmunohistoquímica.
- Relacionar la expresión de los biomarcadores (ER, c-erbB2, Ki67, CD31) y el sub-tipo molecular con las características clínico-patológicas en el tumor mamario canino.

METODOLOGÍA

Población y Muestra

La población de estudio incluyó perras con TMC que acudieron a consulta al Hospital Veterinario de Especialidades de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Las pacientes fueron seleccionadas a través del método no probabilístico de selección intencionada (Casal y Mateu, 2003).

La muestra está representada por 80 perras no castradas que fueron sometidas a nodulectomía o mastectomía por neoplasia mamaria y cuya pieza quirúrgica fue remitida al Departamento de Patología para estudio histopatológico del tumor (anexo 1 y 2). Como control se incluyeron 17 perras adultas, no castradas, con tejido glandular mamario normal, remitidas para necropsia.

Parámetros clínicos patológicos

Se clasificaron siguiendo varios parámetros:

i. Número y tamaño de los tumores mamarios: se analizaron 135 tumores diferentes provenientes de 80 pacientes; de estos 21/135 fueron tumores solitarios y 114/135 tumores múltiples; 63 tumores median menos de 2 cm de eje mayor, 29 median 2 a 3 cm, 14 median 4 a 5 cm y 29 eran mayores de 6 cm.

ii. Diagnóstico morfológico: Los 135 tumores fueron procesados para histopatología y teñidos con H&E. Se utilizó la clasificación histológica propuesta por Goldschmidt *et al.* (2011) para definir a 75 tumores como benignos y 60 malignos. De los 75 tumores benignos, 35/75 fueron adenomas complejos (AC), 19/75 tumores mixtos benignos (TMB), 10/75 adenoma simple (AS), 8/75 adenoma papilar intraductal (API), 3/75 fibroadenoma (FA). Los tumores malignos fueron: 14/60 carcinoma simple (CS) (carcinomas tubular, tubulopapilar, quisticopapilar y cribiforme), 8/60 carcinomas complejo (CC), 8/60 sarcomas (SAR), 7/60 carcinomas tipo mixto (CTM), 6/60 carcinoma solido (CSD), 5/60 carcinosarcoma (CARS), 4/60 comedocarcinoma (COMD), 4/60 carcinomas

especiales (CTE) (carcinoma inflamatorio, rico en lípidos y el adenoescamoso), 2/60 carcinoma tubulopapilar en adenoma simple, 1/60 carcinoma en tumor mixto benigno y 1/60 carcinoma micropapilar (anexos 3 a 18).

iii. Densidad microvascular (DMV): se determinó como la media del número de vasos sanguíneos presentes en 10 campos de 40x, de cada una de los tumores. La identificación de estructuras vasculares se realizó por IHQ con anticuerpo contra CD31 bajo el microscopio óptico (Leica DME^R).

iv. Sobrevida: se realizó seguimiento de las pacientes durante 18 meses post-cirugía, con el fin de monitorear su condición de salud e identificar mortalidad asociada al TMC. Esto gracias a que se mantuvo comunicación con los propietarios y a la valoración clínica de las pacientes. Se consideraron los pacientes que presentaban tumores malignos y la clasificación de los tumores según el resultado del análisis de inmunotinción y el sub-tipo molecular, junto con el tiempo de sobrevida.

Inmunohistoquímica (IHQ)

Se utilizaron los anticuerpos monoclonales de ratón marca Dako que detectan: RE α (clon 1D5), CD31 (clon JC70A), Ki67 (clon Ki-67) y el anticuerpo policlonal de conejo contra erbB2 (A0485). Se realizaron inmunoarreglos de tejidos (TMAs) (Simon *et al.*, 2005), a partir de los cuales se realizaron cortes de 4 micras en laminillas electro-cargadas para IHQ.

Se estandarizó la técnica de IHQ bajo el método indirecto con el uso de polímero y marcaje de dos pasos. La recuperación antigénica se realizó con Target Retrieval Solution Low pH, marca Dako, diluida a 1:50 en agua destilada, en olla de presión en horno de microondas a máxima temperatura por 10 min; se incluyeron las laminillas en *Peroxidasa blocking reagent* (Dako DM821) por 5 min en cámara húmeda a temperatura ambiente (TA) y posteriormente se incubó con el anticuerpo primario en cámara húmeda a temperatura ambiente por 30 min (RE α 1:80, ki67 1:200, c-erbB2 1:80, CD31 1:100); se bloqueó con polímero Envision Flex/HRP (Dako DM 822) y se incubó en cámara húmeda por 20 min a

temperatura ambiente. Finalmente se reveló con diaminobencidina y contrastó con hematoxilina. Se utilizó como control positivo para RE α , erbB2 y Ki67, tejido mamario de perras con positividad conocida para estos marcadores; para CD31 se usó una sección de hemangiosarcoma canino. Los controles negativos se obtuvieron mediante la sustitución del anticuerpo por solución búfer amortiguador de fosfatos (PBS).

Para el análisis del inmunomarcaje se realizó el cálculo de los percentiles con el objetivo de considerar el punto de corte en la población de referencia e interpretar los resultados utilizando parámetros propios del TMC, reduciendo así el error que pueda existir al utilizar los valores referidos en algunas publicaciones los cuales tienden a variar entre investigadores, tal es el caso para el RE y Ki67 (Goldhirsch *et al.*, 2013; Millanta *et al.*, 2002; Guarneri *et al.*, 2009; Im *et al.*, 2014; Chao-Chin Chang *et al.*, 2015; Ramírez *et al.*, 2011; Sassi *et al.*, 2010). Goldhirsch *et al.* (2013) afirman que el punto de corte entre valores altos y bajos para ki67 varía entre los laboratorios y Panal *et al.* (2014) reconocen que existen dificultades para la unificación de la medición de biomarcadores.

El análisis de la inmunotinción se llevó a cabo en tres pasos:

- i.* Las imágenes se capturaron en un microscopio óptico (BX51WL Olimpos/DCU), en cada tejido se seleccionaron al azar 10 campos en 40x.
- ii.* Las imágenes se procesaron con el software ImagineJ IJ 1.46r, estandarizando los parámetros del análisis para contar con mayor objetividad en los resultados (Ferreira y Rasband, 2012). En el caso del RE α se consideró el promedio del porcentaje total del área del tejido neoplásico que mostraba núcleos positivos. Una estimación similar se aplicó en los casos de erbB2; se obtuvo la media del porcentaje total de área que representaba el marcaje de las membranas celulares. A partir del marcador ki67 se obtuvo el índice de proliferación; se consideró la tinción como positiva

cuando ésta aparecía en el núcleo de las células independientemente de la intensidad. El índice de proliferación celular fue determinado como el porcentaje medio del total de las células presentes en 10 campos a 40x de cada uno de los tejidos estudiados, para ello se dividió la sumatoria promedio de las células positivas entre el total de células presentes y se multiplicó por 100.

- iii.* Se realizó el cálculo de los percentiles para establecer los valores de referencia, y poder así categorizar los niveles de expresión de los marcadores (Pinho *et al.*, 2007) (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Valor de Referencia de los Biomarcadores en el TMC Benigno y Maligno

Biomarcador	Bajo	Moderado	Alto
Ki67 (IC 95%)	0.9 -11.8(IC 5.3- 7.3)	11.9– 24(14.2-17.2)	24.1 - 89.4(IC32.2 - 42.1)
erbB2 (IC95%)	0 - 7.7 (IC 3.8 - 5.4)	7.8 - 13.7(IC 10.2 - 11.7)	13.8 - 32.6(IC15.7 - 18.6)
	Bajo/negative		Alto/positive
CD31(IC 95%)	< 9.5 (IC 6.3 - 7.3)		≥ 9.5 (IC 13.0 - 15.3)
REα (IC 95%)	< 0.4 (IC 0.04 - 0.09)		≥ 0.4 (IC 0.7 - 1.04)

Clasificación molecular

Para la clasificación molecular de los TMC, se adaptó la utilizada en el cáncer de mama en mujeres con base en la expresión del REα, el índice Ki67 y el erbB2 (McCaffrey *et al.*, 2009 y Cheang *et al.*, 2009) (Tabla 3.2). Dicha clasificación divide a los tumores en dos grandes grupos basado en la positividad

o negatividad del RE α , los tumores RE α positivos se clasifican como Luminal y los RE α negativos como Basal y erbB2.

El tipo Luminal se sub-divide en tres grupos: *i.* Luminal A aquéllos con bajo índice de proliferación celular Ki67. *ii.* *Luminal B* cuyo índice Ki67 es moderado a alto y *iii.* Luminal erbB2 al grupo de tumores con índice Ki67 alto y ricos en erbB2.

Los RE α negativos se subdividen en dos grupos: *iv.* Basal, el cual sobre-expresa Ki67 y es negativo a erbB2 y *v.* erbB2 caracterizado por sobre-expresión de c-erbB2. Para esta clasificación solo se utilizaron tumores epiteliales.

Tabla 3.2. Subtipo Molecular del TMC y el Nivel de Expresión de los Biomarcadores

Subtipo molecular	Biomarcador		
	Re α	Ki67	erbB2
Luminal A	+	Low	Bajo
Luminal B	+	Moderado – Alto	Bajo
Luminal erbB2	+	Moderado – Alto	Moderado - Alto
erbB2	-	Moderado – Alto	Moderado - Alto
Basal	-	Moderado – Alto	Bajo

Análisis estadístico

Con el paquete estadístico SPSS se realizaron análisis univariado y frecuencias de las diferentes variables en estudio, así como análisis bivariado con la prueba Chi cuadrado X^2 (Tabla 3.3), riesgo relativo (RR) y el análisis de sobrevivencia Kaplan Meier con el estadístico de Log Rank (Mantel-Cox). Un valor de $P < 0.05$ fue considerado con significancia estadística. Adicionalmente se utilizó un análisis de correspondencia múltiple (ACM) (Costa *et al.*, 2013). Con la finalidad de obtener el patrón de asociación entre el tipo histológico y la clasificación

molecular de los diferentes tipos de TMC para cada comportamiento biológico. Este análisis multivariado se realizó con el paquete estadístico SAS 9.0 (SAS Institute, Cary, NY, USA). Las gráficas se construyeron con el paquete Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., USA).

Tabla 3.3. Resumen de la Significancia estadística entre las variables clínico-Patológicas y biomarcadores, medida mediante Chi cuadrado (χ^2)

Variables	CB	DMV	Tamaño (cm)	N° Tumores	erbB2	Ki67
RE	p = 0.01 *	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p = 0.01*
erbB2	p > 0.05	p > 0.05	p = 0.02 *	p > 0.05	-	p > 0.05
Ki67	p = 0.00 *	p > 0.05	p = 0.07 *	p > 0.05	p > 0.05	-

RESULTADOS

Densidad microvascular (DMV)

De los tumores benignos, el 55.4% (42/75) presentó DMV baja (Figura 3.1) y el 44.6% (33/75) alta (Figura 3.2); por su parte, en los tumores malignos se observó un 48.3% (29/60) con DMV baja y el 51.7% (31/60) alta. No se observaron diferencias significativas ($X^2 p > 0.05$) entre el tumor mamario benigno y maligno.

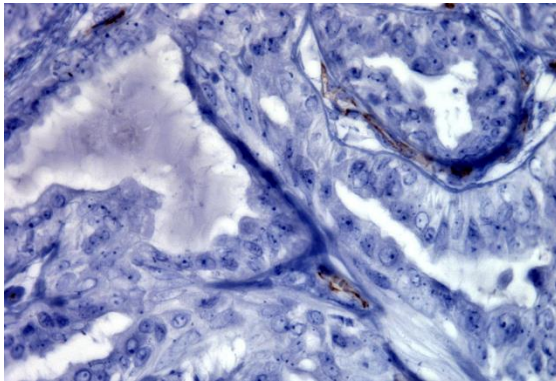


Fig. 3.1. Adenoma complejo; glándula mamaria de perra. DMV baja; anticuerpo CD31, IHQ, 40x.

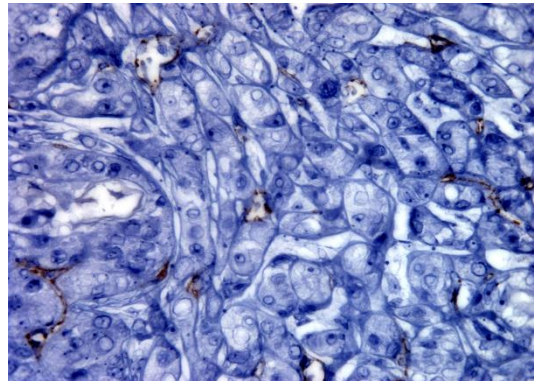


Fig. 3.2. Carcinoma tubular; glándula mamaria de perra. DMV alta; anticuerpo CD31, IHQ, 40x.

Expresión del RE α

Al evaluar la expresión del RE α se observó que del total de neoplasias benignas la mayoría resultaron positivas al RE α (53/75; 70.7%) (Figura 3.3) y solo el 29.3% (22/75) fueron negativas (Figura 3.4). Por otro lado, un 50% (30/60) de las neoplasias malignas expresaron RE α , esto sugiere que la expresión del RE α tiende a disminuir en las células de tumores malignos (RR=1.6).

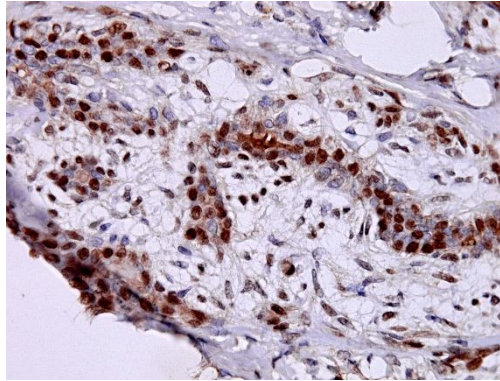


Fig. 3.3. Adenoma; glándula mamaria de perra. RE positivo, anticuerpo RE α , IHQ, 40x.

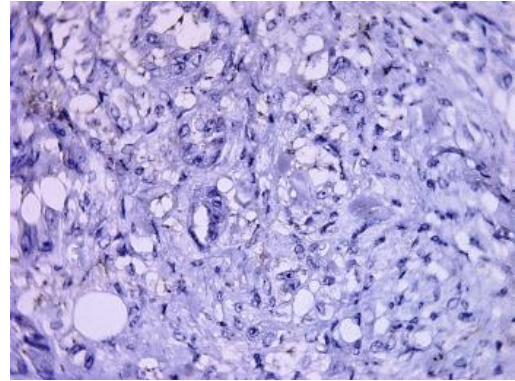


Fig. 3.4. Carcinoma; glándula mamaria de perra. RE negativo, anticuerpo RE α , IHQ, 40x.

Al contrastar de forma individual cada grupo se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre el TMC benigno y el TMC maligno ($X^2 p = 0.014$), dicha diferencia se basa principalmente en que la mayoría de los TMC de las perras presentaron positividad para el inmunomarcaje de RE α (83/135; 61.5%).

Adicionalmente, se observó que existe una relación inversa entre la expresión del RE α y el índice de proliferación celular Ki67, los tumores RE α negativos tienen un índice ki67 moderado a alto y en los RE α positivos es bajo ($X^2 P < 0.05$) (Figura 3.5).

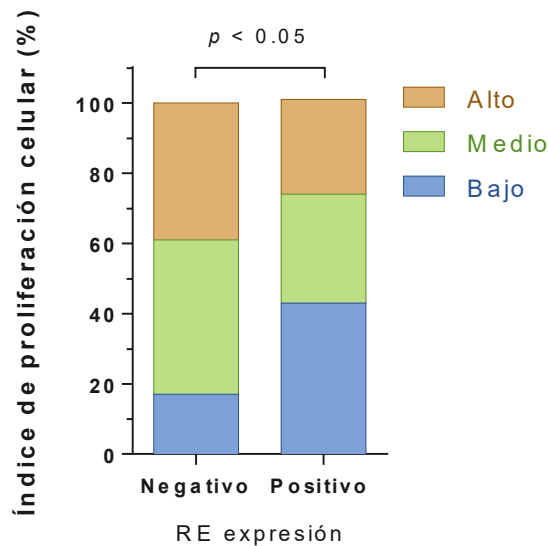


Fig. 3.5. Relación entre la expresión del RE α y el índice de proliferación celular Ki67.

Expresión del erbB2

El inmunomarcaje para erbB2 fue observado en mayor o menor intensidad en los diversos tipos histológicos de las neoplasias mamarias en perras (Figura 3.6 – 3.8).

Al analizar los valores de marcaje obtenidos por los diferentes tipos de neoplasias mamarias según su comportamiento biológico se pudo observar que no existe diferencia significativa entre el porcentaje de tumores benignos con expresión baja (20/75 ; 26.7%), moderada (27/75 ; 36%), o alta (28/78 ; 37.3%) y aquellos tumores malignos de expresión baja (23/60 ; 38.3%), moderada (18/60 ; 30%) y alta (19/60 ; 31.7%) ($X^2 p > 0.05$). Por otra parte, se relacionó la expresión de erbB2 con el tamaño de las masas tumorales, observándose diferencias altamente significativas ($X^2 p=0.02$) entre los grupos de tumores < 2 cm y los > 6 cm, ya que la expresión de erbB2 es inversamente proporcional al tamaño de la masa tumoral (Figura 3.9).

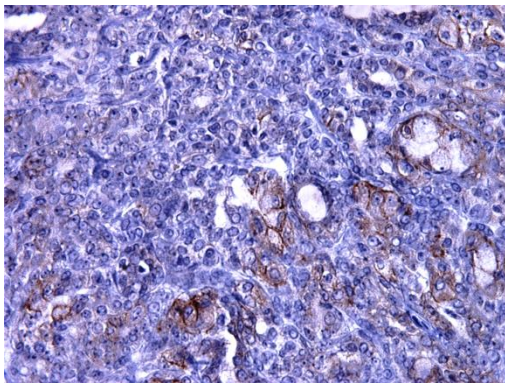


Fig. 3.6. Carcinoma. Glándula mamaria de perra. erbB2 bajo, anticuerpo erbB2, IHQ, 40x.

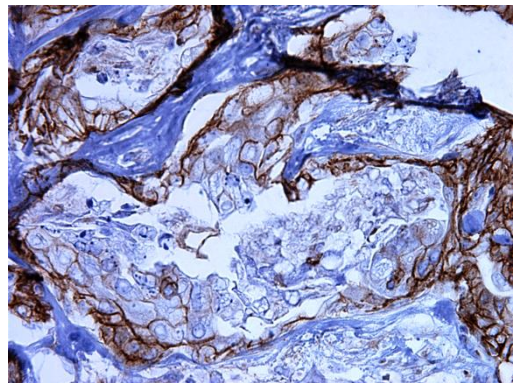


Fig. 3.7. Carcinoma. Glándula mamaria de perra. erbB2 moderado, anticuerpo erbB2, IHQ, 40x.

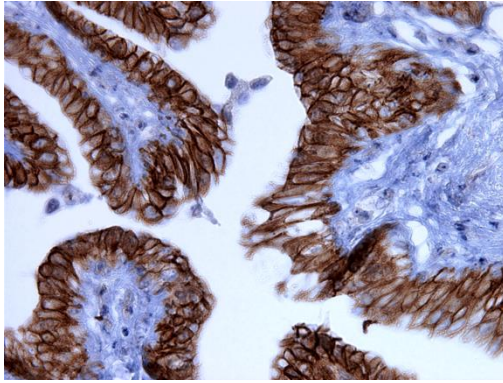


Fig. 3.8. Carcinoma. Glándula mamaria de perra. erbB2 alto, anticuerpo erbB2, IHQ, 40x.

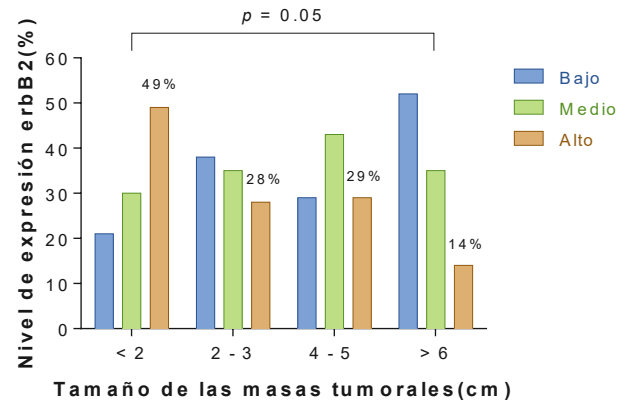


Fig. 3.9. Relación entre el tamaño de las masas tumorales y la expresión de erbB2.

Índice de proliferación celular (% ki67)

Se evidenció que el TMC benigno presenta bajo (38/75; 51.4% - Figura 3.10) a moderado (29/75; 39.2% - Figura 3.11) índice de proliferación celular; siendo moderado (19/75; 31.7%) a alto (35/75; 58.3% - Figura 3.12) en las neoplasias de comportamiento biológico maligno, con diferencia altamente significativa ($\chi^2 p < 0.05$; Figura 3.13a).

Al relacionar el índice ki67 con el tamaño en centímetros de las masas tumorales, se observa que existen diferencias estadísticamente significativas ($\chi^2 p = 0.012$) entre el índice ki67 y los diferentes tamaños de los tumores, dicha diferencia se basa principalmente en las neoplasias menores a 3 cm y mayores de 4 cm, donde el índice ki67 tiende a ser de bajo a moderado Vs moderado a alto, respectivamente (Figura 3.13b).

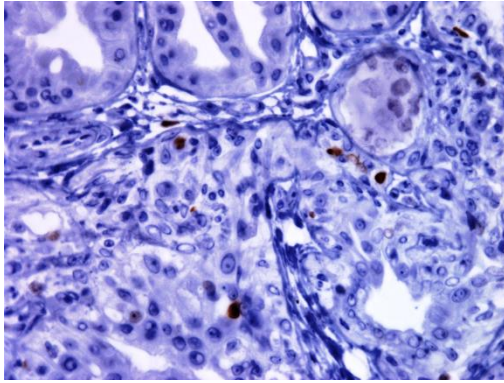


Fig. 3.10. Adenoma. Índice ki67 bajo, anticuerpo ki67, IHQ, 40x.

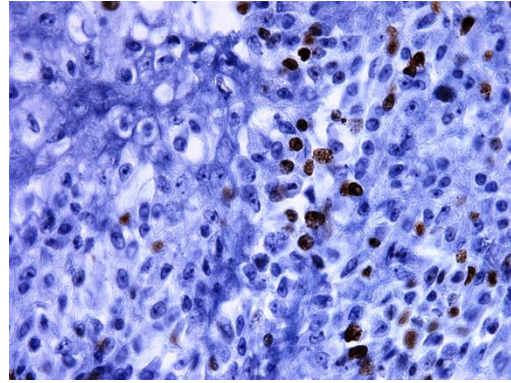


Fig. 3.11. Adenoma. Índice ki67 moderado, anticuerpo ki67, IHQ, 40x.

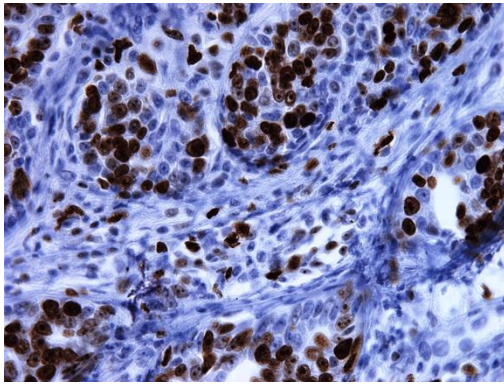


Fig. 3.12. Carcinoma. Índice ki67 alto, anticuerpo ki67, IHQ, 40x

$p < 0.05$

Fig. 3.13a. Relación entre el índice Ki67 y el comportamiento biológico del TMC.

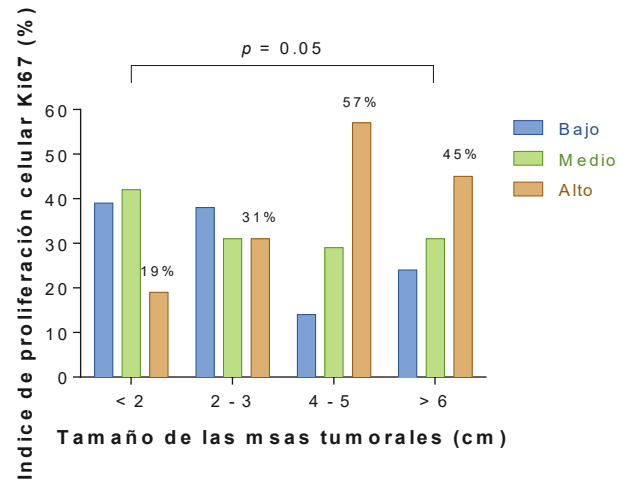


Fig. 3.13b. Relación entre el índice Ki67 y el tamaño de las masas tumorales.

Clasificación molecular del TMC

Esta clasificación mostró mayor utilidad en los TMC malignos, se observó mayor frecuencia de los tumores tipo Luminal erbB2 y los tipo erbB2 (17/60; 28.3% cada uno), seguidos por el Basal (12/60; 20%) y Luminal B (9/60; 15%) y por último los no calificables con el 6.7% (4/60) y Luminal A con el 1.7% (81/60). Por su parte, la mayoría de los adenomas no cumplen con los criterios de clasificación molecular planteados, tomándose como no clasificables (32/75; 42.6%); seguidos por los tumores sub-tipo Luminal erbB2 (14/75; 18.7%), por últimos los sub-tipo erbB2 (12/75, Luminal A y Luminal B (8/75; 16% cada uno) y Basal (1/75; 1.3%) (Figura 3.14).

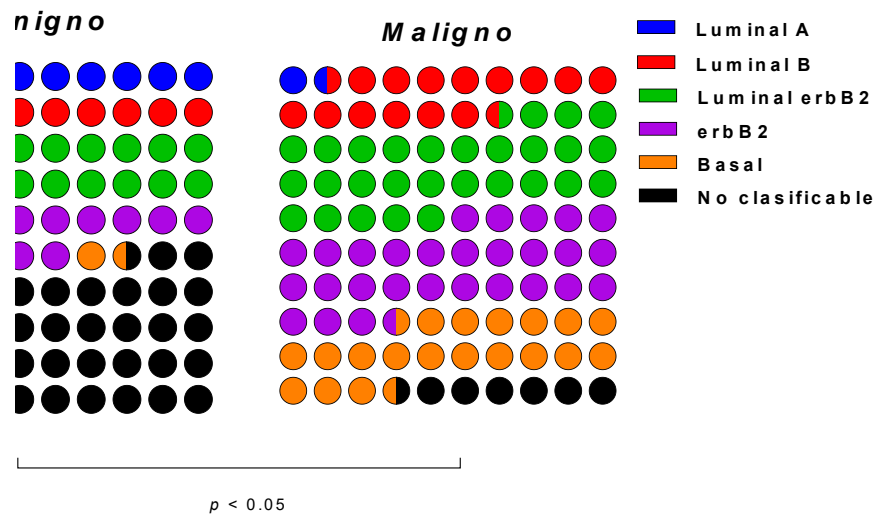


Fig. 3.14. Clasificación molecular de las neoplasias mamarias en perras.

El ACM para el caso de las neoplasias benignas únicamente separó el conjunto de observaciones en dos grupos, en los cuales destacó la clasificación erbB2 y los tumores de tipo API. En contraste, el resto de neoplasias benignas no se asociaron de forma clara; es por ello que todos los datos se presentan en una nube de datos compacta y no definida por la correspondencia entre las categorías

de las variables (Figura 3.15). Por otra parte, en los TMC de tipo maligno se formaron tres grupos bien definidos de correspondencia entre el tipo histológico y la clasificación molecular: CARS, CSD y TEC, clasificados en los tipos Basal y Luminal B; COMD, clasificados exclusivamente en el tipo erbB2; CC y CS, asociados a las categorías Luminal B-erbB2 y No calificables. Resulta interesante que dentro de los TMC malignos el único tipo histológico no asociado de forma evidente con una categoría molecular fueron los MTC, razón por la cual dicho grupo se ubica al centro de la gráfica.

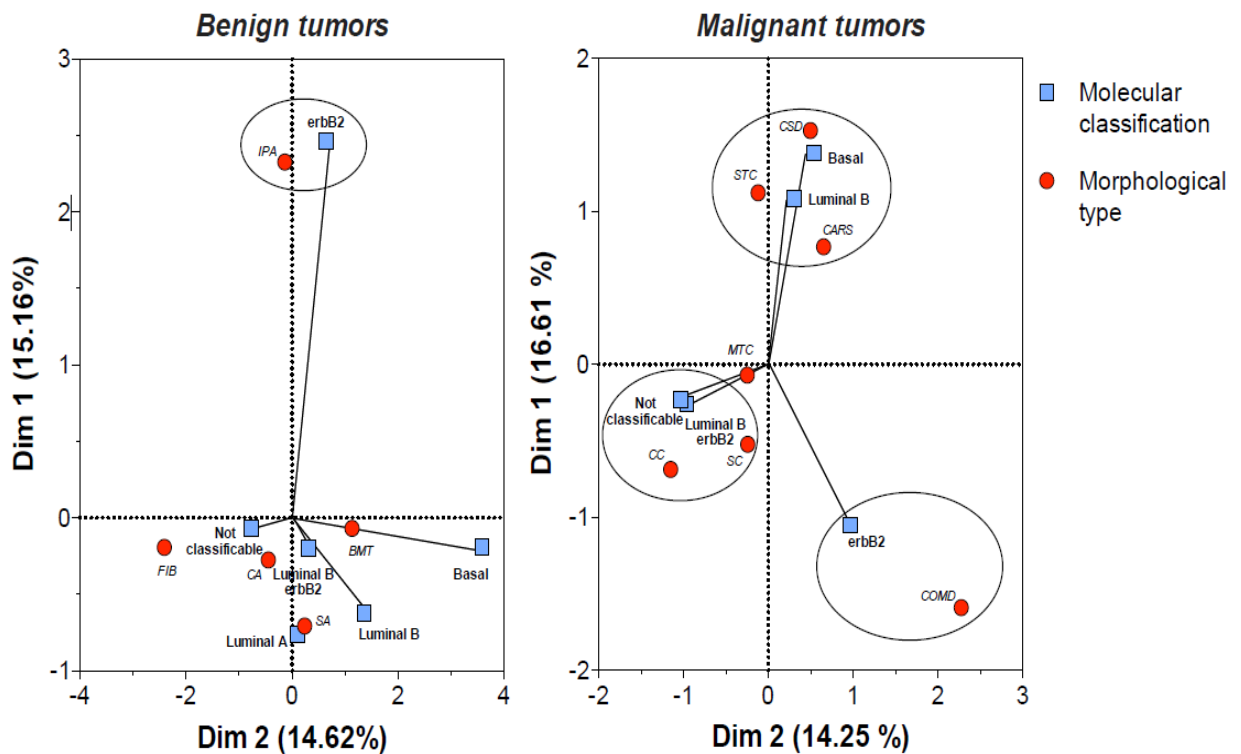
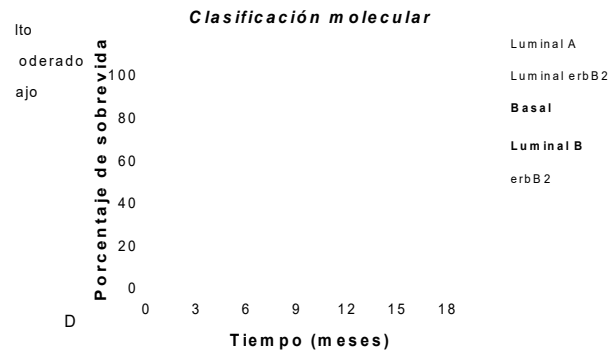
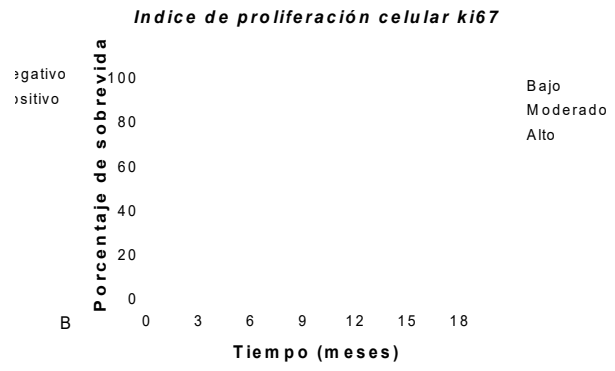


Fig. 3.15. **Análisis de correspondencia múltiple** del patrón de asociación entre la clasificación molecular y el tipo histológico de los TMC de acuerdo a su comportamiento biológico.

Análisis de sobrevida

El 40% (24/60) de las pacientes con tumores malignos murieron. Al relacionar la sobrevida con los diferentes marcadores evaluados, se pudo observar que las pacientes que presentaron RE positivo e índice de proliferación celular Ki67 bajo a moderado, tuvieron mayor tiempo de sobrevida en comparación con aquéllas con tumores RE negativo e índice Ki67 alto ($p < 0.05$) (Figura 3.16 A-B).

Con respecto al nivel de expresión de erbB2, a pesar de que la diferencia en los niveles de expresión no son significativos ($p > 0.05$), se puede notar que las pacientes con tumores erbB2 bajo tienden a una menor sobrevida que aquellas con nivel moderado y alto (Figura 3.16C). Al medir el tiempo de sobrevida dependiendo de los subtipos moleculares del TMC se observa que el Luminal B y el erbB2 presentan tiempo de sobrevida más corta en comparación con el Basal y el Luminal erbB2. Es importante denotar que las perras con tumores tipo Luminal A tienen mejor pronóstico y sobreviven a los 18 meses post-cirugía ($p < 0.05$) (Figura 3.16D). Los tumores con DMV alta no se relacionan con menor expectativa de vida (Figura 3.16E; $p > 0.05$).



1 tumores malignos

Fig. 3.16. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier. A. RE; B. ki67; C. erbB2; D. Subtipos molecular; E. CD31

DISCUSIÓN

El desarrollo de la angiogénesis del cáncer de mama es complejo y depende de varios factores de crecimiento angiogénicos (Ahmad *et al.*, 2010). La DMV observada en nuestros resultados no muestra marcada diferencia entre los TMC benignos y los malignos. Igual que en este trabajo, otros investigadores evaluaron la expresión de CD31 y la sobrevida en carcinomas mamarios observando que el 100% de los carcinomas eran inmunopositivos para CD31 y la expresión no fue significativamente diferente entre los grupos de carcinomas, sin embargo, los pacientes con carcinomas que presentaban incremento en la vascularización tuvieron corta sobrevida (Lavalle *et al.*, 2009). En mujeres con cáncer de mama, autores han reportado 1.59 veces más riesgo de metástasis por cada 10% de incremento en la microvasculatura tumoral (Gasparini, 2000).

La estimulación de receptores para estrógenos o diferencias en los niveles de expresión, puede influir en el desarrollo y comportamiento clínico de las neoplasias mamarias en perras (Sorenmo *et al.*, 2000). Basados en nuestros resultados se puede afirmar que con la indiferenciación celular se pierden los receptores de estrógenos de las células; observamos que la mayoría de las neoplasias mamarias malignas son RE α negativo y las pacientes presentan menor sobrevida, a diferencia de las neoplasias benignas que tienden a ser positivas. La mayoría de los estudios, describen una disminución en la expresión del receptor de estrógenos con el aumento en el grado de malignidad (De Las Mulas *et al.*, 2005). De igual forma, Chao-Chin *et al.* (2009) evaluaron 113 perras y encontraron que el 49.4% de los tumores malignos no presentaban marcaje para el RE α mientras que los benignos casi en su totalidad eran positivos (95.8%).

A diferencia de nuestros resultados, donde no encontramos relación entre el tamaño del tumor y la expresión del RE α , investigadores encontraron relación entre el tamaño del tumor y la expresión de RE α ; el 57.1% de los tumores < 5 cm fueron positivos y aquéllos tumores > 5 cm (57.5%) fueron negativos (Chao-Chin *et al.*, 2009).

En nuestro estudio la expresión de erbB2, proto-oncogén que codifica el receptor tirosin quinasa, no mostró diferencias entre el TMC benigno y maligno; sin embargo, con relación al tamaño, la expresión es alta en tumores menores a dos centímetros, que suelen ser benignos, por lo que inferimos que la sobreexpresión está relacionada con estádios tempranos de la enfermedad (Schmitt *et al.*, 1995).

Asimismo, la baja expresión de erbB2 en aquéllos tumores mayores a seis centímetros, que son frecuentemente malignos, lo asociamos al estadio avanzado. Ressel *et al.* (2013) detectaron sobre-expresión de erbB2 en tejido mamario normal, hiperplásico y displásico que rodea al tejido neoplásico, y encontraron relación en la expresión de erbB2 con el índice mitótico alto, por lo tanto, concluyeron que los niveles anormales de dicha proteína podrían estar implicados en el crecimiento celular hiperplásico o neoplásico benigno.

Con relación al análisis de sobrevida y la expresión de erbB2, nosotros no observamos diferencias entre el nivel de expresión y la sobrevida, coincidiendo con Ressel *et al.* (2013) quienes afirman que la sobre-expresión de erbB2 no se correlaciona con la supervivencia global, y perras con carcinoma erbB2 sobre-expresado no presentaron peor pronóstico que aquéllas con erbB2 no sobre-expresado. Sin embargo, se ha descrito que perras con carcinoma de mama erbB2 sobre-expresado cursan con metástasis o muerte antes de los 6 meses post- cirugía (De Las Mulas *et al.*, 2003).

El aumento de la proliferación celular es una característica clara de las neoplasias mamarias malignas, que tienen una fracción mayor de células en ciclo celular activo (Ferreira *et al.*, 2009). Esto ha sido corroborado en nuestro estudio a través de la sobre-expresión del antígeno Ki67, medido como índice de proliferación celular, el cual se encuentra claramente incrementado en las neoplasias malignas en comparación con las benignas. Ferreira *et al.* (2009) en lesiones intra-epiteliales de mama, asociaron el grado del tumor con un aumento proporcional del índice ki67. De igual forma, Dutra *et al.* (2004) relacionaron el índice de proliferación con el pleomorfismo nuclear; el 78.5% de los carcinomas

presentaron expresión de Ki67 mayor al 10%, con un pleomorfismo nuclear moderado a marcado e incremento del tamaño celular.

Así mismo, nuestros hallazgos revelan un índice de proliferación celular proporcional al tamaño del tumores, coincidiendo con Ferreira *et al.* (2009) quienes encontraron correlación positiva ($r = 0.41$, $P < 0.01$) entre el índice de proliferación ki67 y el tamaño del TMC; los tumores clasificados como T1 (0–3 cm) presentaron un índice entre 1 a 17%, los T2 (3–5 cm) de 3 a 34% y los T3 (>5 cm) 3 a 68%. A mayor tamaño del tumor, mayor es la proliferación celular. De igual forma, evaluaron la supervivencia y observaron que las pacientes con tumores mamarios T3, presentaron una corta supervivencia en comparación con aquellas con tumores T1 y T2, en los cuales la supervivencia fue similar.

Con base en nuestros resultados se puede inferir que el uso del sub-tipo molecular del TMC muestra diferencias significativas entre las neoplasias benignas y malignas, y define mejor a las neoplasias malignas. Debido a que los carcinomas evaluados, en su mayoría, sobre-expresaron erbB2 y un elevado índice de proliferación celular, los subtipos moleculares más frecuentes fueron el Luminal erbB2 y el erbB2. Por su parte, investigadores coinciden en reportar más frecuentemente los sub-tipo Luminales A – B y en menor proporción los que sobre-expresan erbB2, sin embargo, no consideraron el índice de proliferación celular Ki67, el cual fue punto de corte para la clasificación adoptada en nuestro estudio, donde adicionalmente se consideró el subtipo molecular Luminal erbB2 (Im *et al.*, 2014; Sassi, 2010 y Gama *et al.*, 2008). Ambas características aplicadas en la clasificación ha dado mejores resultados en el cáncer de mama en mujeres (Cheang *et al.*, 2009 y McCafferty *et al.*, 2009), y con base en nuestros resultados, demuestran ser de gran utilidad pronóstica en perras. La clasificación del sub-tipo molecular podría aportar información adicional de interés clínico, por lo que apoyamos lo propuesto por investigadores que refieren dicha clasificación con la finalidad de dar mejor evaluación del pronóstico del TMC y ayudar en la selección de la terapia más apropiada para cada caso (Im *et al.*, 2014).

Adicionalmente, se observó que en los tumores benignos clasificables, también existen mayor frecuencia de tumores benignos que expresan erbB2, como los son el Luminal erbB2 y el erbB2, esto probablemente esté relacionado con el potencial de malignidad de dichos tumores. El erbB2 es un indicador de la proliferación celular y su expresión puede desempeñar un papel en la carcinogénesis temprana (Schmitt *et al.*, 1995). Por otra parte, al asociar el tipo histológico más frecuente con la clasificación molecular confirmamos que el carcinoma mamario canino es heterogéneo en cuanto a morfología y expresión molecular, por lo que cada carcinoma se debe sub-clasificar y asociar con la clasificación morfológica de cada paciente en particular; sin embargo, existe cierto grado de asociación entre algunos tipos histológicos con los sub-tipos moleculares, tal es el caso del COMD y el sub-tipo erbB2.

En consonancia con nuestros resultados, Im *et al.* (2014) también encontraron asociación significativa entre el carcinoma sólido (6/11, 54.5%) con el sub-tipo Basal. De igual forma, coincidimos en afirmar que los tumores Luminal A se caracterizaron por ser de baja proliferación y grado histológico, mientras que los tumores de tipo basal son en su mayoría de alto grado y alta tasa proliferativa, asociado con una menor tasa de supervivencia general y libre de la enfermedad Gama *et al.* (2008).

CONCLUSIONES

En este estudio, los tumores malignos presentaron frecuentemente negatividad al RE α , exhibieron índices de proliferación celular alta y fueron asociados a tiempos de supervivencia más cortos. Esto sugiere que la pérdida de la diferenciación celular caracteriza a las células neoplásicas malignas, conduce a una expresión reducida de RE α y se asocia con aumento de la expresión de marcadores de proliferación celular como ki67.

Los carcinomas evaluados en este estudio sobre-expresaron erbB2 y presentaron un índice de proliferación celular alto; por lo tanto, los subtipos moleculares más comunes fueron el Luminal erbB2 y erbB2.

El ki67 y el RE α son excelentes marcadores pronósticos para TMC. ki67 es útil para la clasificación del subtipo molecular, donde ayuda a discriminar entre los subtipos luminales A y B, y junto con RE α , contribuye a la consideración del subtipo Luminal erbB2, que, además de ser uno de los subtipos más frecuentes, se asocia con la esperanza de vida mejor que el subtipo rico en erbB2.

Estos resultados obtenidos a partir de una población canina de referencia en México, aportan información que debe ser utilizada para fortalecer el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de pacientes con TMC y soportan el uso de biomarcadores para tal fin, principalmente en países donde aún los pacientes oncológicos no obtienen sus beneficios.

BIBLIOGRAFIA

1. Ahmad N, Al-Dissi, Deborah M, Baljit Singh, Beverly A Kidney. 2010. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 in canine simple mammary gland adenocarcinomas. *Cancer Veterinary Journal* 51,1109–1114.
2. Casal J y Mateu E. 2014. Tipos de muestreo. *Revista de Epidemiología y Medicina Preventiva* 1. 3-7, Vol. 51(3) 549-559.
3. Cassali G, Gobbi H, Malm C, Schmitt F. 2006. Evaluation of accuracy of fine needle aspiration biopsy for diagnosis of canine mammary tumors: comparative features with the human tumors. *Cytopathology* 17, 1–7.
4. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO. 2009. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 101: 736e50.
5. Chao-Chin Chang, Min-Hsuan Tsai; Jiunn-Wang Liao, Jacky Peng-Weng Chan, Min-Liang Wong, Shih-Chieh Chang. 2009. Evaluation of hormone receptor expression for use in predicting survival of female dogs with malignant mammary gland tumors. *Journal of American Veterinary Medicine Association* 235, 4 August 15.
6. Costa PS, Santos NC, Cunha P, Cotter J, Sousa N. 2013. The Use of Multiple correspondence Analysis to Explore Associations between Categories of Qualitative Variables in Healthy Ageing. *Journal of Aging Research*, Article ID 302163, 12 pag.
7. De Las Mulas JM, Millan Y, Dios R. 2005. 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. *Veterinary Pathology* 42, 200–212.
8. Dutra, Granja, Schmitt, Cassali. 2004. c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37, 11.
9. Ferreira E, Bertagnolli AC, Cavalcanti MF, Schmitt FC, Cassali GD. 2009. The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Veterinary Comparative Oncology* 7, 230–235.

10. Ferreira y Rasband. ImageJ User Guide IJ 1.46r., 2012. Image Processing and Analysis in Java. pag 198. <http://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/user-guide.pdf> /19.05.2014.
11. Gama A, Alves A, Schmitt F. 2008. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Archives* 453(2), 123-132.
12. Gasparini G. 2000. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist* 5 (suppl 1), 37–44.
13. Guameri, Piacentini, Ficarra, Frassoldati, D'Amico, Maiorana, Jovic, Conte, Giovannelli. 2009. A prognostic model based on nodal status and Ki-67 predicts the risk of recurrence and death in breast cancer patients with residual disease after preoperative chemotherapy. *Annals of Oncology* 20: 1193–1198.
14. Goldhirsch, E. P. Winer, A. S. Coates, R. D. Gelber, M. Piccart-Gebhart, H.-J. Senn Panel members. 2013. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Annals of Oncology* 24: 2206–2223.
15. Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R, Zappulli V. 2011. Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology* 48:117-131.
16. Im K. S., N. H. Kim, H. Y. Lim, H. W. Kim, J. I. Shin and J. H. Sur. 2014. Sur. Analysis of a New Histological and Molecular-Based Classification of Canine Mammary Neoplasia. *Veterinary Pathology* 51(3):549-559.
17. Lavalle, Bertagnolli, Tavares, Cassali. 2009, Cox-2 Expression in Canine Mammary Carcinomas: Correlation with Angiogenesis and Overall Survival G. E. *Veterinary Pathology* 46:1275–1280.
18. Ressel L, Puleio P, Ruggero Loria, Vannozzi L, Millanta M, Caracappa S, Poli A. 2013. HER-2 expression in canine morphologically normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissues and its correlation with the clinical outcome. *Research Veterinary Science* 94, 299–305.
19. McCafferty M; Healy N; Kerin M. 2009. Breast cancer subtypes and molecular biomarkers. *Diagnostic Histopathology* 15(10):485-9.
20. Millanta, F, Lazzeri G, Mazzei M, Vannozzi I, Poli A. MIB-1 Labeling Index in Feline Dysplastic and Neoplastic Mammary Lesions and Its Relationship with postsurgical prognosis. *Veterinary Pathology* 39:1 120-6.

21. Panal M, Herrera M, Hardisson D, Choqueneira M, Guindo A, García F. 2014. Correlación entre la expresión de Ki67 con factores clásicos pronósticos y predictivos en el cáncer de mama precoz. *Revista de Senología y Patología Mamaria* 27(4):163-169.
22. Pinho Salomé, Augusto JF Matos, Célia Lopes, Nuno T Marcos, Júlio Carvalheira, Celso A Reis, Fátima Gärtner. 2007. Sialyl Lewis x expression in canine malignant mammary tumours: correlation with clinicopathological features and E-Cadherin expression. *BMC Cancer* 7, 124 doi:10.1186/1471-2407-7-124.
23. Ramírez A, Bianchi G. 2011. Carcinoma de la mama triple negativo aspectos morfológicos y expresión de ck 5/6. *Revista Venezolana de Oncología* 23(1):2-13
24. Sassi F, Benazzi C, Castellani G, Sarli G. 2010. Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *BMC Veterinary Research* 6, 5.
25. Schmitt FC, Figueiredo, Lacerda M. 1995. Expression of c-erbB- 2 protein and DNA ploidy in breast carcinogenesis. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 119, 815-820.
26. Simon R, Mirlacher M, Sauter G. 2005. Tissue microarrays. *Methods in Molecular Medicine.*, 114, 257-68.
27. Sorenmo KU, Shofer FS, Goldschmidt MH. 2000. Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. *Journal Veterinary Intern Medicine* 14:266–270.
28. Solis L y Andrade A. 2005. Que son los marcadores moleculares. *Revista de divulgación científica de la Universidad de Veracruz* Vol. XVIII. N°1.
29. Vinothini G, Balachandran C, Nagini S. 2009. Evaluation of molecular markers in canine mammary tumors: correlation with histological grading. *Oncology Research* 18(5-6), 193-201.

Capítulo IV

Expresión del gen *BRCA 1* y *2* en neoplasias mamarias de perras y su asociación con parámetros clínico-patológicos

En el presente capítulo se desarrollan los objetivos específicos N° 5 y parte del N° 6, Determinar la expresión a través de PCR tiempo real del gen *BRCA 1* y *2* en tejido mamario neoplásico de perras y Relacionar la expresión del *BRCA1/2* con las características clínico-patológicas en el tumor mamario canino.

RESUMEN

Los genes de susceptibilidad al cáncer de mama 1 y 2 (*BRCA1* y 2) son genes supresores de tumor, responsables de la reparación del DNA dañado (Pierce *et al.*, 2002). Investigar los niveles de expresión del *BRCA1* y 2 y asociarlo a la expresión de proteínas involucradas en el cáncer de mama en perras, será de gran utilidad para los avances en el estudio del cáncer de mama tanto en la mujer como en perras. El objetivo del presente estudio consistió en determinar la expresión, a través de PCR tiempo real en tejido mamario neoplásico, del gen *BRCA 1* y 2 y su asociación con parámetros clínico-patológicos en perras Cocker, Poodle y Mestizas. Se realizó PCR tiempo real y se cuantificó el nivel de expresión del *BRCA 1* y 2 normalizado con β -actina, a través del método 2 Delta Delta CT. Se observó que el *BRCA 1* no se asocia con parámetros clínico-patológicos y no es un indicador de malignidad en perras Cocker, Mestizas y Poodle. El *BRCA 2* se encuentra en baja expresión en los tumores mamarios de perras Cocker y Mestiza, y está asociado con positividad al RE α . Se concluye que la expresión del *BRCA 1* y 2 en el tumor mamario canino resulta heterogénea por individuo. Teniendo en cuenta el carácter heredo familiar del gen en el desarrollo del cáncer de mama, su estudio puede aportar mayor información en aquellas razas con clara predisposición a la enfermedad.

Palabras claves: *BRCA1*, *BRCA2*, tumor mamario, perras, qPCR.

INTRODUCCIÓN

El tumor mamario es considerado un desorden multifactorial causado tanto por elementos genéticos, como no genéticos. Entre los factores genéticos se ha descrito la activación de oncogenes que conllevan a la sobre-expresión de proteínas que estimulan la proliferación celular, así como, la pérdida de función de genes supresores de tumor producto, de una mutación o una deleción. Tanto la sobre-expresión y la pérdida función de dichos genes trae como consecuencia aumento de la probabilidad de desarrollar un tumor (Narod y Rodríguez, 2011).

Los genes de susceptibilidad al cáncer de mamá (*BRCA* en inglés) 1 y 2 son genes supresores de tumor. Mutaciones en estos genes son responsables de fallas en la reparación por procesos de recombinación homóloga (HR) de rupturas del DNA de doble cadena (DSBs), favoreciendo la carcinogénesis (Pierce *et al.*, 2001). Se ha establecido que mujeres con mutaciones en el *BRCA1* generalmente presentan tumores de alto grado histológico, RE negativo, expresión de erbB2 negativo, p53 positivo y es poco común en carcinoma *in situ*. A diferencia de aquellas con fenotipo mutacional *BRCA2* que suelen ser de grado histológico intermedio a alto, RE positivo, erbB2 negativo, expresión de p53 positiva y son comunes en carcinoma insipiente (Foulkes *et al.*, 2004).

Rivera *et al.* (2009) utilizando SNPs para genotipificar perras Springer Spaniel Ingles (ESS), observaron asociación del tumor mamario canino (TMC) con los *BRCA1* y *BRCA2*. Las perras ESS fenotipo *BRCA1* y *BRCA2* mostraron mayor riesgo a padecer TMC y una asociación fuerte del TMC maligno con el gen *BRCA1*.

Establecer las alteraciones en la expresión del *BRCA* a través de técnicas diagnósticas disponibles y de rápida respuesta, como puede resultar hoy día una PCR; es una alternativa poco estudiada en Medicina Veterinaria, haciendo necesaria la continua investigación en busca de la expresión del gen y sus posibles mutaciones, así como su interacción con otras proteínas para

comprender el mecanismo mediante el cual estos genes influyen en el desarrollo y la malignidad de la enfermedad.

Por lo tanto, investigar los niveles de expresión de *BRCA 1/2* y asociarlo a la expresión de proteínas involucradas en el cáncer de mama en perras, abre un abanico de posibilidades en el estudio del cáncer de mama, tanto en la mujer como en perras; teniendo en cuenta que las perras han demostrado ser un excelente modelo comparativo dado el alto grado de homología entre la secuencia del genoma canino y su contraparte humana, así como las similitudes con respecto a la morfología, comportamiento biológico, y curso clínico de los tumores mamarios en ambas especies (Rivera y Euler, 2011).

La identificación de factores genéticos es fundamental para mejorar la prevención, diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama. Los avances en biología molecular proporcionan herramientas que permiten caracterizar la influencia genética en las diversas enfermedades (Rivera y Euler, 2011). A partir del TMC como modelo animal, los estudios pueden enfocarse en explicar la interacción entre el factor de riesgo ambiental y las causas poligénicas de los tumores de mama en ambas especies, y obtener mejores resultados en su tratamiento.

Para este capítulo se desarrollan los siguientes objetivos:

- Determinar la expresión de *BRCA 1* y *2* por cuantificación relativa a través de PCR tiempo real, en el tejido mamario neoplásico de perras Cocker, Mestizas y Poodle.
- Asociar la expresión del gen *BRCA 1* y *2* con parámetros clínico-patológicos:
 - a. Comportamiento biológico, tamaño, índice de proliferación celular ki67, expresión de RE α , erbB2 y sub-tipo molecular del tumor.
 - b. La edad y sobrevivida de las pacientes.

METODOLOGIA

Población y muestra

La población de estudio consistió en 80 pacientes que fueron sometidas a nodulectomía o mastectomía por neoplasia mamaria, atendidas en el Hospital Veterinario de Especialidades, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), durante el lapso comprendido entre febrero de 2012 y octubre de 2013. Cuyos especímenes quirúrgicos fueron referidas al Departamento de patología de la Facultad.

La muestra estuvo representada por 45 biopsias de los tumores mamarios provenientes de las perras cuya raza son más frecuentemente afectadas por el TMC. Consistió en: 15 tumores (10 benignos y 5 malignos) de perras Cocker, 20 tumores (10 benignos y 10 malignos) de Poodle y 10 de perras Mestizas (tres benignos y siete malignos). Como control se utilizaron 10 fragmentos de tejido mamario sano y de perras adultas, no castradas, de las diferentes razas evaluadas.

Expresión del gen *BRCA 1* y *2* en tumores mamarios caninos

La purificación del RNA, síntesis de cDNA y PCR tiempo real para el *BRCA* canino, se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Genética y Bioestadística de la FMVZ-UNAM. El protocolo seguido consistió en:

Purificación del RNA: se realizó a través de columnas de RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit, QIAGEN® (catalogo 74704), cuyo principio consiste en aislar RNA total mediante la combinación de lisis del tejido con isotiocianato de guanidina y el uso de filtros de sílice, asimismo, integra fases de digestión a través de proteinasa K, DNasa y RNasa con el fin de obtener un mRNA total de alta calidad.

Síntesis de cDNA y PCR tiempo real: la síntesis del cDNA se realizó con el Kit RT² HT First Strand de QUIAGEN® (catálogo 330411), que ofrece un procedimiento rápido y conveniente para una eficiente síntesis de cDNA y la eliminación de ADN genómico de las muestras de ARN. El cDNA sintetizado se utilizó para PCR tiempo real, el cual, con el objetivo de determinar la expresión de *BRCA2* en los tumores mamarios y tejido normal de las perras en estudio, se llevó a cabo mediante el uso de un Rotor-Geen QUIAGEN® con el kit para RT² qPCR Primer Assay SYBR QUIAGEN® para *BRCA2* de perro (catálogo PPF00706A). Como gen constitutivo se usó β -actina de perro (Dog, catálogo PPL02472A).

Cuantificación relativa: se realizó la cuantificación relativa mediante el método del 2 Delta Delta CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Para este método la cantidad de la expresión génica es igual a $2^{-\Delta\Delta CT}$, definida como el cambio en la expresión de un gen de interés en relación con un grupo de referencia, tales como control no tratado o una muestra de tiempo cero en el estudio. Se requiere seleccionar un control interno y el calibrador; el propósito del control interno es normalizar las PCRs para la cantidad de RNA adicionada en la retrotranscripción. Los datos se presentan como el cambio en la expresión génica normalizada a un gen endógeno de referencia y en relación con la expresión del gen de interés en los casos control. Para este método de cuantificación relativa se requiere considerar: a) Seleccionar el gen de control interno, b) Validar el control interno para constatar que éste no se afecta por el tratamiento, c) Validar la eficiencia de expresión de ambos genes en estudio, el gen de interés y el control interno (Livak y Schmittgen, 2001). En nuestro estudio se utilizó como control interno o gen endógeno a β -actina y como control muestras de tejido mamario sano.

Para medir el nivel de expresión del gen *BRCA* en los tumores mamarios de las perras en estudio se utilizó el software RT2 Profiler PCR Array Data Analysis v3.5 (QUIAGEN®, 2014), el cual considera para su análisis el cálculo de: Fold Regulation, Fold Change, media del ΔCT y el $2^{-\Delta CT}$.

El *fold change* es calculado utilizando el método del $\Delta\Delta\text{CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001), que es la relación de la expresión del gen entre el grupo control y experimental. Números superiores a 1 indican incremento en la expresión, números entre 0 y 1 indican disminución en la expresión y un Fold Change de 1 indica que no hay cambio en la expresión del gen. El cálculo se realizó siguiendo las siguientes formulas:

$$\Delta\text{CT} = \text{CT (BRCA2)} - \text{Promedio CT } (\beta \text{ actina})$$

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT (Grupo experimental)} - \Delta\text{CT (Grupo Control)}$$

Finalmente el valor del *fold change* es calculado por la conversión del $\Delta\Delta\text{CT}$ en \log_2 usando la siguiente ecuación: $\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$

La significancia estadística dada por el valor de p es calculados usando la T de Student sobre los valores del Fold change de cada gen, en el grupo control y experimental. Una $p < 0.05$ indica diferencia estadísticamente significativa. Los *fold change* fueron graficados con el programa GraphPad Prism 6.0 para Windows.

Asociación con parámetros clínico-patológicos

Se utilizó la base de datos con información referente al comportamiento biológico (CB), tamaño, índice de proliferación celular Ki67, expresión del receptor de estrógeno (RE α), erbB2 y sub-tipo molecular del tumor, así como la edad y sobrevida de las pacientes. Con el paquete estadístico PASW Statistics 18 se realizó estadística no paramétrica a través de la construcción de tablas de contingencia y con la Chi-cuadrada de Pearson (X^2) se estableció la asociación entre la expresión del *BRCA 1* y *2* en los tumores mamarios de las perras en estudio. Se consideró un valor con significancia estadística para una $p < 0.05$

RESULTADOS

Expresión del BRCA 1 y 2 en el tumor mamario

Al analizar la expresión de *BRCA 1* y *BRCA2* normalizado con *β-actina* y comparado con el grupo control, se observó que el tumor mamario en las perras Cocker y Mestizas presenta baja expresión (Tabla 4.1 y Fig. 4.1 A); de igual forma, al discriminar la expresión en los tumores mamaros según su comportamiento biológico, en benignos (NB) y malignos (NM), se observa una expresión similar a la observada al analizarlos de manera conjunta. Se aprecia que los NB y NM de las perras Cocker y Mestizas se encuentran por debajo de la expresión del grupo control (Tabla 4.1 y Fig. 4.1 B).

Por otra parte, se observó que el *BRCA 1* y *2* en las perras Poodle se sobreexpresa en el TMC, así como al diferenciarlo en benigno y maligno; mientras que el *BRCA 2* en las NB no muestra cambios en su expresión (Tabla 4.1 y Fig. 4.1 A-B).

Adicionalmente se evidenció que el nivel de expresión de ambos genes por individuo es heterogénea, tanto las NB como las NM pueden tener una expresión baja, sin cambios o elevada (Fig. 4.2 A-C).

TABLA 4.1. Expresión relativa del BRCA (*fold change*) en el Tumor Mamario Canino en Perras Cocker, Mestizas y Poodle

	TMC		TMC NB		TMC NM	
	BRCA1	BRCA2	BRCA1	BRCA2	BRCA1	BRCA2
Cocker	0.72	0.34	0.83	0.24	0,62	0.53
Mestizas	0.04	0.15	0.02	0.43	0.06	0.08
Poodle	4.19	2.15	6.29	1.92	2.39	2.51

TMC: Tumor mamario canino, NB: Neoplasia benigna, NM: Neoplasia Maligna

El color de los números indican nivel de expresión (rojo: baja, negro: sin cambios y azul: sobre-expresión).

BRCA1

BRCA2

Fig. 4.1 Expresión del *BRCA 1* y *2* en el Tumor Mamario Canino de perras Cocker, Poodle y Mestizas. A. Comparación de la expresión del *BRCA 1* y *2* en los tumores mamaros. B. Expresión del *BRCA 1* y *2* en tumores benignos y malignos

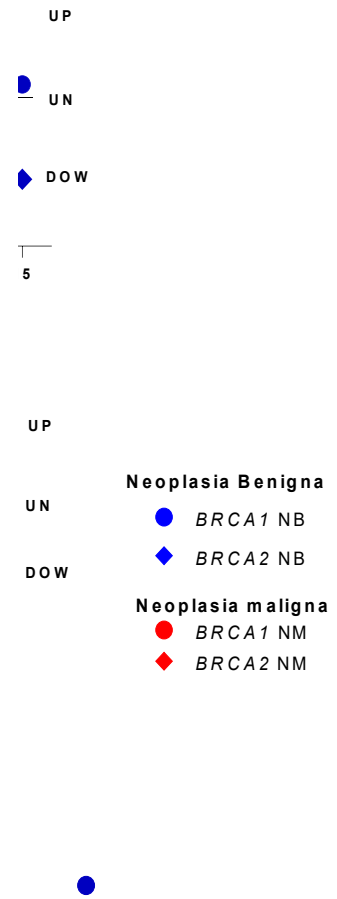


Fig. 4.2. Nivel de expresión de *BRCA 1* y *2* por individuo en los TB y TM. A. Expresión en perras Cocker. B. Expresión en perras Mestizas. C. Expresión en perras Poodle. (UP: Sobre-expresión, UN: Sin cambios en la expresión, DOW: baja expresión)

Asociación de la expresión del *BRCA 1* y *2* con parámetros clínico-patológicos

Al establecer la asociación entre la expresión del *BRCA 1* y *2* en los tumores mamarios de las perras en estudio. El *BRCA 1* mostró independencia con relación al comportamiento biológico, RE α , erbB2, índice de proliferación celular, clasificación molecular y el tamaño del tumor, así como con la edad y sobrevida de las pacientes.

Con relación a la expresión de *BRCA2* se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el comportamiento biológico de los tumores, así como con la expresión de RE α . La mayoría de las NB presentan una baja expresión del gen, mientras que en las NM la mayoría sobre-expresa el gen. Por otra parte, los tumores RE α positivos (+) en su mayoría presentan baja expresión del *BRCA 2* (Tabla 4.2). Sin embargo, no se demostró asociación con las demás variables estudiadas.

Tabla 4.2. Asociación de la expresión del BRCA 1 y 2 con variables clínico-patológicas en el Tumor Mamario canino

	CB (%) NB - NM	Tamaño (%/CM) <3 >3	Ki67 (%) B A		RE (%) - +		erbB2 (%) B A		Edad (% /años) <8 >8	Muerte (%) NO - SI
BRCA 1										
DOW	35.4 – 25	22.2 – 31.3	37.5 – 22.9		14.6 – 45.8		22.9 – 37.5		10.4 – 50	41.1- 18.8
UN	4.2 – 6.3	8.3 – 2.1	6.3 – 4.2		2.1 – 8.3		6.3 – 4.2		2.1 – 8.3	8.3 - 2.1
UP	12.5 – 16.7	16.7 – 12.5	8.3 – 20.8		14.6 – 14.6		14.6– 14.6		10.4 – 18.8	22.9 – 6.3
χ^2	0.531	0.407	0.112		0.195		.561		0.396	0.745
<i>(p<0.05)</i>										
BRCA 2										
DOW	29.5 – 18.2	37.5 – 43.8	25.5 – 18.2		11.4 – 36.4		16.4 – 27.3		10.9 – 32.7	34 – 9.4
UN	11.4 – 0	0 – 3.1	7.3 – 10.9		0 – 11.4		10.9-7.3		9.1 – 9.1	15.1 – 3.8
UP	9.1 – 31.8	6.3 – 9.4	12.7 – 25.5		22.7 – 18.2		20 – 18.2		7.3 – 30.9	20.8 – 14
χ^2	0.003 *	0.648	0.227		0.026*		0.051		0.184	0.187
<i>(p<0.05)</i>										

NB: neoplasia benigna. NM: Neoplasia maligna. B: Bajo. A: Alto
DOW: Baja expresión. UN: sin cambios en la expresión. UP: sobre-expresado.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se observó que *BRCA 1* y *2* se encuentran en una baja expresión en el TMC analizado en conjunto, así como discriminado según el comportamiento biológico en benignos y malignos, en las perras Cocker y Mestizas. Estos resultados son comparables con lo observado por Klopffleisch y Gruber (2009) quienes observaron en el TMC una expresión reducida del *BRCA 1* en el 60% de los adenomas simples y sin cambios en el 80% de los adenocarcinomas. Así mismo, otros estudios realizados en mujeres con cáncer de mama, han observado que tanto la expresión del mRNA del *BRCA 1*, así como, la expresión por inmunohistoquímica de su proteína se encuentra baja en los carcinomas mamarios (Fahd *et al.*, 2005).

También se observó que el *BRCA 1* y *2* en los tumores mamarios de las perras Poodle está por lo general sobre-expresado. Además, la expresión del *BRCA 1* y *2* es particular de cada tumor en cada paciente, por lo tanto resulta heterogénea. Esta variabilidad también fue observada a partir de variantes de splicing del *BRCA 1*, cuyo patrón de expresión relativo fue variado en cada tumor mamario canino (Takaaki *et al.*, 2007).

Adicionalmente el *BRCA 1* se comporta independiente de las variables clínico-patológicas evaluadas. Tal como fue observado por Takaaki *et al.* (2007) donde el resultado histopatológico no se relacionó con la cantidad relativa y el patrón de expresión de variantes de mRNA del *BRCA 1* en tejido TMC. Así mismo, Klopffleisch y Gruber (2009) indicaron que la expresión de *BRCA 1* en perras no está inequívocamente asociada con criterios histológicos de malignidad, debido a que el *BRCA1* no mostró cambios de expresión en el 90% de los ganglios linfáticos metastásicos, por lo tanto, difiere de la malignidad a la que el *BRCA 1* se ha asociado en la especie humana. También los resultados son similares a lo observado en mujeres mexicanas pre-menopáusicas, donde el tamaño del tumor, grado histológico, el estadio clínico, el *erbB2* y *p53* no muestran asociación con la

expresión del *BRCA 1* y 2; sólo la edad guarda relación con la baja expresión del *BRCA 1*, considerándose un marcador de enfermedad severa en mujeres muy jóvenes con cáncer de mama (Loredo-Pozos *et al.*, 2009).

Por otra parte, en el *BRCA 2* la mayoría de las neoplasia benignas y RE α positivos (+) muestran baja expresión del gen, mientras que las malignas lo sobre-expresan. Esto se explica considerando la sobreexpresión de *BRCA2* como una respuesta protectora que disminuye la progresión del cáncer, además la inestabilidad génica incrementada en aquellas células tumorales metastásicas en proliferación también puede ser un posible estímulo para la expresión *BRCA 2* (Klopfeisch y Gruber, 2009). Así como también puede ejercer efectos positivos sobre la proliferación celular la sobre-expresión del *BRCA 2* (Venkitaraman, 2002).

Estos resultados pudieran indicar que la expresión del *BRCA 2* pudiera ser un marcador de malignidad, por lo que se considera necesario continuar sus estudios y así poder revertir lo publicado en la literatura que contraria esta observación. Klopfeisch y Gruber (2009), quienes observaron que no hay diferencias claras en la expresión del *BRCA2* observada entre adenomas y el adenocarcinoma primario, a pesar de que en 40% de los adenomas mamarios la expresión génica se encontró disminuida y sólo el 50% de los ganglios metastásicos mostró una regulación positiva, sin embargo, concluyen que el uso de este gen como un marcador tumoral para diferenciar los tumores benignos y malignos no es determinante. Así mismo, Loredo-Pozos, *et al.*, (2009) observaron que el *BRCA 2* no es un buen marcador molecular de severidad en mujeres mexicanas pre menopáusicas jóvenes, donde no mostro significancia estadística con el tamaño del tumor, características histológicas evaluadas ni expresión del erBB2. Y lo publicado por Hedenfalk *et al.*, 2009, quienes observaron que mujeres fenotipo mutacional *BRCA 2* la expresión del RE varía.

Basados en las premisas que qRT-PCR reproduce los resultados obtenidos con microarreglos para un perfil de pronóstico en las mujeres con cáncer de mama (Espinosa *et al.*, 2005) y que una mutación heredable influye en la expresión del perfil de genes de un tumor (Hedenfalk *et al.*, 2001). Según este estudio el cáncer de mama en perras puede tener un mejor enfoque tomando en consideración algunas razas caninas como el Cocker y las Mestizas. Así mismo, correlacionar mutaciones específicas con la expresión del gen puede resultar útil para el pronóstico en pacientes veterinarias, a la vez que puede definir las razas más adecuadas como modelo animal para el estudio del cáncer de mama en mujeres.

CONCLUSIONES

Se concluye que en el análisis relativo obtenido por PCR tiempo real a partir de tumores mamarios caninos, el *BRCA 1* no se asocia con parámetros clínico-patológicos y no es un indicador de malignidad en perras Cocker, Mestizas, y Poodle. Mientras que el *BRCA 2* se encuentra en baja expresión en los TMC de perras Cocker y Mestizas, y su baja expresión se puede asociar con tumores benignos positivos al RE α . La expresión del *BRCA 1* y *2* en el Tumor Mamario Canino resulta heterogéneo en cada paciente, por lo tanto, teniendo en cuenta el carácter heredo familiar del gen en el desarrollo del cáncer de mama, su estudio puede aportar mayor información enfocado en aquellas razas con clara predisposición a la enfermedad.

REFERENCIAS

1. Espinosa E, Fresno Vara J.A, Redondo A, Sánchez J.J, Hardisson D, Zamora P, Gómez Pastrana F, Cejas P, Martínez B, Suárez A, Calero F, González Barón M. 2005. Breast Cancer Prognosis Determined by Gene Expression Profiling: A Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction Study. *Journal Of Clinical Oncology* 23:7278-7285.
2. Fahd Al-Mulla, Mahera Abdulrahman, Govindarajulu Varadharaj, Nadeem Akhter, and Jehoram T. 2005. Anim. BRCA1 Gene Expression in Breast Cancer: A Correlative Study between Real-time RT-PCR and Immunohistochemistry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* <http://www.jhc.org> 53(5): 621–629.
3. Foulkes W.D., Metcalfe K., Sun P., Hanna W.M., Lynch H.T., Ghadirian P., Tung N., Narod S.A. 2004. Estrogen Receptor Status in BRCA1- and BRCA2-Related Breast Cancer: The Influence of Age, Grade, and Histological Type. *Clinic Cancer Research* 10:2029-2034.
4. Klopfleisch R, Gruber A. D. 2009. Increased Expression of BRCA2 and RAD51 in Lymph Node Metastases of Canine Mammary Adenocarcinomas. *Veterinary Pathology* 46:416–422.
5. Livak y Schmittgen. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. *Methods* 25, 402–408.
6. Loredó-Pozos, Chiquete E, Ocegüera-Villanueva A, Panduro A, Siller-López F, Ramos-Márquez M. 2009. Expression profile of BRCA1 and BRCA2 genes in premenopausal Mexican women with breast cancer: clinical and immunohistochemical correlates. *Medicine and Oncology* 26:269–275.
7. Narod SA, Rodríguez A. 2011. Predisposición genética para el cáncer de mama: genes BRCA1 y BRCA2. *Salud Pública de México* 53:420-429.
8. Pierce AJ, Stark JM, Araujo FD, Moynahan ME, Berwick M, Jasin M. 2001. Double-strand breaks and tumorigenesis. *Trends in Cell Biology* 11:S52–S59.
9. Rivera y Euler. 2011. Molecular Biological Aspects on Canine and Human Mammary Tumors. *Veterinary Pathology* 48:(1) 132-146.
10. Takaaki Sugiura, Satoshi Matsuyama, Hideo Akiyosi, Shigeo Takenaka, Jyoji Yamate, Mitsuru Kuwamura, Mica Aoki, Terumasa Shimada, Fumihito Ohashi,

Kihei Kubo. 2007. Expression Patterns of the BRCA1 Splicing Variants in Canine Normal Tissues and Mammary Gland Tumors. *Journal of Veterinary Medical Science* 69(6): 587-592.

11. Venkitaraman AR 2002. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 108:171–182.

DISCUSIÓN GENERAL

En los antecedentes del tumor mamario canino (TMC) encontrados y reportados en el capítulo I, se pudo observar que la enfermedad tiene una incidencia alta, con presentación similar de neoplasias benignas y malignas, mostrando las malignas un incremento en los últimos años del estudio. Esto puede asociarse con la convivencia íntima de los perros y sus dueños. Investigadores han sugerido como responsable a la contaminación ambiental y a la exposición a sustancias químicas, pues se observaron niveles de piretroides en el tejido adiposo adyacente a los TMC de mayor agresividad (Andrade *et al.*, 2010). Los piretroides son insecticidas de uso común en mascotas y pueden inducir desequilibrio de las hormonas estrogénicas e indirectamente influir en el aumento de la proliferación celular o disminución de la apoptosis en el epitelio mamario (Garey y Wolff, 1998).

Tanto en el estudio retrospectivo del Capítulo I como en lo encontrado en el Capítulo II, en los últimos 14 años las razas más comúnmente afectadas por TMC son el Poodle, Cocker Spaniel, Pastor Alemán y Labrador Retriever; con mayor predisposición a la enfermedad en perras adultas gerontes, con un alto riesgo de que las neoplasias sean de comportamiento maligno tanto en las perras gerontes y las mestizas.

El TMC afecta a las perras enteras y la paridad no está directamente relacionada con la predisposición a la enfermedad, ya que en este estudio en el capítulo II no se evidenció mayor riesgo en las perras nulíparas, contradiciendo la creencia de que las perras deben gestar para disminuir la incidencia de tumor mamario. Así mismo, es probable que exista relación entre la condición corporal de las perras, la ingesta y el metabolismo de los estrógenos como factores carcinogénicos (Coffey, 2001).

Por otra parte, en el capítulo II se evidenció como factor pronóstico importante el tamaño del tumor, donde los tumores de menor tamaño tienden a ser masas múltiples benignas y los de mayor tamaño una masa solitaria y maligna. De igual forma, a pesar de las barreras biológicas e inmunológicas que deben atravesar las células neoplásicas para establecer metástasis (Sorenmo *et al.*, 2003), se evidenció que la presencia de émbolos neoplásicos en la luz de vasos sanguíneos y linfáticos del tumor, es un factor de mal pronóstico, por lo general acompañado de muerte antes del primer año pos-cirugía. Entre los tumores malignos de peor pronóstico se encontró el carcinosarcoma, osteosarcoma, comedocarcinoma y el carcinoma sólido y de los menos agresivos el carcinoma tipo mixto, carcinoma tubulopapilar y el carcinoma complejo.

Con base en indicadores socioeconómicos y costumbres de las familias mexicanas (INFOMED y consulta Mitofky, 2014), probable reflejo de las familias de América Latina, se consideró la atención sanitaria a la población canina susceptible al TMC una necesidad creciente (Salas *et al.*, 2015).

En el capítulo III se evaluaron biomarcadores moleculares (RE α , erbB2, ki67 y CD31) por inmunohistoquímica, se relacionó su expresión con las características histológicas y el historial clínico-patológico de las perras con neoplasias mamarias. Se encontró que la densidad microvascular (DMV) medida a través del anticuerpo CD31, no se asoció con el desarrollo de malignidad de las neoplasias, siendo similar tanto en neoplasias benignas como malignas. A diferencia del anticuerpo RE α , cuyos resultados permiten certificar que con la indiferenciación celular se pierden los receptores de estrógenos de las células tumorales mamarias, así como, las pacientes con tumores RE α negativas presentan menor sobrevida. Similar a estudios que describen una disminución en la expresión del receptor de estrógenos con el aumento en el grado de malignidad (Goldhirsch *et al.*, 2013). Investigadores han afirmado que estimulación o diferencias en la expresión de RE influye en el comportamiento de las neoplasias mamarias en perras (Ferreira *et al.*, 2009).

La sobreexpresión del anticuerpo erbB2 es alta en tumores benignos menores a dos centímetros, por lo que inferimos que este biomarcador está relacionado con estadios tempranos de la enfermedad, dado que también se observó una tendencia a perder su expresión en tumores de estadios avanzados. El erbB2 es un indicador de proliferación celular y su expresión puede jugar un rol en la carcinogénesis temprana en los adenomas mamarios que sobre-expresan el receptor y ser reflejo de su potencial de malignidad (Campone *et al.*, 2003).

El aumento de la proliferación celular, expresada a través del índice ki67, es una característica que define neoplasias mamarias malignas. Esto ha sido corroborado en el presente estudio donde la expresión del anticuerpo ki67 se encuentra claramente incrementado en las neoplasias malignas, además de ser proporcional al tamaño del tumor e inversamente proporcional con la expresión del RE α . Coincidiendo con lo reportado en mujeres, donde a pesar de que su uso no se ha extendido en la práctica clínica, el ki67 es un marcador de proliferación celular cuya expresión en tumores mamarios se ha relacionado con peor pronóstico y buena respuesta al tratamiento con quimioterapia. El porcentaje de expresión del ki67 es mayor en los tumores con tamaño mayor a 15 mm, grado histológico 3, y que no expresan receptores hormonales (Panal *et al.*, 2014).

Por otra parte, el uso de la clasificación del TMC según el sub-tipo molecular es de utilidad pronóstica y define mejor a las neoplasias malignas. El ki67 y RE α son marcadores pronósticos por excelencia en el TMC, el ki67 es de gran utilidad en la clasificación del subtipo molecular, donde permite discriminar entre los subtipos luminal A y B, y en junto con el RE α permite considerar al sub-tipo Luminal erbB2, el cual además de resultar ser uno de los tipos más frecuentes, las expectativas de vida son mejores que el sub-tipo rico en erbB2.

Se evidenció que el TMC es heterogéneo en cuanto a morfología y expresión molecular, por lo que cada carcinoma se debe clasificar morfológicamente y apoyar con el subtipo molecular en cada paciente con fines de

aplicar terapéuticas más adecuada según sea cada caso en particular, de esta forma procurar mejor calidad de vida a las pacientes.

Es bien conocido que el aumento de la probabilidad de desarrollar un tumor está relacionado con la activación de oncogenes y la pérdida de la función de genes supresores de tumor (Narod y Rodríguez, 2011). Así mismo, una mutación heredable influye en la expresión de un gen (Hedenfalk *et al.*, 2001). En el Capítulo IV proponemos que considerando la predisposición racial, el cáncer de mama en perras puede aportar resultados importantes con el fin de entender mejor el desarrollo de la enfermedad en perras y en mujeres.

En el análisis relativo obtenido por PCR tiempo real a partir de TMC, se encontró que la expresión del *BRCA 1* y *2* resulta heterogénea en cada paciente, por lo tanto, teniendo en cuenta el carácter heredo familiar del gen en el desarrollo del cáncer de mama (Jianping *et al.*, 2014), su estudio puede aportar mayor información enfocado en aquellas razas con clara predisposición a la enfermedad, así mismo, correlacionar mutaciones específicas con la expresión del gen puede resultar útil para el pronóstico en paciente veterinarios, a la vez que puede definir las razas más adecuadas como modelo animal para el estudio del cáncer de mama en mujeres.

CONCLUSIONES GENERALES

- Las neoplasias mamarias en perras tienen una alta incidencia en adultas a gerontes; las lesiones benignas y malignas presentan frecuencias similares, con una mayor tendencia hacia las neoplasias malignas en los últimos años.
- Las neoplasias mamarias en perras son un importante problema de salud animal que ejerce cada día mayor demanda y desarrollo de la oncología veterinaria.
- Las perras Cocker presenta riesgo ante el TMC. Las razas más frecuentemente afectadas no siempre son las de mayor riesgo.
- Las perras nulíparas no evidencian mayor riesgo a la enfermedad.
- Con la indiferenciación celular se pierden los RE y la proliferación depende, entre otras, de las vías de proliferación mediadas por Ki67.
- La expresión de erbB2 juega un rol en la carcinogénesis temprana, la sobre-expresión puede estar relacionada con el potencial de malignidad.
- La clasificación molecular es de utilidad en el carcinoma mamario de las perras. El subtipo molecular más frecuente es el Luminal erbB2 y el erbB2.
- El TMC es una enfermedad heterogénea morfológica y biológicamente, por lo que cada paciente debe estudiarse de forma individual.
- El *BRCA 1* se encuentra en regulación negativa, no es un indicador de malignidad en perras Cocker, Mestizas, y Poodle.
- El *BRCA 2* también se encuentra en baja expresión en los TMC de perras Cocker y Mestizas.
- La expresión del *BRCA 1* y *2* resulta heterogéneo en cada tumor, por lo tanto, teniendo en cuenta el carácter heredo familiar del gen en el desarrollo del cáncer de mama, su estudio puede aportar mayor información enfocado en aquellas razas con predisposición a la enfermedad.

REFERENCIAS

1. Andrade F, Figueiroa F, Bersano P, Bissacot D, Rocha N. 2010. Malignant mammary tumor in female dogs: environmental contaminants. *Diagnostic Pathology* 5:45.
2. Garey J, Wolff M: Estrogenic and antiprogestagenic activities of pyrethroid insecticides. *Biochem Biophys Research Commun* 1998, 251:855-859.
3. Campone M, Merlin JL & Fumoleau P. 2003. Role of the combination of trastuzumab in the therapeutic management of cancer of the breast: from preclinical data to clinical application. *Bulletin of Cancer* 90: 614-622.
4. Coffey DS. 2001. Similarities of prostate and breast cancer: evolution, diet, and estrogens. *Urology* 57 (Supplement 4A) 31-38.
5. Consulta Mitofsky, México: Las mascotas en nuestros hogares. Available: <http://consulta.mx/web/index.php/estudios-e-investigaciones/mexico-opina/191-mexico-58-de-los-hogares-tiene-mascotas>. Accessed 16 January 2015
6. Ferreira E, Bertagnolli AC, Cavalcanti MF, Schmitt FC, Cassali GD. 2009. The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Veterinary Comparative Oncology* 7:230–235
7. Goldhirsch, E. P. Winer, A. S. Coates, R. D. Gelber, M. Piccart-Gebhart, H.-J. Senn Panel members. 2013. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Annals of Oncology* 24: 2206–2223.
8. Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, Radmacher M, Bittner M, Simon R, Meltzer P, Gusterson B, Esteller M, Kallioniemi OP, Wilfond B, Borg A, Trent J, Raffeld M, Yakhini Z, Ben-Dor A, Dougherty E, Kononen J, Bubendorf L, Fehrle W, Pittaluga S, Gruvberger S, Loman N, Johannsson O, Olsson H, Sauter G. 2001. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *The New England Journal of Medicine* 22; 344(8):539-48
9. Jianping Lu, Di Wu, Chuanxing Li, Meng Zhou, Dapeng Hao. 2014. Correlation between gene expression and mutator phenotype predicts homologous recombination deficiency and outcome in ovarian cancer. *Journal of Molecular Medicine* Julio. DOI 10.1007/s00109-014-1191-9.

10. Narod SA, Rodríguez A. 2011. Predisposición genética para el cáncer de mama: genes BRCA1 y BRCA2. *Salud Publica de México* 53:420-429.
11. Panal Cusati Mariana, María Herrera de la Muela, David Hardisson Hernaez, Milagros Choqueneira Dionisio, Ana Román Guindo, Francisco Javier de Santiago Garcia. 2014. Correlación entre la expresión de Ki67 con factores clásicos pronósticos y predictivos en el cáncer de mama precoz. *Revista de Senología y Patología Mamaria* 27(4):163---169.
12. Salas Y, Márquez A, Diaz D, Romero L. 2015. Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed During The Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem. *Plos One* 10(5): e0127381.
doi:10.1371/journal.pone.0127381.
13. Sorenmo K. Canine mammary gland tumors. 2003. *Veterinary Clinical Small Animal* 33:573-596.

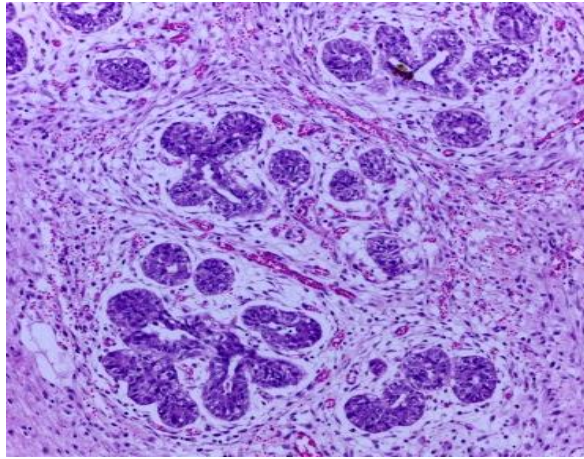
ANEXOS



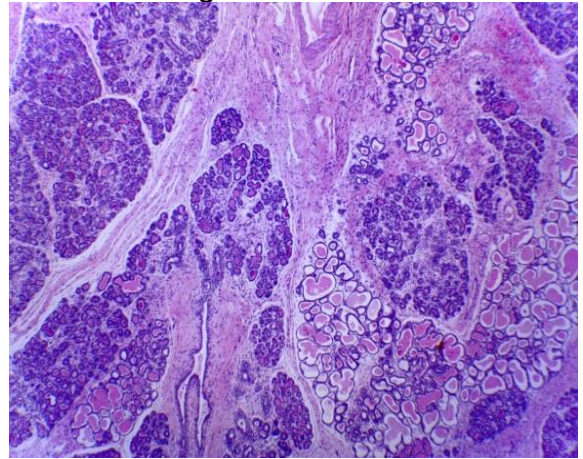
Anexo 1. Glándula mamaria con múltiples masas tumorales de variado tamaño en ambas cadenas mamarias.



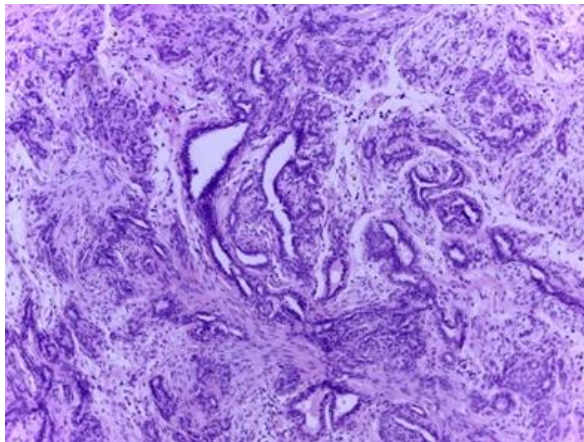
Anexo 2. Glándula mamaria con masa tumoral solitaria en glándula mamaria inguinal caudal.



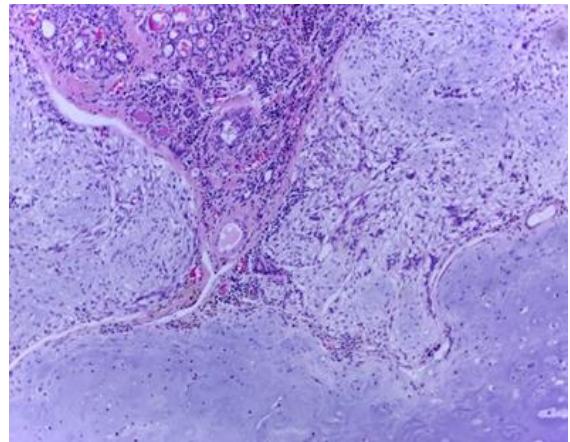
Anexo 3. Tejido mamario normal.
10x H&E



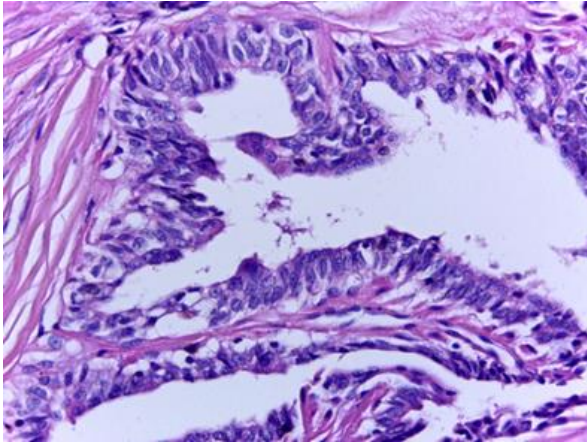
Anexo 4. Adenoma simple.
10x H&E



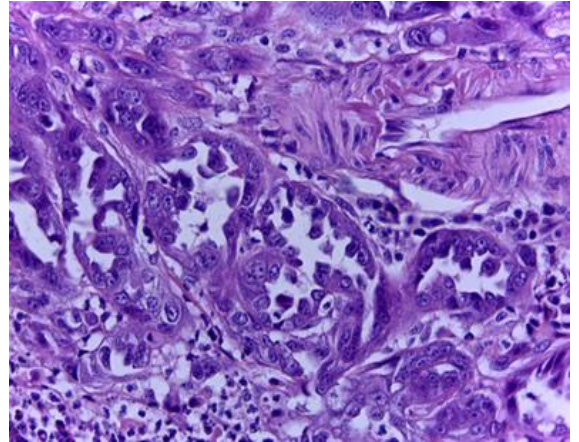
Anexo 5. Adenoma complejo.
10x H&E



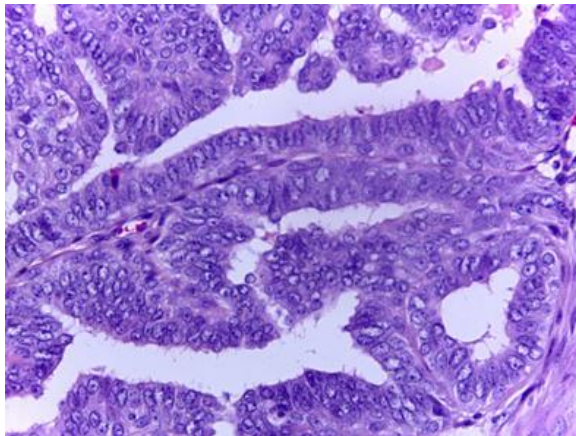
Anexo 6. Tumor mixto benigno.
10x H&E



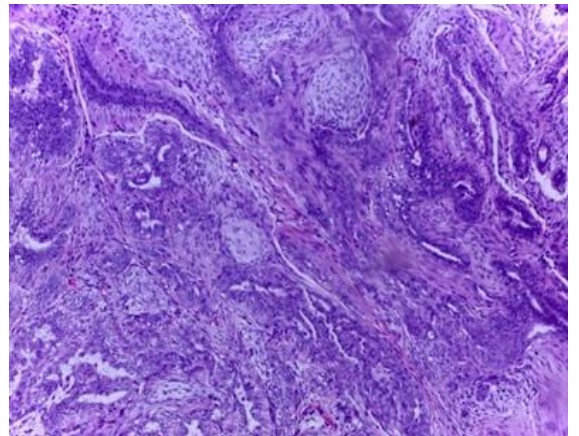
Anexo 7. Adenoma papilar intraductal.
40x H&E



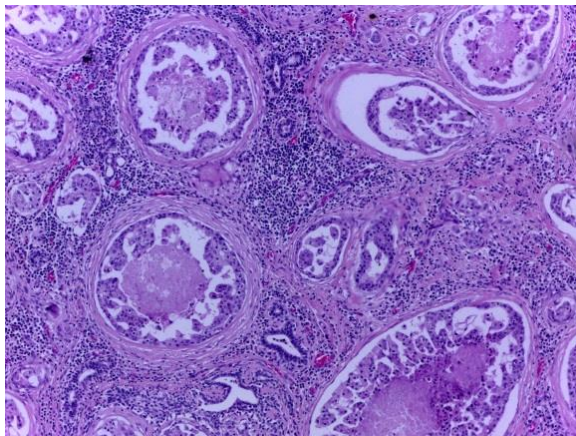
Anexo 8. Carcinoma tubular.
40x H&E



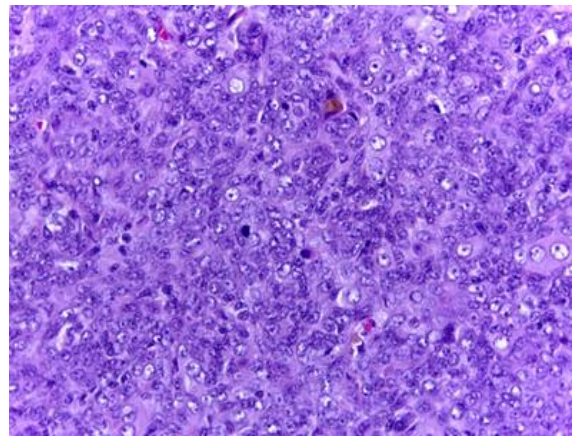
Anexo 9. Carcinoma tubulopapilar.
40x H&E



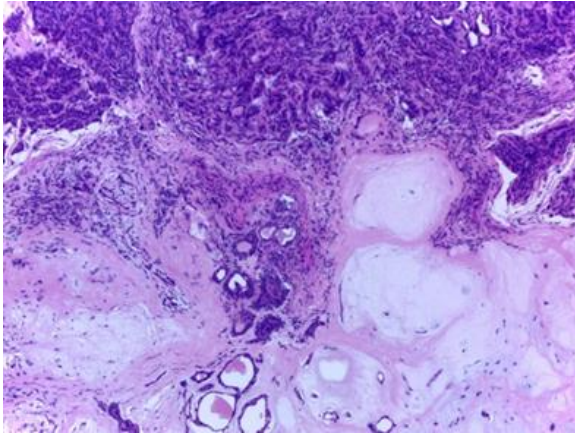
Anexo 10. Carcinoma complejo.
10x H&E



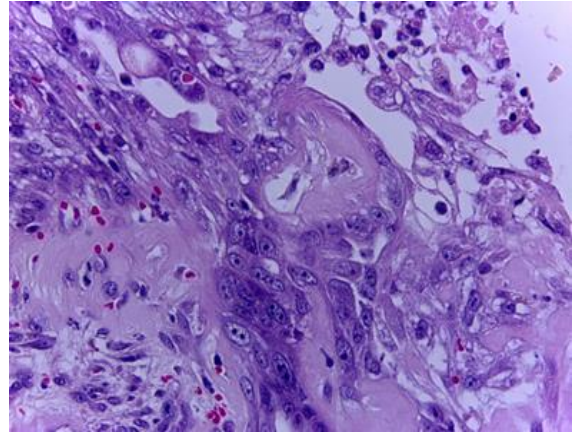
Anexo 11. Comedocarcinoma.
10x H&E



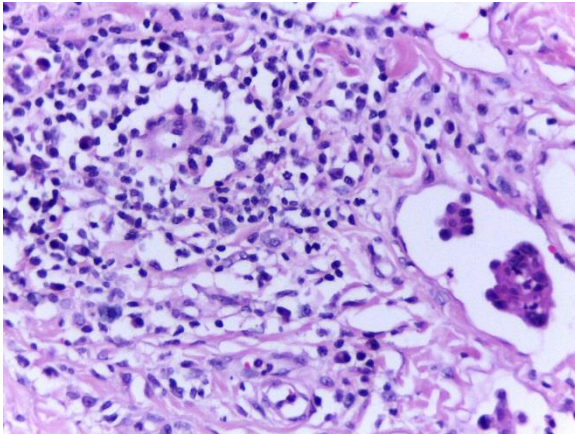
Anexo 12. Carcinoma sólido.
40x H&E



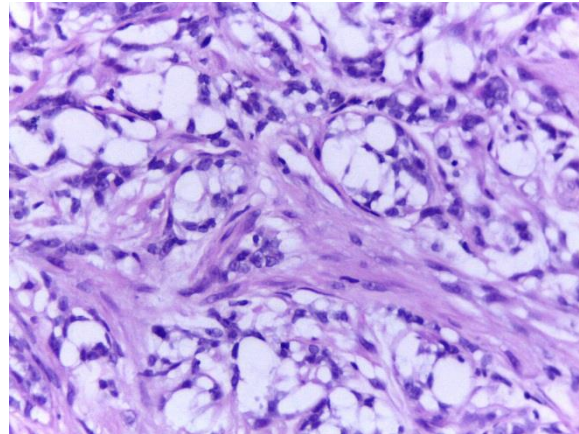
Anexo 13. Carcinoma tipo mixto.
10x H&E



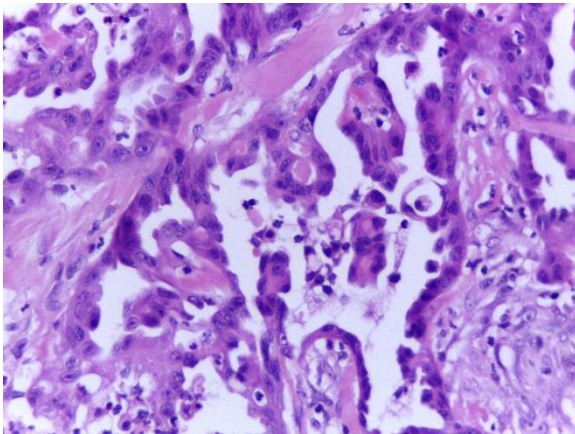
Anexo 14. Carcinosarcoma.
40x H&E



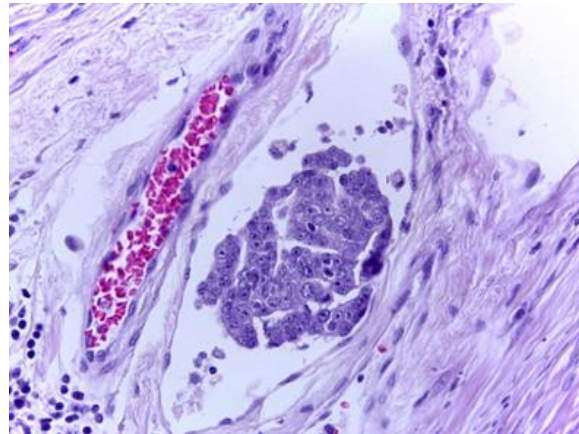
Anexo 15. Carcinoma inflamatorio.
40X. H&E



Anexo 16. Carcinoma rico en lípidos.
40X. E&E



Anexo 17. Carcinoma adenoescamoso.
40X. H&E



Anexo 19. Émbolo neoplásico de un
carcinoma mamario.
40x H&E