



## **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal.

Patología de enfermedades no infecciosas: Oncología

**Yodo molecular y doxorubicina en el cáncer mamario canino:  
Esquemas de administración, calidad de vida y respuesta molecular.**

### **TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL  
PRESENTA:**

Xochitl Zambrano Estrada

### **TUTOR PRINCIPAL:**

Carmen Yolanda Aceves Velasco / Instituto de Neurobiología-UNAM

### **MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

María Ofelia Mora Izaguirre /Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán -UNAM

Elizabeth Morales Salinas/ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM



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.

El presente estudio se realizó en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo la dirección de la Dra. Carmen Yolanda Aceves Velasco y con la valiosa colaboración del Hospital Veterinario de Pequeñas Especies – FESC/UNAM, Clínica Veterinaria Privada “Centro Médico Veterinario” y Hospital Veterinario de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Estudio financiado con fondos del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica: PAPIIT-200813, 209717 y 201516 así como del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología: CONACYT: 23596.

Quien suscribe la presente, recibió apoyo económico mediante la beca nacional del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT: 356685.

## Dedicatoria

---

Dedico este logro a mi querida familia, en especial  
a mis amados e incondicionales padres.

## Agradecimientos

---

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por permitirme alcanzar mis metas profesionales.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal por darme la oportunidad de esta interesante experiencia en el conocimiento y por estar presente en todo momento durante el proceso de mis estudios.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por los apoyos financieros brindados.

A la Doctora Carmen Yolanda Aceves Velasco, un agradecimiento especial e infinito por su apoyo y asesoría en la dirección de esta investigación, pero sobre todo por su calidez humana.

Agradezco profundamente a los integrantes de mi comité tutorial, Dra. Ofelia Mora Izaguirre y Dra. Elizabeth Morales Salinas, a los integrantes de mi jurado Dr. Luis Ocampo Camperos, Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez y Dr. Marco Antonio de Paz Campos por las observaciones y conocimientos aportados.

A la Doctora Brenda Anguiano por escucharme, por sus consejos y los valiosos comentarios en la realización de esta investigación.

A Guadalupe Delgado, Alexander Bontempo, Evangelina Delgado, Brenda Ugalde Villanueva, María Juana Cárdenas, Maarten C. Anthey Werdler, Elsa N. Hernández Ríos y Carlos Lozano Ugalde por la asistencia técnica; Lourdes Lara por el apoyo académico; Alberto Lara, Omar González, Ramón Martínez y Sandra Hernández por la asistencia informática y Jessica González Norris por la corrección de estilo de textos en inglés.

Al Hospital Veterinario de Pequeñas Especies de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM, por su valiosa colaboración: al Dr. Marco Antonio De Paz Campos y MVZ. Esp. Gerardo A. Hernández por la asesoría médica; al M en C. Carlos I. Rangel Rodríguez, MMVZ. Patricia Rizo Espinosa y Maresa López Montañón en la realización de los análisis clínicos; a MVZ. Silvia Cantarell González en los estudios ultrasonográficos; a los Médicos Veterinarios Miguel Ibarra Mendoza, David Ramírez Martínez, Alfonso Zabre Santamaria y Felipe Morales Cabral por su apoyo en los procedimientos quirúrgicos de mastectomía; a los estudiantes de servicio social y estancia Arturo Medina Sánchez, Vania Anik González Escobar, Amed Gutiérrez Delgado, Daniel Ortega Soto, Sergio Echeverría Flores, Pavel Mendiola Bello, Alfredo Morales Moreno,

Diego Núñez Utrilla y José Eduardo Novelo Robles por su disposición en el manejo clínico. Un especial e infinito agradecimiento a Brianda Landaverde Quiroz y Andrés Dueñas Bocanegra por su disposición, dedicación y entusiasmo durante esta etapa de la investigación.

Al Médico Veterinario Benjamín Solorio Perusquia en el Centro Médico Veterinario, por el apoyo en los procedimientos quirúrgicos de biopsia y mastectomía, asesoría médica, atención clínica a las pacientes y por la vocación y amor mostrada a cada una de ellas.

En el Hospital Veterinario de Pequeñas Especies de la Universidad Autónoma de Querétaro, a la Dra. Verónica Andrade por abrirnos las puertas del hospital y permitirnos llevar a cabo esta investigación; al MVZ. Trejo Mandujano Manuel y M en C. Laura Pérez Guerrero por la asesoría médica, procedimientos quirúrgicos y atención clínica a las pacientes; a los estudiantes de servicio social y estancia José A. Aubert Sanabria, Nallely Pulido Martínez, Melannie Palizada Luna, Angélica Guzmán Bedolla, Alexander García Villar y Juan Carlos Pereida por el entusiasmo y disposición mostrados en los procedimientos clínicos y seguimiento de las pacientes.

Agradezco a los propietarios de las pacientes por el amor y lealtad mostrada a sus perritas y por permitirnos abrir una ventana al conocimiento.

Al Dr. Félix Sánchez Godoy, gran profesionalista, amigo y maestro, por inspirarme con su ejemplo.

Al Ing. Carlos Iniestra Becerril por su amistad, presencia y apoyo incondicional en todo momento, mi agradecimiento infinito y eterno de todo corazón.

A Silvia Angulo, Alexander Bontempo, Maritza Soria, Ana Tusie, Mario Nava, Evangelina Delgado, Carlos Montes de Oca y a todos mis queridos y estupendos compañeros del laboratorio por los buenos momentos compartidos, por su amistad y valioso apoyo durante mi estancia en el Instituto de Neurobiología de la UNAM.

## Resumen

El cáncer mamario canino es un problema de salud veterinario y representa un excelente modelo de carcinogénesis espontánea debido a su similitud con su contraparte humana. El yodo molecular ( $I_2$ ) exhibe efectos apoptóticos y de diferenciación en varias células cancerosas y su administración conjunta con doxorubicina (DOX) previene la quimiorresistencia y la toxicidad cardíaca. El presente estudio analiza el efecto del suplemento dietario de  $I_2$  (10 mg/día) en dos esquemas de administración de DOX (30 mg/m<sup>2</sup>): el esquema tradicional cada 21 días e infusión de 20 min, *versus* un esquema modificado administrado cada 15 días e infusión lenta de 60 min (mDOX) en perras diagnosticadas con cáncer mamario. El esquema mDOX mejoró significativamente la calidad de vida (VCOG-CTCAE) ya que atenuó los efectos secundarios, pero no mostró diferencias en la respuesta tumoral (tamaño, expresión génica). El suplemento de  $I_2$  mostró efectos sinérgicos en la respuesta tumoral en ambos esquemas, disminuyendo el componente epitelial, así como los marcadores de apoptosis (Bax/Bcl2), quimiorresistencia (MDR1 y Survivin) e invasión (uPA). Además, la presencia del yodo se acompañó de una mayor respuesta inmune antitumoral (infiltración linfocítica), y de un aumento en la expresión de los receptores PPAR $\gamma$  siendo estadísticamente significativa en el grupo mDOX+ $I_2$ . La evaluación endocrina evidenció que el consumo de  $I_2$  no altera la función tiroidea ni la expresión y localización tumoral del receptor de estrógenos alfa. El análisis de supervivencia a diez meses mostró que, en comparación con la literatura, el suplemento de  $I_2$  incrementa el periodo libre de enfermedad en un 50% en los pacientes que la recibieron en el periodo posterior de la cirugía y en un 67-73% cuando el suplemento se administró en ambos periodos (durante la quimioterapia y después de la cirugía). En conclusión, la combinación de DOX+ $I_2$  en el esquema modificado ejerce efectos sinérgicos evitando la resistencia a fármacos y la invasión y mejorando considerablemente la calidad de vida del paciente. Proponemos al tratamiento modificado DOX +  $I_2$  como un protocolo eficaz, seguro y susceptible a mejorarse con menores dosis de DOX en el tratamiento del cáncer mamario canino.

**Palabras clave:** Bienestar animal, Cáncer mamario canino, Doxorubicina, Yodo molecular, Quimioterapia neoadyuvante.

## Abstract

Canine mammary cancer is a veterinary health problem and represents an excellent model of spontaneous carcinogenesis due to its similarity with its human counterpart. Molecular iodine ( $I_2$ ) exhibits apoptotic and differentiation effects in several cancer cells and its co-administration with doxorubicin (DOX) prevents chemoresistance and cardiac toxicity. The present study analyzes the effect of the dietary supplement of  $I_2$  (10 mg/day) in two schemes of administration of DOX (30 mg /  $m^2$ ): the traditional scheme every 21 days and infusion of 20 min, *versus* a modified scheme administered every 15 days and slow infusion of 60 min (mDOX) in bitches diagnosed with breast cancer. The mDOX scheme significantly improved the quality of life (VCOG-CTCAE) since it attenuated the side effects but did not show differences in the tumor response (size, gene expression). The  $I_2$  supplement showed synergistic effects on the tumor response in both schemes, decreasing the epithelial component, as well as the markers of apoptosis (Bax/Bcl2), chemoresistance (MDR1 and Survivin) and invasion (uPA). In addition, the presence of iodine was accompanied by a greater antitumor immune response (lymphocytic infiltration), and an increase in the expression of PPAR $\gamma$  receptors, being statistically significant in the mDOX +  $I_2$  group. The endocrine evaluation showed that the consumption of  $I_2$  does not alter the thyroid function nor the tumor expression and localization of the alpha estrogen receptor. The ten-month survival analysis showed that, compared to the literature, the  $I_2$  supplement increases the disease-free period by 50% in patients who received it in the later period of surgery and by 67-73% when the supplement was administered in both periods (during chemotherapy and after surgery). In conclusion, the combination of DOX +  $I_2$  in the modified scheme exerts synergistic effects avoiding drug resistance and invasion and considerably improving the quality of life of the patient. We propose to the modified treatment DOX +  $I_2$  as an effective, safe and susceptible protocol to be improved with lower doses of DOX in the treatment of canine mammary cancer.

**Keywords:** Animal welfare, Canine mammary cancer, Doxorubicin, Molecular iodine, Neoadjuvant chemotherapy.



## Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1. Glándula mamaria normal .....	2
2.2. Cáncer mamario .....	6
2.2.1. Factores de riesgo .....	7
2.2.2. Tratamiento.....	12
2.2.3. Quimioterapia .....	12
2.2.3.1. Protocolos de quimioterapia .....	12
2.3. Doxorrubicina. ....	14
2.3.1. Mecanismo de acción .....	14
2.3.2. Toxicidad. ....	15
2.3.3. Farmacocinética y farmacodinamia .....	16
2.4. Yodo .....	16
2.4.1. Naturaleza del yodo.....	16
2.4.2. El yodo en el ecosistema .....	17
2.4.3. Efectos del yodo en la glándula mamaria .....	17
3. JUSTIFICACIÓN .....	18
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	19
4.1. Hipótesis.....	19
4.2. Objetivo general .....	19
4.3. Objetivos específicos.....	19
5. MATERIAL Y MÉTODOS .....	19
5.1. Lugar de estudio.....	19
5.2. Población de estudio .....	20
5.3. Evaluación de la salud.....	20
5.4. Protocolos quimioterapéuticos.....	23
5.5. Evaluación anatomopatológica.....	23
5.6. Clasificación molecular de los tumores .....	24

5.7. Expresión génica .....	25
5.8. Análisis estadístico .....	26
6. RESULTADOS .....	26
7. DISCUSIÓN.....	41
8. CONCLUSIONES.....	45
9. REFERENCIAS.....	46
10. ANEXOS.....	54

## **Lista de Cuadros**

Cuadro 1 Oligonucleotidos

Cuadro 2. Características clínicas de las pacientes

Cuadro 3. Efectos adversos (VCOG-CTCAE).

Cuadro 4 Análisis de sobrevida

## **Lista de figuras**

Figura 1. Desarrollo de la glándula mamaria

Figura 2. Características histológicas y expresión del receptor de estrógeno  $\alpha$  (RE), receptor de progesterona (RP) y de proliferación (ki67) en glándula mamaria canina durante el ciclo estral

Figura 3. Glándula mamaria canina en lactación temprana

Figura 4. Irrigación y drenaje linfático de la glándula mamaria del perro

Figura 5. Estructura del complejo Doxorubicina-ADN.

Figura 6. Antraciclinas, blancos celulares y efecto fisiopatológico

Figura 7. Valor funcional (escala VCOG-CTCAE)

Figura 8. Ingestión de yodo, estado tiroideo y daño cardíaco durante los tratamientos

Figura 9. Perfil electrocardiográfico

Figura 10. Caracterización histopatológica de los tipos de tumor en las pacientes

Figura 11 Tamaño residual del tumor (%)

Figura 12 Proporción de tejido epitelial y conectivo (%) en el tejido residual del tumor.

Figura 13 Efecto de los tratamientos en la infiltración linfocítica

Figura 14 Localización celular del receptor de Estrógeno  $\alpha$

Figura 15 Análisis de genes de referencia

Figura 16 Efecto de los tratamientos sobre la expresión de marcadores de quimiorresistencia, invasión y diferenciación

## Abreviaturas y siglas

ABC	Área bajo la curva
ABCB1	ATP-binding cassette sub-family B member 1
ACAD	Aspiración con Aguja Delgada
BRCA	Breast cancer
CMC	Cáncer Mamario Canino
DOX	Doxorrubicina
DOXm	Esquema modificado
DOXs	Esquema estándar
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
Her2/ErbB2	Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
H&E	Hematoxilina y eosina
MDR1	Multidrug resistance protein 1
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido deshidrogenasa
deshidrogenasa	
OSH	Ovario-salpingo-histerectomía
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPAR $\gamma$	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
RE $\alpha$	Receptor de estrógeno alfa
Sur	Survivina
TMC	Tumores Mamaros Caninos
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor - $\alpha$
uPA	urokinase-type plasminogen activator
VCOG-CTCAE	Veterinary cooperative oncology group – common terminology criteria for adverse events
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
I <sub>2</sub>	Yodo Molecular

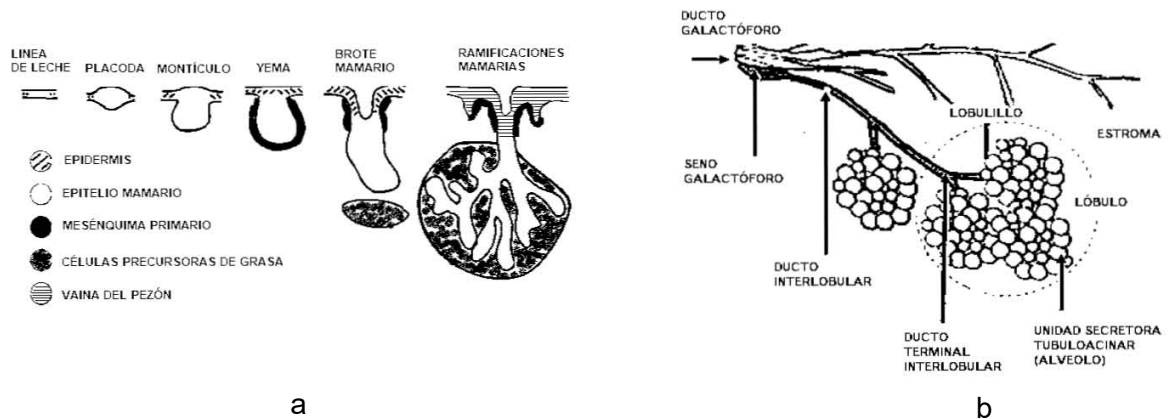
## 1. INTRODUCCIÓN

Los tumores mamarios caninos (TMC) tienen una incidencia de 200 por cada 100,000 individuos, entre el 50 y 70% son malignos. Al igual que en el humano, la gran mayoría (86.4%) son de origen epitelial. El tratamiento estándar para la mayoría de los TMC es la cirugía y la ovario-salpingo histerectomía (OSH), sin embargo, en un porcentaje muy alto (58% y 36% respectivamente) se presentan recidivas por lo que se hace necesario el uso de la quimioterapia. Las antraciclinas y en particular la Doxorubicina (DOX) es el quimioterapéutico de primera elección tanto en medicina humana como en medicina veterinaria debido a su eficacia y bajo costo. Sin embargo, el rápido desarrollo de toxicidad y quimiorresistencia han limitado su uso como monoterapia. Con el interés de potenciar los efectos antineoplásicos y disminuir los efectos secundarios de los quimioterapéuticos, se han desarrollado diversas estrategias. Una de las más utilizadas es disminuir la velocidad de infusión (de minutos a horas) que alarga la fase de distribución generando una mayor área bajo la curva y reduciendo efectos tóxicos. Una segunda estrategia, más representada en los estudios caninos, es el uso de fármacos quimioterapéuticos en diferentes esquemas o presentaciones farmacéuticas (terapia metronómica, liposomas, nanopartículas) o bien en coadyuvancia con moléculas específicas que actúan como inhibidores de los receptores del factor de crecimiento (toceranib fosfato), con componentes que exacerbaban las respuestas antitumorales inmunes (anti Her2, TNF $\alpha$ ) o incluso con productos naturales con actividad antitumoral (melatonina, curcumina o yodo). Específicamente se ha mostrado que el suplemento de yodo molecular (I<sub>2</sub>), potencia el efecto citotóxico de DOX, evitando la quimiorresistencia y disminuyendo significativamente los efectos tóxicos. En este trabajo se compara el efecto del I<sub>2</sub> en dos esquemas de administración de DOX. El esquema convencional y el esquema modificado que combina un mayor tiempo de infusión y un menor intervalo de administración en hembras caninas intactas. Nuestros resultados muestran que el esquema modificado es menos tóxico y que el suplemento de I<sub>2</sub> incrementa la eficacia antineoplásica (apoptosis, activación inmune y anti-quimiorresistencia) y el periodo libre de enfermedad mejorando considerablemente la calidad de vida del paciente.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA.

### 2.1. Glándula mamaria normal

La glándula mamaria es una glándula apocrina modificada con la función de sintetizar y secretar leche para la nutrición del neonato de todos los mamíferos. Su crecimiento y desarrollo varía en el tiempo y depende del estado fisiológico de la hembra. Desde la vida embrionaria se reconocen dos engrosamientos ectodérmicos paralelos a la línea media ventral (líneas de leche); estas células, se acumulan e invaginan para formar brotes mamarios en respuesta a la influencia inductiva del mesénquima. En cada brote mamario, se desarrolla un lumen y ramificaciones que se comunican externamente a través de una región de epitelio especializado conocido como la vaina del pezón. Dependiendo de la especie, se desarrollarán de dos a dieciséis unidades mamarias (Figura 1) (Voutilainen, 2015).



**Figura 1. Desarrollo de la glándula mamaria.** a) Etapa embrionaria/prepuberal y b) Etapa adulta. Modificado de Voutilainen, 2015.

Cada pezón tiene entre seis y dieciséis aberturas de los conductos, y cada uno de estos conductos eventualmente formarán lóbulos y lobulillos: este sistema de conductos inicia en el pezón y finalizan en el alveolo o acino (unidad funcional), el cual está revestido por células epiteliales con función secretora y rodeado por células mioepiteliales contráctiles. El tejido conectivo estromal soporta los lóbulos, los capilares sanguíneos y tejido adiposo. La mayoría de los perros desarrollan cinco pares de glándulas mamarias, dos torácicas (M1,

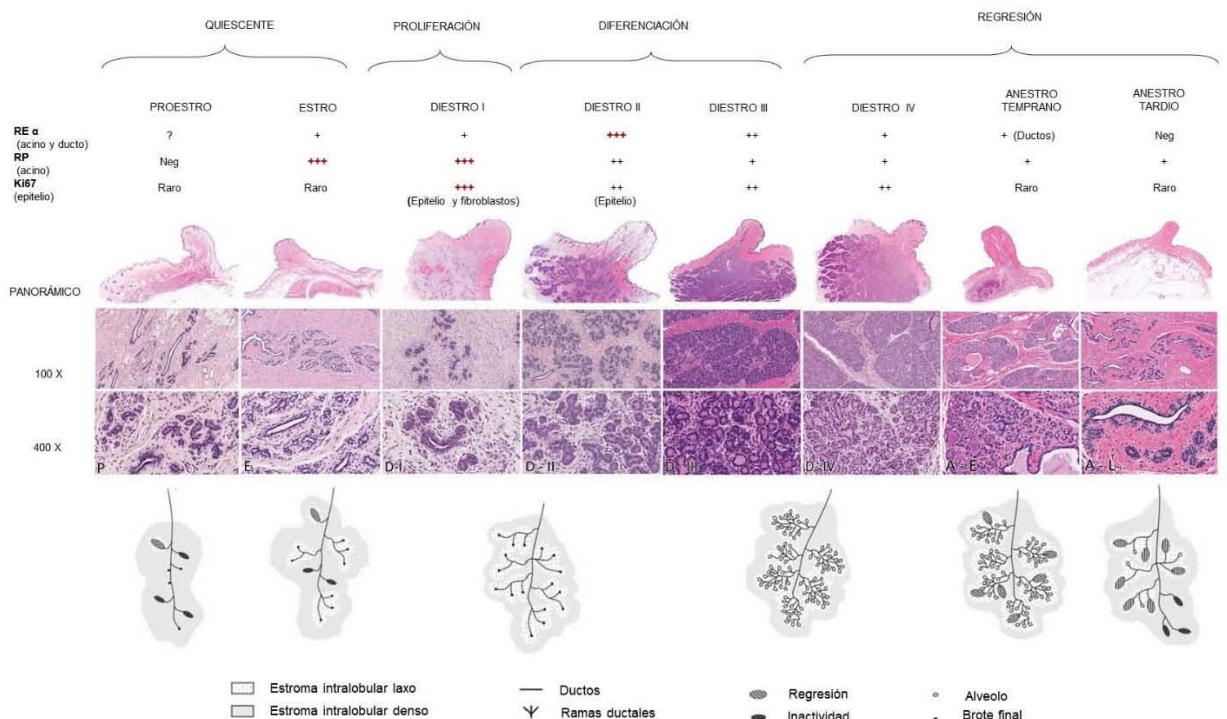
craneal y M2, caudal), dos abdominales (M3, craneal y M4, caudal) y uno inguinal (M5) (Sorenmo *et al.*, 2011).

En perras prepúberes, solo se observan ductos interlobulares revestidos por una doble capa de células epiteliales y una capa continua de células mioepiteliales y rodeados de un estroma de tejido conectivo denso. En el extremo terminal se proyectan brotes epiteliales (células cohesivas, núcleos eucromáticos, 1-2 nucléolos prominentes y bordes celulares indistintos) (Sorenmo *et al.*, 2011).

Los cambios morfológicos durante el ciclo estral constan de cuatro etapas: quiescente o inactiva, proliferación, diferenciación y regresión. **En anestro tardío, proestro y estro la glándula mamaria es quiescente**, es decir, con abundante tejido interlobular y pequeños alveolos revestidos por epitelio plano o cúbico simple con vacuolas intra-citoplásmicas y en el lumen y tejido conectivo, macrófagos con lipofuscina (Chandra *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010).

**La proliferación, diferenciación, y regresión ocurren durante la fase de diestro.** En el diestro, son evidentes cuatro etapas morfológicamente distintas: en la **fase I** existe proliferación ductal y estroma exuberante mucinoso que es cuando se observan niveles de progesterona altos; en la **fase II**, presenta desarrollo lobular temprano, con ductos revestidos por una sola capa de epitelio cuboidal bajo a aplanado y una capa continua de células mioepiteliales, además de proliferación alveolar en donde las células mioepiteliales forman una capa continua alrededor de los alvéolos menos desarrollados y una capa discontinua alrededor de los alvéolos desarrollados y distendidos el estroma intralobular es mínimo; en la **fase III**, presenta abundante tejido glandular con grandes lóbulos conteniendo material secretor mientras que en **fase IV** tiene características de regresión temprana, con incremento en el tejido conectivo interlobular. En **anestro temprano**, los ductos están distendidos, y con regresión de los alvéolos (células epiteliales vacuoladas) e incremento del tejido conectivo intralobular, así como infiltración de linfocitos y células plasmáticas. Por otro lado, en **anestro tardío** la regresión es completa, el lumen de los ductos disminuye de diámetro y los lóbulos disminuyen en tamaño; las células con núcleos picnóticos son frecuentes en ductos y alveolos. El tejido conectivo intra e interlobular es abundante y maduro y puede tener infiltración por linfocitos, células plasmáticas y macrófagos conteniendo lipofuscina.

Los cambios morfológicos responden a esteroides ováricos que correlacionan positivamente con sus receptores en el tejido mamario; el receptor de progesterona por ejemplo se encuentra significativamente expresado en el estro y diestro temprano y, el receptor de estrógeno en diestro II; el marcador de proliferación ki-67 fue más alto en diestro I, seguido de diestro II (Figura 2) (Chandra *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010).



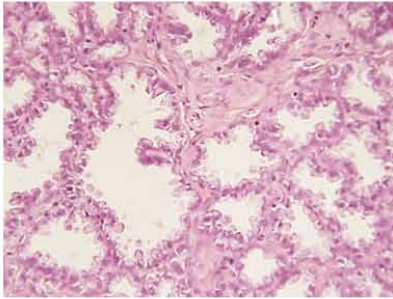
**Figura 2. Características histológicas y expresión del receptor de estrógeno  $\alpha$  (RE), receptor de progesterona (RP) y de proliferación (ki67) en glándula mamaria canina durante el ciclo estral.** Adaptado de Chandra *et al.*, 2010 y Santos *et al.*, 2009. Expresión leve (+); moderada (++); alta (+++).

En la gestación, los altos niveles de progesterona inducen el alargamiento y ramificación terciaria del sistema ductal de los lóbulos. Los conductos dan lugar a múltiples lóbulos y alvéolos; la célula alveolar pre-secretoria cambia a una célula alveolar secretora (Sorenmo *et al.*, 2011).

Por otra parte, durante de lactación temprana e intermedia, los alvéolos están bien desarrollados y distendidos, son esféricos a ovoides, rodeados de escasa cantidad en tejido conectivo (Figura 3). En la lactación tardía, el tejido conectivo es abundante y denso, los



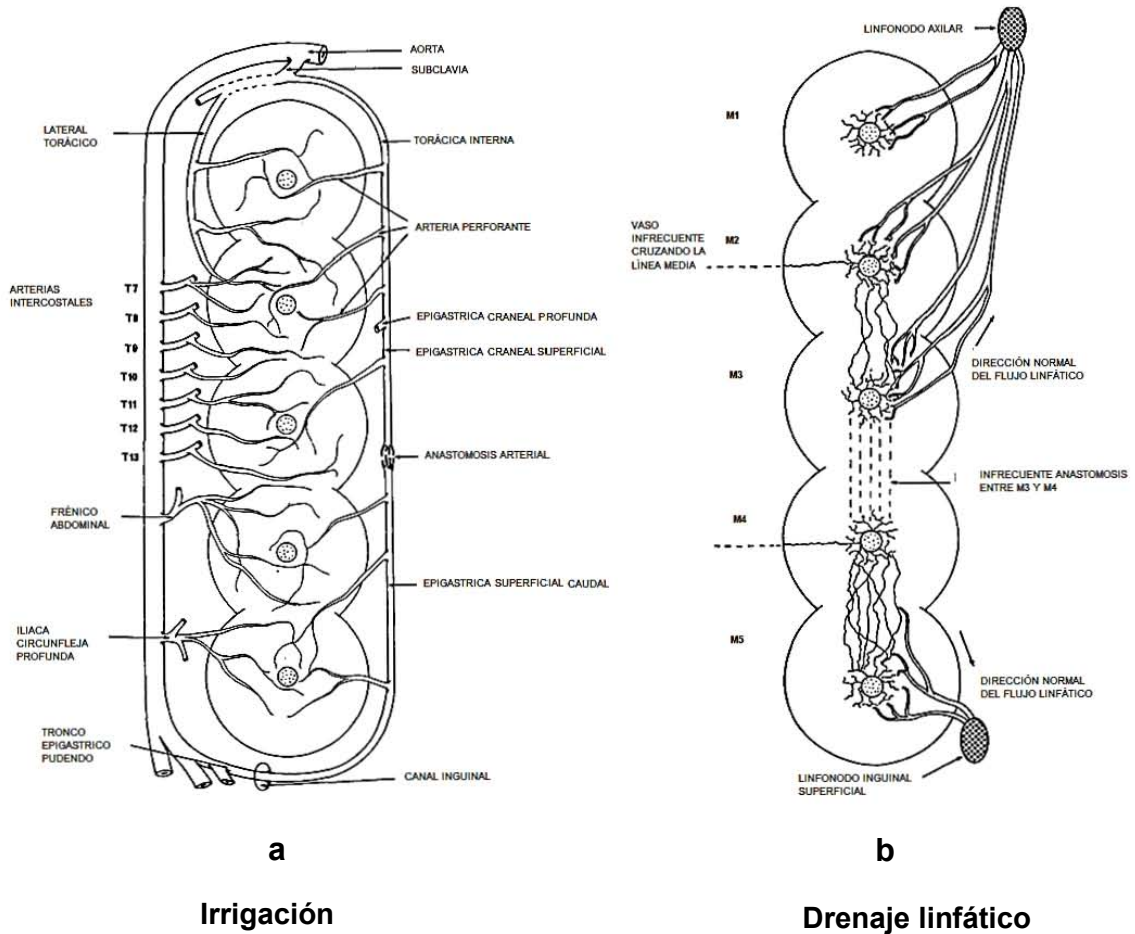
alvéolos son de forma irregular y colapsados; el número de alveolos por lóbulo y el número de células epiteliales por alveolo así como el diámetro del alveolo y la altura de las células epiteliales disminuyen a medida que la lactación progresa con una involución completa hasta el final del tercer mes, se observan también abundantes células inflamatorias (Orfanou *et al.*, 2010).



**Figura 3. Glándula mamaria en lactación temprana. Hematoxilina y eosina, 400X.** Se observa escaso tejido conectivo intralobular y alveolos distendidos.

Es importante considerar los aspectos anatómicos de la glándula mamaria, en el sentido de irrigación y drenaje linfático, trascendentales en la determinación de metástasis o complicaciones posquirúrgicas (linfedema). Las glándulas mamarias M1 y M2 reciben riego sanguíneo de arterias torácicas internas, las torácicas intercostales y laterales también pueden contribuir; la M3 por la arteria epigástrica superficial craneal y ramas de arteria intercostales y, M4-M5 por arteria epigástrica superficial caudal (rama de la arteria pudenda externa) y se refuerza lateralmente por ramas de arteria frénico-abdominales y la ílica circunfleja profunda. Las dos arterias epigástricas se anastomosan alrededor del ombligo; algunos vasos pueden cruzar la línea media desde una glándula hasta su par (Figura 4).

Por otra parte, cada glándula tiene su propio plexo de canales linfáticos que anastomosan y rodean la base del pezón integrándose así en el parénquima, subcutis y pezón. Los vasos linfáticos de M1 y M2 usualmente drenan a linfonodos axilares ipsilaterales y linfonodos esternales, M3 usualmente drena a linfonodos inguinales superficiales e ipsilaterales axilares pero algunas veces sólo a linfonodos ipsilaterales axilares. M4 usualmente drena a linfonodos inguinales superficiales ipsilaterales y es raro que sea simultáneo con los linfonodos axilares ipsilaterales. M5, usualmente drena a linfonodos superficiales inguinales ipsilaterales y raramente drena a linfonodos poplíteos ipsilaterales (Figura 4) (Patsikas and Dessiris, 1996; Patsikas *et al.*, 2006).



**Figura 4. Irrigación y drenaje linfático de la glándula mamaria del perro (Silver, 1966) .**

La glándula mamaria M1 está inervada por ramas cutáneas laterales de la cuarta, quinta y sexta ramas ventrales del nervio torácico (intercostal), M2 de ramas ventrales del sexto y séptimo nervio torácico; M3, M4 y M5 por el nervio genitofemoral y las ramas cutáneas ventrales de los tres primeros nervios lumbares: iliohipogástrico craneal, iliohipogástrico caudal e ilioinguinal. Las fibras simpáticas acompañan a los vasos sanguíneos a las mamas. Además de estar sujeto al control nervioso, la secreción de las glándulas mamarias está influenciada por las hormonas de la hipófisis y otros órganos, que la sangre les aporta (Evans and Lahunta, 2013) .

## **2.2. Cáncer mamario**

Los tumores de glándula mamaria representan aproximadamente el 42% de todos los tumores en hembras adultas intactas (Reif, 2007; Salas *et al.*, 2015), de estos, entre el 50

y 70% corresponden a tumores malignos (Klopfleisch *et al.*, 2011; Sleenckx *et al.*, 2011; Salas *et al.*, 2015). El cáncer mamario canino, no solo es frecuente, sino que representa un grave problema de salud en el ámbito veterinario debido a la alta reincidencia y al riesgo elevado de metástasis (Stratmann *et al.*, 2008; Betz *et al.*, 2012).

El cáncer mamario canino se caracteriza por presentar múltiples nódulos que generalmente afectan las glándulas abdominales e inguinales (35.29% y 56.86% respectivamente) (Misdorp, 2002; Sontas *et al.*, 2009; Sleenckx *et al.*, 2011).

Los indicadores epidemiológicos en México muestran que la mayoría de los tumores malignos son de origen epitelial y mixto ( $56.8 \pm 9.7$  y  $36.2 \pm 9.1$  respectivamente). Los tipos histológicos de origen epitelial y sus frecuencias relativas observadas fueron carcinoma simple tubular (20.1%), carcinoma simple papilar (14.9%), carcinoma sólido (8.7%), carcinoma anaplásico (4.6%), carcinoma quístico papilar (1.8%), otros tipos 5.4%, mientras que de los tumores mixtos el carcinoma complejo tuvo una frecuencia del 21.0% y carcinosarcoma 16.4% y los de origen mesenquimal el 7% (Salas *et al.*, 2015).

El tamaño puede variar desde unos cuantos milímetros hasta 10-20 cm. Macroscópicamente, los carcinomas son lobulados, firmes, infiltrativos, ulcerados y/o con necrosis central, pero también se encuentran los carcinomas *in situ*, que son multicéntricos y usualmente no visibles (Sleenckx *et al.*, 2011; Gupta *et al.*, 2012).

El estadio clínico está determinado por el tamaño del tumor (T), linfonodos afectados (L) y metástasis (M). Las etapas I, II y III se encuentran solo en la glándula mamaria y difieren entre ellas por el tamaño del tumor (< a 3 cm, 3-5 cm o > a 5 cm respectivamente). En el estadio IV se encuentran afectados además los linfonodos y, en el estadio V además de los linfonodos existe metástasis a órganos internos. Las células migran desde los vasos linfáticos a los linfonodos regionales y pulmones (Lana, 2007; Sleenckx *et al.*, 2011).

### **2.2.1. Factores de riesgo**

Como sucede en humanos, la información que existe en caninos sobre los mecanismos y moléculas que contribuyen a la iniciación, promoción y progresión del cáncer mamario es escaso (Klopfleisch *et al.*, 2011). Diferentes factores de riesgo se han asociado a su

incidencia como la edad, raza, factores heredables y genéticos, hormonas, dieta, obesidad, factores de crecimiento y expresión de ciclooxigenasa-2 (Sleeckx *et al.*, 2011).

*Edad.* Los tumores malignos se presentan comúnmente en hembras de mayor edad (promedio, 9.5 años), aunque existen casos raros antes de los 5 años (Sleeckx *et al.*, 2011). Algunas hipótesis relacionadas con esto es el acortamiento de los telómeros, cambios epigenéticos durante el proceso de transcripción, daño al DNA e incremento en el grado de mutación en células somáticas, sin embargo en caninos existen escasos reportes o los resultados no son contundentes (Lee *et al.*, 2004; Zavlaris *et al.*, 2009; Lutful *et al.*, 2015; Seluanov *et al.*, 2018). Un aspecto a explorar serían los elementos que tienen que ver con los mecanismos moleculares de la selección natural sobre de la resistencia al cáncer, como sucede con algunos mamíferos de larga vida (Seluanov *et al.*, 2018).

*Raza.* Diversos estudios demuestran la susceptibilidad de las razas puras. Las razas que están afectadas varían según los diferentes estudios y ubicaciones geográficas; se conoce que los Poodles (Toy y miniatura), Spaniels (Springer inglés y Cocker), Puli, Setter Inglés, Pointer, Pastor Alemán, Maltés, Yorkshire terrier y Dachshund están predispuestos (Dobson, 2013). En México se ha informado que la raza Poodle, Cocker Spaniel y Pastor Alemán son las más afectadas (Salas *et al.*, 2015). La limitada variabilidad genética debido a la selección de la raza ha demostrado aumentar el riesgo de presentar cáncer mamario (Dobson, 2013), la domesticación de las poblaciones de lobos salvajes a caninos ha resultado en una pérdida del 5% de la diversidad de nucleótidos mientras que la selección de raza el 35%. No obstante lo anterior, es precisamente que la presentación de ciertos tipos de cáncer en algunas razas abre una ventana para su estudio (Dobson, 2013; Kim *et al.*, 2016; Komazawa *et al.*, 2016).

*Factores heredables y genéticos.* El análisis de genes asociados al cáncer, así como los mecanismos moleculares que puedan estar implicados se ven favorecidos en el modelo canino debido a la disminuida variabilidad de genes por la selección de raza y a que existe una fuerte correlación genética entre cáncer mamario canino y su contraparte humana (Dobson, 2013). Sin embargo, la información de estudios más amplios sobre la existencia, frecuencia e importancia de las mutaciones en la línea germinal y/o genes involucrados en el riesgo de desarrollar tumores mamaros en perros es escasa (Rivera and von Euler, 2011).

En una gran población de perras Shih Tzu, los genes de susceptibilidad al cáncer de mama BCR1 y BCR2 están sobre-expresados y se acompañan de fenotipos RE negativo, RP negativo y triple negativo (Im *et al.*, 2013); las proteínas nucleares también se sobre-expresan en linfonodos sugiriendo su participación en la progresión del tumor (Matos, 2015). Otra publicación en perros de raza Springer spaniel inglés, corrobora la asociación de genes heredables con la presencia de tumores mamarios. Hasta el momento, no se han caracterizado las mutaciones puntuales ni el mecanismo de carcinogénesis para los genes candidatos de BCR1 y BCR2 (Sleeckx *et al.*, 2011; Matos, 2015).

Con respecto a otros genes, se ha informado que una proporción variable de tumores mamarios caninos contiene mutaciones en TP53. Un estudio comparativo de la expresión génica entre cáncer mamario humano y canino mostró una superposición significativa de genes desregulados entre los que se incluye: ruta P13/AKT (sobre regulado), KRAS (sobre regulado), PTEN (baja regulación), WNT-beta catenina (sobre regulado), cascada de MAPK (sobre regulado), BCR1 (baja regulación), BCR2 (sobre regulado) y p53 (baja regulación) (Uva *et al.*, 2009; Dobson, 2013).

En cuanto a las ciclinas que regulan el ciclo celular, en humanos existen alteraciones en más del 90% y se correlacionan con aspectos clínicos, mientras que en perros solo la ciclina A es positiva por inmunohistoquímica en el 50% de los tumores mamarios malignos con respecto a los benignos. La expresión desregulada de ciclina D1 sugiere ser importante en la carcinogénesis temprana y limitada de la progresión tumoral (Matos, 2015).

Por otra parte, se ha demostrado la participación TP53, p21 y p27 en la incidencia tumoral, además de una asociación entre pérdida de expresión de p21 y metástasis tumoral (Rivera *et al.*, 2011).

En el caso de TGF $\beta$ 3, TGF $\beta$ 3 y proteína de unión al factor de crecimiento transformante latente B4 (LTBP4), disminuyó en carcinomas y metástasis, mientras que la expresión de LTBP1 aumentó. La pérdida de expresión de TGF $\beta$ 3 y LTBP4 puede tener efectos estimulantes del crecimiento en tumores en etapa tardía; aunado a la expresión reducida de TGF $\beta$ 3, puede estar asociada con una mayor actividad proliferativa de tumores mamarios caninos, similar a los hallazgos en cáncer mamario humano (Rivera *et al.*, 2011).

HEPACAM1 y HEPACAM2 parecen ser importantes para la adhesión célula-célula de las células mamarias caninas normales y neoplásicas. Sin embargo, el papel de HEPACAM1 como supresor tumoral en etapas tardías de transformación maligna ha sido cuestionado debido a la pérdida de su expresión en adenomas, pero no en carcinomas. Se ha sugerido que esta proteína podría estar más bien involucrada en procesos de metástasis (*Rivera et al.*, 2011).

El oncogén HER-2, activa varias vías de señalización tumoral. Su presencia ha sido demostrada tanto en tejidos mamarios normales como en tumorales. Su sobreexpresión ha sido correlacionada positivamente con el grado de malignidad tumoral, invasión a linfática e índice mitótico. Sin embargo, no parece estar asociado con el pronóstico o tiende a asociarse con mayores tasas de supervivencia (*Rivera et al.*, 2011; *Matos*, 2015).

COX-2 en humanos actúa a través de PGE para inhibir la apoptosis, promover la proliferación celular, estimular la angiogénesis y disminuir la inmunidad. En perros, se ha descrito una correlación significativa entre sobreexpresión de COX-2 y una mayor agresividad histológica, y una fuerte asociación con la sobreexpresión de VEGF y densidad de vasos sanguíneos (*Doré*, 2011; *Queiroga et al.*, 2011; *Queiroga*, 2013).

*Hormonas.* Los tumores mamarios caninos al igual que los humanos son responsivos a esteroides ováricos. En ambas especies, estimulan el crecimiento del tejido mamario normal en condiciones fisiológicas, pero su efecto proliferativo en el epitelio puede crear condiciones para la proliferación neoplásica.

Una ventaja comúnmente declarada de las perras castradas es una reducción significativa en el riesgo de tumores mamarios, sin embargo, una revisión sistemática de los artículos publicados mostró que no incluyen datos como la edad, raza o exposición previa a derivados sintéticos de esteroides ováricos como posibles factores de confusión, debe equilibrarse con otra información disponible sobre los riesgos y beneficios de la castración por lo que tal aseveración debe ser tomada con reserva (*Beauvais et al.*, 2012).

Se han considerado también como factores de riesgo en el cáncer mamario canino, las hormonas exógenas utilizadas para la prevención del celo, interrupción de la gestación o tratamiento de la pseudogestación.

Los receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP) están presentes en tejidos mamarios normales y neoplásicos. Aunque no es del todo consensual, muchos estudios han demostrado que tales receptores tienden a disminuir a medida que aumentan los grados de malignidad. Por otro lado, su presencia se asocia significativamente con mayores tasas de supervivencia cuando se comparan con los tumores que expresan únicamente RE. Es importante resaltar que los estudios de inmunohistoquímica no evalúan la funcionalidad del receptor, esto contribuiría a determinar su importancia biológica real e identificar umbrales diagnósticos, pronósticos o predictivos significativos para justificar su inclusión en la evaluación rutinaria (Sleeckx *et al.*, 2011; Matos, 2015).

*Dieta.* La ingesta de alimentos caseros se relaciona con una mayor prevalencia de tumores mamarios que la ingesta de alimentos comerciales. Un mayor riesgo está asociado con el consumo de carne de res y cerdo que con aves de corral (Pérez-Alenza *et al.*, 1998).

*Obesidad.* Los lípidos no solo son moléculas de almacenamiento de energía, sino que también pueden iniciar y regular los eventos de señalización que influyen decisivamente en el desarrollo, diferenciación celular, metabolismo y funciones relacionadas a través de la regulación de la expresión génica (Varga *et al.*, 2011). La obesidad influye en el desarrollo, la progresión y el pronóstico del cáncer mamario humano y canino, pero el mecanismo preciso no está bien documentado (Lim *et al.*, 2015). Se ha propuesto que el principal factor es un proceso de inflamación crónica, donde los adipocitos liberan leptinas y sus ácidos grasos saturados median citocinas proinflamatorias en los macrófagos (NF- $\kappa$ B, PGE, FNT $\alpha$  y COX-2). Ambos, modifican el microambiente tisular y regulan la expresión de la aromatasa, enzima que interviene en la síntesis de estrógenos que se ha encontrado incrementada tanto en el panículo como en tumores mamarios (Rodolfo *et al.*, 2009). Estudios en hembras caninas obesas, muestran la presencia incrementada de esas citocinas y su correlación significativa con un alto grado histológico e invasión linfática. Además, la infiltración de macrófagos observada dentro y alrededor del tumor, puede jugar un papel importante en la progresión del tumor y metástasis lo que puede representar un factor pronóstico en el cáncer mamario canino (Lim *et al.*, 2015). En este y otros estudios también se observó una relación entre obesidad a edades tempranas asociada con tumores mamarios (Pena *et al.*, 2012; Lim *et al.*, 2015; Shin *et al.*, 2016).

## **2.2.2. Tratamiento**

La cirugía, radiación y quimioterapia son los principales métodos que se utilizan como tratamiento. Otros métodos son los inhibidores específicos y/o terapia hormonal con antagonistas de estrógenos o progesterona.

Las técnicas quirúrgicas son la mastectomía regional indicada para tumores localizados zonalmente (uni o bilateral), la mastectomía unilateral cuando existen múltiples tumores en una cadena mamaria y la mastectomía bilateral cuando los tumores son múltiples en ambas cadenas mamarias. La lumpectomía/nodulectomía está indicada para remover un pequeño nódulo menor a 5 mm, no invasivo (contraindicado cuando existen signos clínicos de malignidad).

El tipo de cirugía que se utilice, no tiene influencia sobre el grado de recurrencia del tumor ni del tiempo de supervivencia (Lana *et al.*, 2007; Dobson, 2008). Estudios clínicos revelan que después de la mastectomía regional 77% de los pacientes desarrollan nuevos tumores (Beauvais *et al.*, 2012; Pawłowski *et al.*, 2013).

Por otro lado, al momento de la mastectomía puede estar establecida la micro metástasis, por lo cual, después de realizada, la enfermedad puede progresar y en estos casos se recomienda un tratamiento adyuvante (Seymour *et al.*, 2017).

Pacientes con enfermedad localmente avanzada, tumores metastásicos o con un tipo histológico biológicamente agresivo puede ser benéfico un tratamiento adyuvante o neoadyuvante con quimio o radioterapia (Sleeckx *et al.*, 2011).

Se recomienda realizar Ooforo-Salpingo-Histerectomía (OSH) como tratamiento, sin embargo, la literatura muestra resultados contradictorios con respecto a su efecto benéfico (Beauvais *et al.*, 2012).

## **2.2.3. Quimioterapia**

### **2.2.3.1. Protocolos de quimioterapia**

Los distintos protocolos de quimioterapia convencional se basan en la premisa de destruir las células tumorales utilizando la dosis máxima tolerada (DMT) que permitirá reducir el



tamaño tumoral, inducir, mantener o prolongar la remisión tumoral, o en dado caso controlar su crecimiento. No obstante, se acompaña de efectos adversos y el riesgo de desarrollar resistencia a la quimioterapia. Independientemente de las respuestas tumorales el enfoque que debe persistir es mantener o mejorar la calidad de vida (Lawrence *et al.*, 2015).

*La terapia adyuvante* es postoperatoria y reduce significativamente el riesgo de recurrencia, el intervalo medio sin metástasis y la supervivencia global en comparación con la cirugía sola tanto en humanos como en caninos (Simon *et al.*, 2006; Finotello *et al.*, 2015; Lawrence *et al.*, 2015). Los factores que influyen el éxito global incluyen metástasis ganglionares y fijación tumoral a estructuras subyacentes, edad y estadio histológico (Simon *et al.*, 2006).

*La quimioterapia neoadyuvante* se administra antes de la cirugía y tiene la ventaja adicional de la monitorización de la respuesta con información pronóstica, además de que minimiza el tumor evitando una cirugía extensa, reducción de complicaciones como linfedema y permite el desarrollo temprano de nuevas estrategias de tratamiento como resultado indirecto de la supervivencia libre y respuesta global (Steenbruggen *et al.*, 2017). En perros, un estudio reporta que independientemente del estadio clínico, las respuestas al tratamiento con el protocolo VAC (Vincristina/Doxorrubicina/Ciclofosfamida) fueron similares con quimioterapia adyuvante, neoadyuvante o como única modalidad de tratamiento. No hubo diferencias significativas entre el tiempo medio de supervivencia y la tasa de respuesta global y parcial fue del 86% (Alvarez *et al.*, 2013).

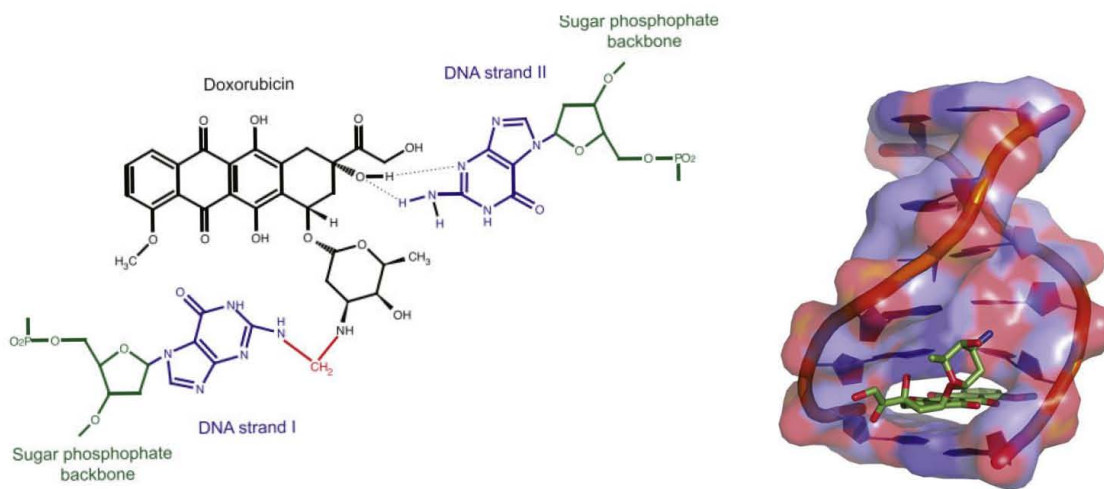
*Esquema Metronómico.* En este enfoque el agente quimioterapéutico es administrado en una frecuencia más continua (cada 7 o 15 días *versus* 21 días convencionales) y a una baja concentración (de 2 a 4 veces menores), potenciando primariamente un efecto anti-angiogénico y permitiendo la reactivación inmunológica antitumoral (Mutsaers, 2007; Mross and Steinbild, 2012; Biller, 2014). En la quimioterapia convencional de DMT se genera daño a las poblaciones celulares de división rápida que incluyen no solamente a las células tumorales sino también a las células del tejido normal tal como células precursoras de la médula ósea y epitelio intestinal. Esta situación requiere un periodo de descanso entre tratamientos para el restablecimiento de tejidos sanos, pero permitiendo también la inducción de quimiorresistencia por parte de las células tumorales. El enfoque metronómico se basa en la premisa de la dosis mínima eficaz donde la quimioterapia continua y a bajas dosis, preserva la respuesta inmunitaria propia y disminuye significativamente los efectos

secundarios adversos. Esta terapia se encuentra todavía en investigación, pero su expectativa a mediano y largo plazo son muy promisorias (Romiti *et al.*, 2017).

## 2.3. Doxorrubicina.

### 2.3.1. Mecanismo de acción

La doxorrubicina (DOX) es miembro de la familia de las antraciclinas que son glucósidos con actividad antibiótica y una de las drogas antineoplásicas más efectivas para el tratamiento de tumores sólidos, como el carcinoma de mama, el carcinoma de células pequeñas de pulmón o el carcinoma de ovario (Mordente *et al.*, 2012). Este fármaco pertenece a los intercaladores del DNA, su efectividad farmacológica depende de su capacidad para unirse a la doble hélice y formar complejos ternarios con la topoisomerasa II con la subsiguiente inhibición de la replicación y transcripción (Dobson, 2008). El complejo DOX-DNA-topoisomerasa II, evita que el DNA vuelva a unirse y esto activa al sistema p53 para detener la progresión del ciclo celular e iniciar la reparación del DNA. Si las roturas son numerosas, entonces la célula entra en apoptosis (Mordente *et al.*, 2012; Octavia *et al.*, 2012; Wittenburg *et al.*, 2014).



**Figura 5. Estructura del complejo Doxorrubicina-ADN.** (A) La Doxorrubicina forma un enlace covalente (mostrado en rojo) con guanina en una cadena de DNA mediada por formaldehído y enlaces de hidrógeno con guanina en la hebra opuesta. (B) Estructura de intercalación de Doxorrubicina en DNA. La Doxorrubicina se intercala en el DNA y separa los pares de bases que se descomponen con el resto de azúcar que se encuentra en el surco menor (Yang *et al.*, 2014).

### 2.3.2. Toxicidad.

Los mecanismos de citotoxicidad se centran primordialmente en su capacidad oxidativa que involucra la generación en cadena de especies reactivas de oxígeno (ROS). Este mecanismo se realiza a nivel de mitocondrial donde la quinona en el anillo C de la DOX es oxidada mediante una NADPH-oxidoreductasa y forma un radical semiquinona que reacciona rápidamente con el oxígeno para generar peróxido de hidrógeno y superóxido. Las ROS son altamente tóxicas causando estrés oxidativo, falta de energía y daño a otros componentes celulares como el DNA, lípidos y proteínas con la consecuente pérdida de la homeostasis y muerte celular. El estrés oxidativo activa Bax y permite la salida de la enzima C citocromo oxidasa, la cual activa la apoptosis vía de las caspasas (Arroyo-Helguera *et al.*, 2006; Alfaro *et al.*, 2013). Las principales ultraestructuras dañadas por la DOX son la mitocondria y el retículo sarcoplásmico, los cuales contienen enzimas como la NADH deshidrogenasa y el citocromo P450; estas enzimas son capaces de reducir a la DOX y convertirla en una semiquinona. El corazón es el órgano más sensible a la toxicidad causada por la DOX debido al gran número de mitocondrias que contiene, aunado a esto algunos otros factores como las altas concentraciones de enzimas como la NADH deshidrogenasa, la afinidad de la DOX hacia la membrana interna de la mitocondria (Cardiolipina) y la baja capacidad para la eliminación de peróxidos, explican porque es el principal blanco de las antraciclinas (Angsutararux *et al.*, 2015).

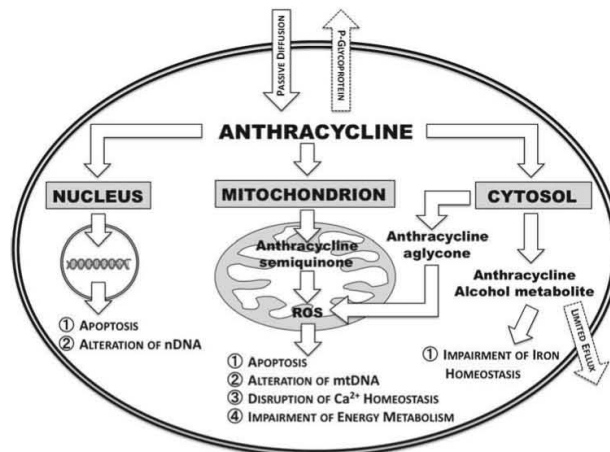


Figura 6. Antraciclinas, blancos celulares efecto fisiopatológico (Mordente *et al.*, 2012).

### 2.3.3. Farmacocinética y farmacodinamia

Su farmacocinética pertenece a un modelo trifásico en donde el valor de la vida media de cada fase es de 3 a 5 minutos, 1 a 3 horas y 24 a 48 horas, lo que implica un alto volumen de distribución (700-1100 L/m<sup>2</sup>) y una lenta fase de eliminación (Mordente *et al.*, 2012). Por lo tanto, el esquema de administración es importante ya que los efectos tóxicos están relacionados con su concentración máxima; una infusión rápida dará lugar a concentraciones máximas más altas, en consecuencia, una velocidad de infusión más lenta da lugar a una mayor área bajo la curva y una fase de distribución más larga, la recomendación es realizar una infusión de 30-60 minutos para minimizar los efectos secundarios tóxicos. Por otra parte, el aclaramiento se correlaciona positivamente con la velocidad de infusión (Dobson, 2008). Después de la aplicación intravenosa se une a proteínas plasmáticas en un rango de 50-85%, es metabolizado en el hígado y son eliminadas principalmente por vía biliar y solo una pequeña fracción por orina; aproximadamente 50 % del fármaco se elimina sin cambios (Mordente *et al.*, 2012). En caninos, sólo el 3% del fármaco se elimina en la orina (Dobson, 2008).

## 2.4. Yodo

### 2.4.1. Naturaleza del yodo

El yodo, descubierto en 1811 por Courtois, es un halógeno con número atómico de 53, un peso atómico de 126.90447 y una solubilidad de 0.3 g L<sup>-1</sup> en agua. El yodo cuenta con siete electrones en su último orbital, de los cuales uno está desapareado. Esta característica lo hace altamente reactivo para combinarse con otro elemento y completar así una configuración estable de ocho electrones. Tiene una alta electronegatividad que le confiere la capacidad para atraer electrones. Dependiendo de su estado de óxido-reducción (-1, +1, 0, +3, +5, o +7), el yodo puede presentar diversas formas químicas. Las especies de yodo que existen a pH de 7 a 8.2 en agua son el yoduro (I<sup>-</sup>), yodo molecular (I<sub>2</sub>), ácido hipoyodoso (HOI), ión hipoyodito (OI<sup>-</sup>) y yodato (IO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Su único isótopo natural es el I<sup>127</sup> (Wiley *et al.*, 2015).

### **2.4.2. El yodo en el ecosistema**

En los vertebrados el yodo es necesario para la producción de hormonas tiroideas, y en el ecosistema esta relacionado energéticamente con muchas formas de vida. Las algas marinas, por ejemplo son las fuentes más ricas de yodo, y se ha considerado el antioxidante natural más primitivo que permitió la evolución de la vida al contender con la extrema oxidación de la atmósfera de oxígeno. En organismos uni- y pluri-celulares el yodo es utilizado como un oxidante en la defensa contra protozoarios y bacterias. Desde este punto de vista evolutivo el yodo es considerado un elemento sensor de bioenergía ya que frecuentemente está asociado a biomoléculas energéticas (proteínas y lípidos) y su abundancia se considera como una señal de biodisponibilidad de energía en la transición del desarrollo, temperatura, metabolismo y fertilidad (Preedy *et al.*, 2009; Venturi, 2011).

### **2.4.3. Efectos del yodo en la glándula mamaria**

Se ha demostrado que el yodo participa en la fisiología y / o patología de los órganos que lo capturan, tal como tiroides, glándula mamaria, próstata y estómago y también como agente antioxidante en todo el organismo. Nuestro grupo de investigación ha descrito que el yodo molecular ( $I_2$ ) ejerce efectos de rediferenciación celular en diversos modelos de cáncer (Aceves *et al.*, 2013).

Datos obtenidos en tumores mamarios murinos inducidos con el cancerígeno metilnitrosourea (MNU), mostraron que el suplemento continuo de  $I_2$  ejerce una significativa acción adyuvante que permite disminuir la dosis de DOX hasta 4 veces, manteniendo el efecto apoptótico y ejerciendo una acción cardioprotectora. El análisis molecular de estos efectos mostró que la dosis menor de DOX (4 mg/kg de peso) genera un “escape” en el crecimiento del tumor acompañado de la expresión de genes relacionados con quimiorresistencia como Bcl2 y survivina. Este escape fue inhibido en los animales tratados con DOX +  $I_2$ , donde además de mantener el efecto antineoplásico (disminución del tamaño tumoral) se presentaba una elevada expresión de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas tipo gamma (PPAR $\gamma$ ) (Alfaro *et al.*, 2013). En un estudio clínico con pacientes con cáncer de mama, nuestro grupo mostró que la coadministración de  $I_2$  con quimioterapia FEC (5-Fluorouracilo, Epirrubicina, Ciclofosfamida), previene la instalación de procesos de quimioresistencia, observada en el 30% de los pacientes

tratados sólo con FEC. Este efecto adyuvante del yodo correlacionó con la disminución significativa en la expresión de genes de invasión (Urokinase-type Plasminogen Activator – uPA–; Vascular Endothelial Growth Factor –VEGF–) y quimiorresistencia (Multidrug resistance protein 1 –MDR1–; Survivin –Surv–) así como de sobreexpresión de los receptores PPAR $\gamma$  (Peralta *et al.*, 2011; Aceves *et al.*, 2011).

El efecto antioxidante y cardioprotector del yodo observado en los estudios *in vivo* se ha explicado en parte por la capacidad oxidativa del yodo molecular en presencia de especies reactivas de oxígeno (Alfaro *et al.*, 2013).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El cáncer mamario canino (CMC) representa un problema de salud veterinario. El estado de salud de la paciente, así como su estadificación, número, tamaño, tipo de tumor y su grado de malignidad son elementos relevantes al momento de obtener el diagnóstico definitivo con fines de definir el abordaje terapéutico adecuado. El tratamiento estándar es la mastectomía, pero a menudo falla en tumores de alto grado de malignidad debido a que son altamente invasivos o existen micro metástasis al momento de la cirugía y una de sus complicaciones es la reincidencia tumoral presentándose en el 77% de los casos. Por otra parte, se conoce que la mayoría de los tumores de glándula mamaria en perros como en humanos, son positivos al receptor de estrógeno y progesterona, por lo que otro de los tratamientos convencionales ha sido la ooforo-salpingo-histerectomía (OSH), aunque los resultados tampoco han sido del todo efectivos. Por lo anterior, ha sido necesario recurrir al uso de la quimioterapia. Por su eficacia, la doxorubicina es el fármaco de primera elección en la medicina humana, sin embargo, en el CMC su uso es escaso debido a la información limitada sobre la eficacia, dosis, toxicidad y quimiorresistencia.

En este proyecto se pretende utilizar el modelo canino para corroborar los efectos antineoplásicos y cardioprotectores del I<sub>2</sub> en coadyuvancia con DOX en el tratamiento de cáncer mamario, permitiendo además analizar dosis y tiempos de administración en diferentes tipos de tumor y grado de malignidad. Igualmente nos permitirá analizar eventos moleculares involucrados en la adquisición y/o suspensión de la quimiorresistencia y establecer su efecto clínico en la calidad de vida de las pacientes.

## **4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **4.1. Hipótesis**

El yodo molecular potenciará los efectos antineoplásicos de la DOX previniendo la instalación de resistencia y atenuando la cardiotoxicidad.

### **4.2. Objetivo general**

Analizar los efectos clínicos, de anatomía patológica y moleculares ejercidos por composición terapéutica DOX / I<sub>2</sub> en dos esquemas de administración en el tratamiento del cáncer mamario canino.

### **4.3. Objetivos específicos**

- Establecer el efecto del suplemento de I<sub>2</sub> en coadyuvancia con dos diferentes esquemas de administración de DOX en la progresión del cáncer mamario canino (tamaño tumoral, quimiorresistencia, metástasis).
- Analizar en el tejido tumoral la expresión de marcadores de proliferación, quimioresistencia e invasión.
- Analizar el efecto del suplemento de I<sub>2</sub> en la cardiotoxicidad secundaria al tratamiento con DOX.
- Analizar en el periodo de 10 meses posteriores a la cirugía la sobrevida y el tiempo libre de cáncer en los pacientes suplementados con I<sub>2</sub>.

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1. Lugar de estudio**

El método clínico y procedimientos quirúrgicos se realizaron en el Hospital Veterinario de la Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Médico Veterinario y Hospital Veterinario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán -UNAM; en este último se realizaron además los análisis clínicos de las pacientes. Los estudios colorimétricos, determinación de yodo en orina, histopatología, inmuohistoquímica y qPCR se realizaron en el Instituto de Neurobiología, UNAM-Juriquilla.

## **5.2. Población de estudio**

Con el consentimiento informado de los propietarios, se incluyeron hembras caninas enteras, de edad y raza indistinta, sin previa mastectomía o tratamiento quimioterapéutico, con estado de salud aceptable y estadificación por el sistema TNM I a V (Lana et al., 2007). Se consideraron como criterios de eliminación, no apego al tratamiento, desarrollo de intolerancia al yodo y animales en los que fue necesario el cambio de tratamiento. Además, todos los procedimientos siguieron el programa de cuidado y uso de animales (NIH, EUA) y fueron aprobados por el comité de ética en investigación del INB-UNAM (Protocolo # 102).

## **5.3. Evaluación de la salud**

Se registró información de edad, raza y antecedentes de salud, profundizando en aspectos relacionados con los factores de riesgo como la reproducción y la alimentación, así como datos obtenidos del examen físico que incluyeron la localización y evaluación macroscópica de los tumores (Anexo 1. Historia clínica).

Antes de iniciar y al finalizar los esquemas de administración se evaluó el conteo de células hemáticas, función tiroidea, hepática, cardíaca y renal; esta última complementada con el examen general de orina. Los efectos adversos de la quimioterapia fueron evaluados conforme a los criterios de VCOG-CTCAE (Veterinary Cooperative Oncology Group, 2004) y fueron registrados en un formato (Anexo 2. Evaluación de la salud post quimioterapia).

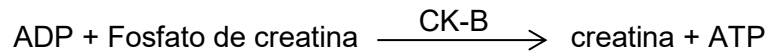
La estadificación del cáncer mediante el sistema TNM (T-tamaño tumoral; N-tumor en nódulo linfático o linfonodo y M-metástasis) se realizó al inicio, fin y en la etapa de seguimiento utilizando radiografía de campos pulmonares, ultrasonografía de abdomen y aspiración con aguja delgada (ACAD) de linfonodos sospechosos.

El seguimiento de las pacientes se llevó a cabo al primer, cuarto y décimo mes posterior a la mastectomía.

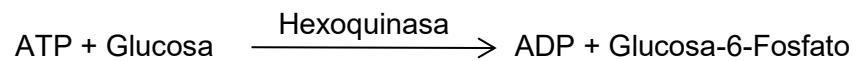
*Evaluación cardíaca.* Para determinar la cardiotoxicidad por DOX y el efecto del yodo molecular sobre este, se realizaron trazos electrocardiográficos antes y después de cada quimioterapia, se analizó un complejo en la derivación II utilizando una velocidad de 50 mm/s y 10 mm/mV de amplitud, los cuales fueron amplificados en electrocardiógrafos Schiller y Sono ECG 9600 touch. Este estudio se complementó con la medición de la concentración sérica de la enzima CK-MB al inicio y fin del tratamiento.



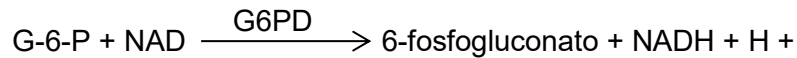
La CK-MB se cuantificó mediante ensayo inmuno-enzimático, empleando el kit de CK-MB Stambio (0980-103). La primera reacción que se lleva a cabo es la inhibición de la actividad del monómero M de las enzimas séricas CK-MM y CK-MB mediante un anticuerpo monoclonal; CK-B queda libre y cataliza la fosforilación del ADP en presencia del fosfato de creatina para formar ATP y creatina:



La hexoquinasa cataliza la fosforilación de la glucosa por el ATP formado para producir ADP y glucosa-6-fosfato (G-6-P):



La G-6-P es oxidada a 6-fosfogluconato con la producción a NADH, la formación de NADH, medida a 340 nm, es directamente proporcional la actividad de CK-B en el suero



La preparación de las muestras se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Se utilizó un ml de la solución del kit para cada muestra o control y se incubó a baño María durante 5 minutos a 37°C, se adicionaron 50 µl de la muestra o control y se incubaron bajo las mismas condiciones, después de este tiempo se midió a una longitud de onda de 340 nm en el espectrofotómetro Beckman Coulter DU 730; posteriormente se tomaron dos lecturas más cada minuto. Para el cálculo de CK-MB, se determinó el promedio de la absorbancia por minuto y se multiplicó por el factor 6752 para obtener los resultados en U/L.

*Evaluación tiroidea* La determinación de hormona triyodotironina (T<sub>3</sub>) se realizó por el método indirecto utilizando el kit comercial de Diagnóstica Internacional (IIDE-2021 ver.1). Se colocaron 50 µl de estándares, muestras y controles a los cuales se adicionó la misma cantidad de anticuerpo anti-T<sub>3</sub> de ratón y se mezclaron durante 30 segundos. Posteriormente se agregaron 100 µl de T<sub>3</sub> conjugada con peroxidasa de rábano picante, se mezclaron durante 30 segundos y se incubaron a temperatura ambiente por 60 minutos, tiempo en el cual T<sub>3</sub> y T<sub>3</sub> conjugado compiten por los sitios de unión del anticuerpo anti-T<sub>3</sub>. Se eliminó el sobrenadante y se realizaron 5 lavados con solución buffer de lavado. Para hacer evidente la reacción, se adicionaron 100 µl de cromógeno a cada pozo (solución

TMB) y se incubó a temperatura ambiente y en la oscuridad (la solución vira a color azul); después de 20 minutos, se adicionaron 100  $\mu$ l de solución de paro (HCl 1N) y viró a color amarillo; antes de 15 minutos se midió la absorbancia de la enzima presente, la cual esta inversamente relacionada con la cantidad de  $T_3$ . La medición se realizó a 450 nm en el espectrofotómetro BIORAD 680.

Se calculó el valor de la absorbancia promedio de los estándares de referencia, controles, y muestras, y desde la curva estándar se interpolaron las densidades ópticas de cada muestra para determinar la concentración correspondiente de  $T_3$  (ng/ml); estos datos fueron procesados en el programa estadístico de Prisma 6.0 (Graph Pad Inc. USA).

*Hormona estimulante del tiroides (TSH).* La medición sérica se realizó por el método de inmunoadsorción ligado a enzimas mediante el kit Abnova<sup>R</sup> KA2296. El sistema de ensayo constó de anticuerpo anti-TSH canina intacta para la inmovilización en fase sólida (pocillos de microtitulación) y un anticuerpo anti-beta TSH canino de ratón en el conjugado anticuerpo-enzima (peroxidasa de rábano picante). Se llevó a cabo la reacción de la muestra simultáneamente con los dos anticuerpos para que las moléculas de TSH se intercalen entre la fase sólida y los anticuerpos ligados a la enzima.

Después de 3 horas de período de incubación a 37°C, los pocillos se lavaron utilizando solución de lavado para eliminar los anticuerpos no marcados. Se agregó una solución de TMB e incubó durante 20 minutos, lo que da como resultado el desarrollo de un color azul. El desarrollo del color se detuvo con la adición de solución de parada y el color cambia a amarillo. Se realizó la lectura a 450 nm en un espectrofotómetro BIO RAD Mark<sup>TM</sup>. Se construyó una curva estándar trazando la absorbancia media obtenida de cada estándar de referencia contra su concentración en ng/ml en papel milimetrado, con valores de absorbancia en el eje vertical o Y, y concentración en el eje horizontal o X para determinar la concentración correspondiente de TSH en ng / mL de la curva estándar.

*Medición del consumo de yodo.* La determinación de yodo urinario se realizó utilizando un electrodo de yoduro (electrodo selectivo de ion) debido a su alta selectividad y sensibilidad al yoduro así como facilidad de automatización y correlación con los métodos estándar basados en la reacción de Sandell-Kolthoff (Tomcik and Bustin, 2001; Zhang *et al.*, 2005; Mendecki *et al.*, 2016; Giovacchini *et al.*, 2015; Preedy B *et al.*, 2009; Jooste and Strydom, 2010). Se realizaron estándares de yodo utilizando la sal de yoduro de sodio (NaI) (Sigma

Aldrich N° 383112); se preparó una solución inicial de 10 ml de NaI a 0.1 M ( $1 \times 10^{-1}$ ) con agua desionizada, a partir del cual se realizaron diluciones decuples seriadas hasta  $1 \times 10^{-7}$  M. Se realizaron dos lecturas de cada estándar o muestra de orina utilizando el electrodo del ion yoduro LIS-146ICM y potenciómetro Thermo Scientific Orion Star A214 benchtop pH/ISE.

La curva de calibración se realizó con las lecturas de voltaje (mV) en papel semilogarítmico de cuatro ciclos y se interpolaron los datos para obtener la concentración de las muestras en  $\mu\text{g/L}$ .

#### **5.4. Protocolos quimioterapéuticos**

Los tratamientos quimioterapéuticos fueron ambulatorios. Se llevaron a cabo dos esquemas de administración de DOX (30 mg) /I<sub>2</sub>–10mg–). El esquema estándar consistió en 4 ciclos de DOX, con intervalo de 21 días e infusión intravenosa de 20 minutos y el esquema modificado de 4 ciclos cada 15 días e infusión lenta de 60 minutos. El I<sub>2</sub> o placebo (pintura vegetal) se administraron diariamente en conjunto con el alimento desde una semana antes de la primera quimioterapia hasta la mastectomía. La quimioterapia se administró previo examen de sus valores sanguíneos.

#### **5.5. Evaluación anatomopatológica**

El diagnóstico inicial de los nódulos tumorales se realizó mediante examen citológico del tumor primario con la técnica de aspiración con aguja delgada y frotis teñidos con Papanicolaou (De Buen de Argüero Nuria, 2014).

La evaluación macroscópica de los tumores se llevó a cabo en cada sesión con la paciente; para evaluar el comportamiento tumoral, la medición se realizó con un vernier y el volumen del tumor se calculó con la fórmula elipsoide  $(a + (b)^2) / 2$ .

Antes del tratamiento quimioterapéutico se tomó una biopsia incisional del tumor primario de aproximadamente 1 x 0.5 x 0.5 cm o de un nódulo completo con similares dimensiones. Al final del tratamiento se obtuvo la pieza quirúrgica completa. Los tumores fueron fijados en formalina amortiguada al 10% durante 48 horas, se deshidrataron y se embebieron en parafina; posteriormente se realizaron cortes de 4  $\mu\text{m}$  y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para su evaluación microscópica.

La clasificación histológica y grado de malignidad se emitieron con base a lo descrito por Goldschmidt *et al*, 2011. La clasificación histológica fue determinada por el criterio de dos patólogos y registrada en un formato (Anexo 3. Evaluación anatomopatológica).

En la evaluación microscópica del tumor al inicio y al final del tratamiento se determinó además del grado de malignidad, la presencia o ausencia de permeabilidad vascular o linfática, necrosis e infiltrado linfocitario; este último fue contabilizado en 3 campos a 20X. Se consideró > 30 leve, de 31 a 200 moderado y más de 200 grave.

En cortes de tejido teñidos con Tricrómica de Masson, se analizó la proporción epitelio/tejido conectivo; se evaluaron 5 campos a 40X seleccionados al azar. El porcentaje de cada componente se determinó mediante la afinidad tintorial en el programa ImageJ 1.43u Wayne Rasband National Institutes of Health, USA.

## **5.6. Clasificación molecular de los tumores**

*Receptor de estrógeno  $\alpha$  por inmunohistoquímica.* Se analizaron biopsias de glándula mamaria obtenidas al inicio y fin del tratamiento quimioterapéutico. Los cortes se realizaron a 4  $\mu$ m en laminillas silenizadas, fueron desparafinadas a 60°C durante 30 minutos y 10 minutos en xilol absoluto. Posteriormente, se hidrataron en xilol/etanol (1:1), 3 minutos y en etanol 100%, 96%, 80%, 70%, 50%, agua desionizada y solución amortiguada de fosfatos (PBS, 1X), 1 minuto en cada solución. La recuperación antigénica se llevó a cabo en baño María, los cortes contenidos en un vaso de coplin y sumergidos en ácido citracónico al 0.05% (Sigma Aldrich 125318-25G) se incubaron durante 25 minutos a 100°C en una olla de presión; se dejó pasar el tiempo hasta que ya no hubo presión de vapor y se atemperaron a medio ambiente una hora. El bloqueo de actividad enzimática endógena se hizo sumergiendo los cortes en peróxido de hidrógeno al 3% y a temperatura ambiente, durante 10 minutos. Enseguida, se adicionó a cada corte anticuerpo policlonal IgG contra el RE $\alpha$  producido en conejo (Santa Cruz Biotechnology (HC-20) SC-543) a una concentración de 1:200, uno de los cortes fue utilizado como control negativo substituyendo el anticuerpo primario con PBS (1X); se incubaron por un tiempo de 16 horas a 4°C en cámara húmeda. El anticuerpo secundario goat anti-rabbit (DAKO, K4011) se utilizó a una concentración 1:1000 y se incubó en cámara húmeda y temperatura ambiente, durante 40 minutos. La reacción antígeno-anticuerpo se reveló con diaminobencidina (DAKO, K4011), se realizó

deshidratación con tren de hidratación inversa y se contrastaron con hematoxilina durante 30 segundos. El inmunomarcaje se analizó en un microscopio óptico Leica DM2500, se realizó la captura de imágenes en 3 campos a 40X de manera aleatoria con el programa LAS Versión 2.8.1; estas fueron procesadas con el programa ImageJ 1.43u (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA) en donde se determinó la localización celular y porcentaje del RE $\alpha$ .

### **5.7. Expresión génica.**

La expresión génica se analizó en biopsias obtenidas después del tratamiento quimioterapéutico; inmediatamente que se retiró el tumor, se realizaron porciones de 0.5 cm<sup>2</sup> y se almacenaron a -70°C.

Para la extracción de RNA, se realizó la fragmentación de una muestra de aproximadamente 50 mg de manera mecánica y química utilizando homogeneizador y 1 ml de trizol (Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA) a 4°C. La separación del RNA se realizó mediante cloroformo (200  $\mu$ l, 99%) y como método de purificación se utilizó isopropanol (500  $\mu$ l, Sigma Aldrich) y etanol (1 ml, 75%), obteniéndose una pastilla la cual fue suspendida en 100  $\mu$ l de agua estéril libre de RNAsas. Mediante un micro espectrofotómetro (nanodrop 2000 Termo Scientific), se cuantificó el RNA a 260 nm y se examinó la pureza mediante el cociente  $\Delta 260/\Delta 280$ . La calidad del RNA se determinó realizando una electroforesis con gel de agarosa al 2% (2  $\mu$ l de RNA/ y 2  $\mu$ l de buffer de carga) en TAE (1X) y 4  $\mu$ l de Bromuro de etidio a 89 V. Para la obtención del cDNA se usaron RNA (2 ug), Oligo dT (1  $\mu$ l a 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l, Invitrogen-58862) y agua estéril libre de RNAsas necesaria para obtener un volumen final de 15  $\mu$ l; incubó a 70°C durante 5 minutos en el termoblock Thermal cycler DNA 480; inmediatamente se colocaron a 4°C durante 5 minutos y se adicionaron 10  $\mu$ l de una segunda reacción, que consistió de agua estéril libre de RNAasas (2.05  $\mu$ l), solución Buffer (5  $\mu$ l a 5X, Promega-M5314), desoxinucleosido trifosfato (1.25  $\mu$ l a 10 pmol), RNase OUT (0.7  $\mu$ l a 40 U/ $\mu$ l, Invitrogen) y transcriptasa reversa (1  $\mu$ l a 200 U/ $\mu$ l, Promega-M170A); se realizó incubación durante una hora a 40°C. Para el PCR tiempo real (qPCR), se amplificó DNA para marcadores moleculares de apoptosis (Bax, Bcl2), quimioresistencia (MDR1 y Survivina) e invasión (uPA), así como de PPAR $\gamma$ ; los últimos cuatro, diseñados en específico para perro mediante algoritmos en línea en el programa PrimerBLAST (Basic Local Alingment Search Tool) (Cuadro 1).

### Cuadro 1. Oligonucleotidos

Gen	Referencia	Sentido	Antisentido
$\beta$ -actina <sup>1</sup>	NM_001101	acagagtacttgcgctcagga	ccatcatgaagtgtgacgttg
PGK1 <sup>2</sup>	NM_053291.3	tgactttggacaagctggacgtga	cagcagccttgatcctttggttgt
Bax <sup>3</sup>	NM_001003011.1	aagctgagcgagtgctcaagcgc	tcccgccacaagatgggtcac
Bcl <sub>2</sub> <sup>4</sup>	NM_000633.2	gtggaggagctcttcagggga	aggcaccagggtgatgcaa
PPAR $\gamma$ <sup>5</sup>	XM_005632014.1	ttcattctcaagagcggaccc	tctccacagactcggcattcaa
Survivina <sup>6</sup>	NM_001003348.1	accgctctctacgttcaag	ccaagtctggctcgttctca
uPA <sup>7</sup>	XM_005618862.1	ttggggagatgaagtttgaggtgg	cagaacggatcttcagcaagg
MDR1 <sup>8</sup>	NM_001003215.1	tatcagcagcccacgtcatc	cagccactgctacctacgag

<sup>1, 3, 4</sup> Humano, <sup>2</sup> Rata, <sup>5, 6, 7, 8</sup> Canino

La amplificación de los genes de interés, se realizó utilizando una réplica de cada muestra, se utilizó cDNA (1  $\mu$ l), reactivo de SYBR Green (5  $\mu$ l, Thermo Scientific K0221), agua estéril (3.5  $\mu$ l) y oligo (0.4  $\mu$ l a 10 pmol/ $\mu$ l); la reacción se procesó en el equipo de tiempo real Rotor-Gene 3000 iniciando a 95°C durante 10 minutos, posteriormente se programó a 40 repeticiones por ciclo: desnaturalización a 95°C durante 15 segundos; alineamiento a 60°C durante 30 segundos y elongación 72°C durante 30 segundos. Se utilizó una curva de melting de 50 a 90 °C.

#### 5.8. Análisis estadístico.

Se utilizó ANOVA de una vía con su relativo test *post hoc* para delinear cambios entre grupos utilizando una significancia de  $p < 0.05$ .

## 6. RESULTADOS

Se evaluaron clínicamente a 227 pacientes, 194 correspondieron a tumores mamarios caninos (TMC), 158 fueron malignos (91 %) y 15 benignos (9 %). De acuerdo con los criterios de inclusión o exclusión establecidos, lograron incluirse en este estudio a 27 pacientes; las condiciones clínicas al momento de su ingreso se muestran en el cuadro 2.

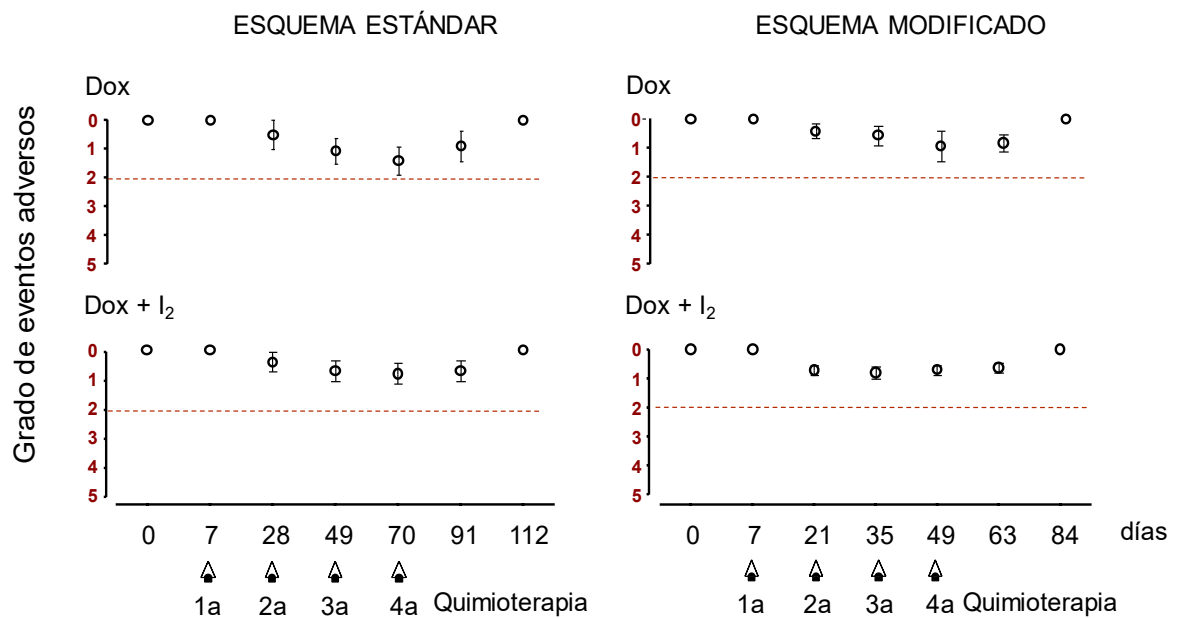
La edad mediana fue de  $9.2 \pm 2.4$  años, y la raza más afectada fue el Poodle estándar (33%). Sesenta y ocho por ciento de las perras fueron nulíparas, y ninguna recibió terapia hormonal. Solo el 20% de las pacientes presentaron sobrepeso (entre 10% y 30% por encima del peso estándar). Dos pacientes presentaron metástasis a distancia (pulmones) en el momento del diagnóstico (estadio clínico V).

## Cuadro 2. Características clínicas de las pacientes

Raza	Edad (años)	Peso (kg)	Etapas clínicas (TNM) Ø	Número de tumores	Partos	ERα
<b>Esquema estándar (Dox)</b>						
Poodle estándar	12	6	III	2	0	Positivo
Maltese bichon	9	<b>9.9</b>	III	7	2	Positivo
Dachshund	13	6.6	III	4	2	Positivo
Maltese bichon	7	<b>6.6</b>	III	5	0	Positivo
<b>Esquema estándar (Dox + I<sub>2</sub>)</b>						
Rottweiler	8	38	III	1	2	Positivo
Poodle estándar	12	5.8	II	5	0	Positivo
Poodle estándar	10	3.8	III	5	0	Positivo
Labrador Retriever	10	30	III	7	0	Positivo
Poodle estándar	12	6.4	V	8	1	Positivo
Poodle estándar	9	7	III	9	1	Positivo
<b>Esquema modificado (Dox)</b>						
Cocker Spaniel	9	10.3	II	8	0	Positivo
Mestiza	6	4.2	II	2	0	Positivo
Cocker Spaniel	8	13	I	6	3	Positivo
Chihuahueño	5	2.2	I	3	0	Positivo
Pastor Alemán	7	30.1	III	7	0	Positivo
Dalmata	6	23	I	1	0	Positivo
<b>Esquema modificado (Dox + I<sub>2</sub>)</b>						
Cocker Spaniel	10	<b>16.8</b>	III	1	0	Positivo
Mestiza	8	<b>7.6</b>	I	5	0	Positivo
Poodle estándar	11	4.2	V	7	0	Positivo
Cocker Spaniel	13	9.8	III	7	0	Positivo
Fox terrier Toy	7	2.4	I	5	0	Positivo
Poodle estándar	10	4.5	III	3	0	Positivo
Cocker Spaniel	13	<b>17.4</b>	III	7	3	Positivo
Poodle estándar	10	6	II	8	0	Positivo
Poodle estándar	9	4.7	III	6	4	Positivo
Chihuahueño	5	<b>3.8</b>	III	5	0	Positivo
Dachshund	10	5.2	III	5	1	Positivo

Ø T – Tumor primario, N – Linfonodos regionales, M – Metástasis distante (Goldschmidt *et al.*, 2011). Números en negritas, animales con sobrepeso (10-30% del peso estándar)

La clasificación de los eventos adversos para cada grupo a lo largo del tratamiento se resume en la Figura 7. Los pacientes comenzaron con excelentes condiciones (0) y se observaron grados inferiores y medios (1 a 2) después del segundo o tercer ciclo de quimioterapia (antes del tercero o cuarto ciclo de quimioterapia, respectivamente). Ningún paciente exhibió una pérdida significativa de peso o desarrolló grados 3, 4 o 5 (muerte) durante los tratamientos.



**Figura 7. Valor funcional según la escala VCOG-CTCAE.** Cada punto representa la media y la desviación estándar para cada informe clínico durante todos los tratamientos. Las flechas representan el día de la aplicación de quimioterapia (DOX).

El cuadro 3 describe el número de pacientes que presentaron signos clínicos y su gravedad (grado) en cualquier momento durante el tratamiento de quimioterapia. El esquema mDOX reduce la gravedad de los síntomas generales en comparación con sDOX. El suplemento I<sub>2</sub> atenúa aún más la gravedad de los síntomas en ambos tratamientos. Las seis perras que presentaron vómitos y/o diarrea grado 2 se complementaron con atención de apoyo: antibiótico (metronidazol, 30-40 mg/kg durante 14 días) y probióticos (enterogermina 2 mil



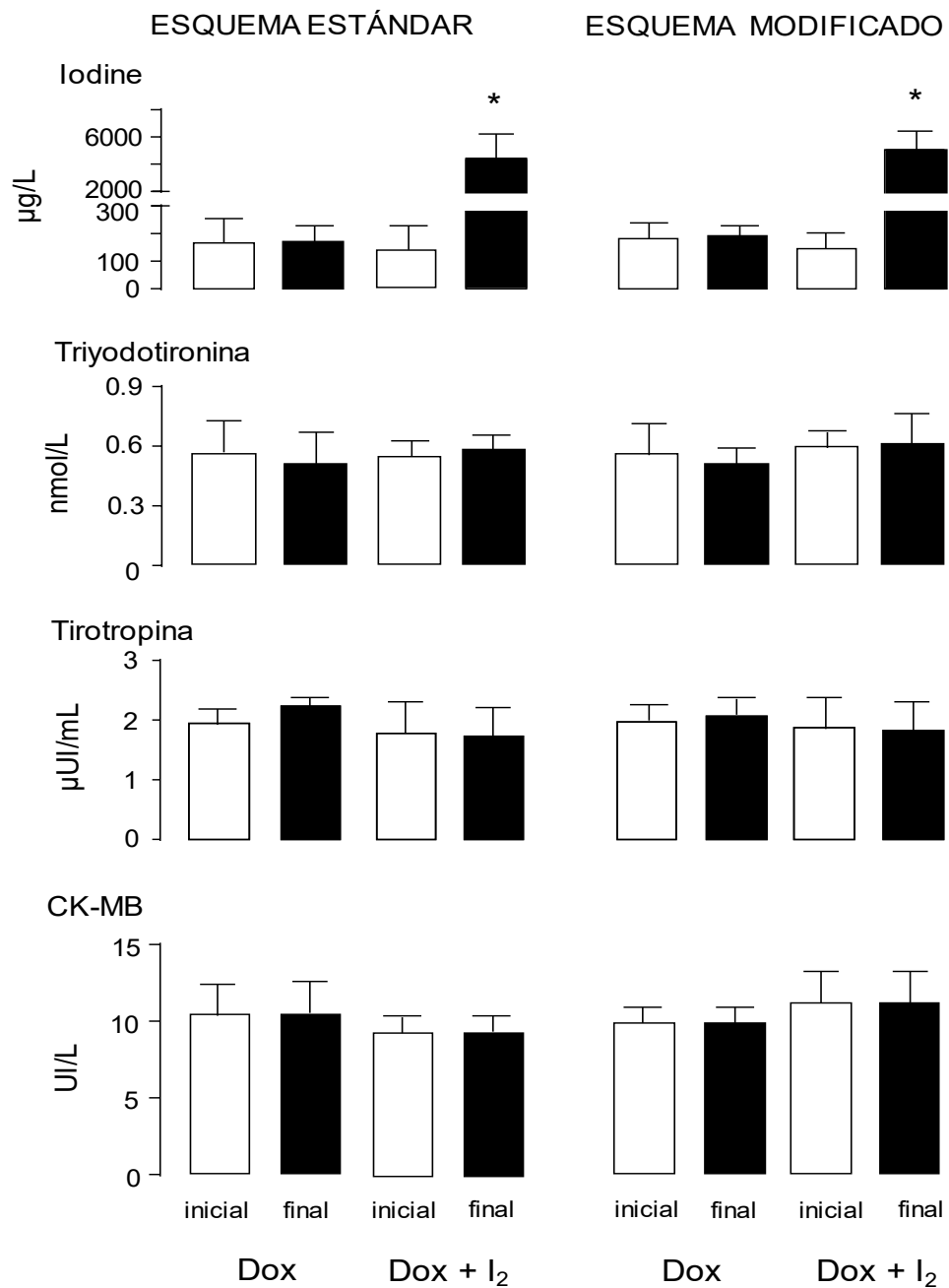
millones/5 ml); con Omeprazol (20 mg/kg durante 24 horas), Ranitidina (3 mg/kg cada 12 horas durante 8 días), Difenidol (1 mg/kg durante 4 días) y/o fluidoterapia (solución salina).

**Cuadro 3. Efectos adversos (VCOG-CTCAE).**

	Grado	sDox	sDox + I <sub>2</sub>	mDox	mDox + I <sub>2</sub>
Vomito	1	1 (25%)	1 (17%)	1 (17%)	2 (18%)
	2	1 (25%)	1(17%)	1 (17%)	
	3				
	4				
Diarrea	1	1 (25%)	1 (17%)	1 (17%)	2 (18%)
	2	1 (25%)	1 (17%)	1 (17%)	1 (9%)
	3				
	4				
Anorexia	1	2 (50%)	1 (17%)	1 (17%)	1 (9%)
	2	1 (25%)	1 (17%)		
	3				
	4				
Letargia	1	1 (25%)	1 (17%)	1 (17%)	1 (9%)
	2	1 (25%)	1 (17%)	1 (17%)	1 (9%)
	3				
	4				
Anemia <sup>1</sup>	1	2 (50%)	2 (33%)	2 (33%)	3 (27%)
	2				
	3				
	4				
Neutropenia	1	1(25%)	1 (17%)	1 (17%)	1 (9%)
	2				
	3				
	4				

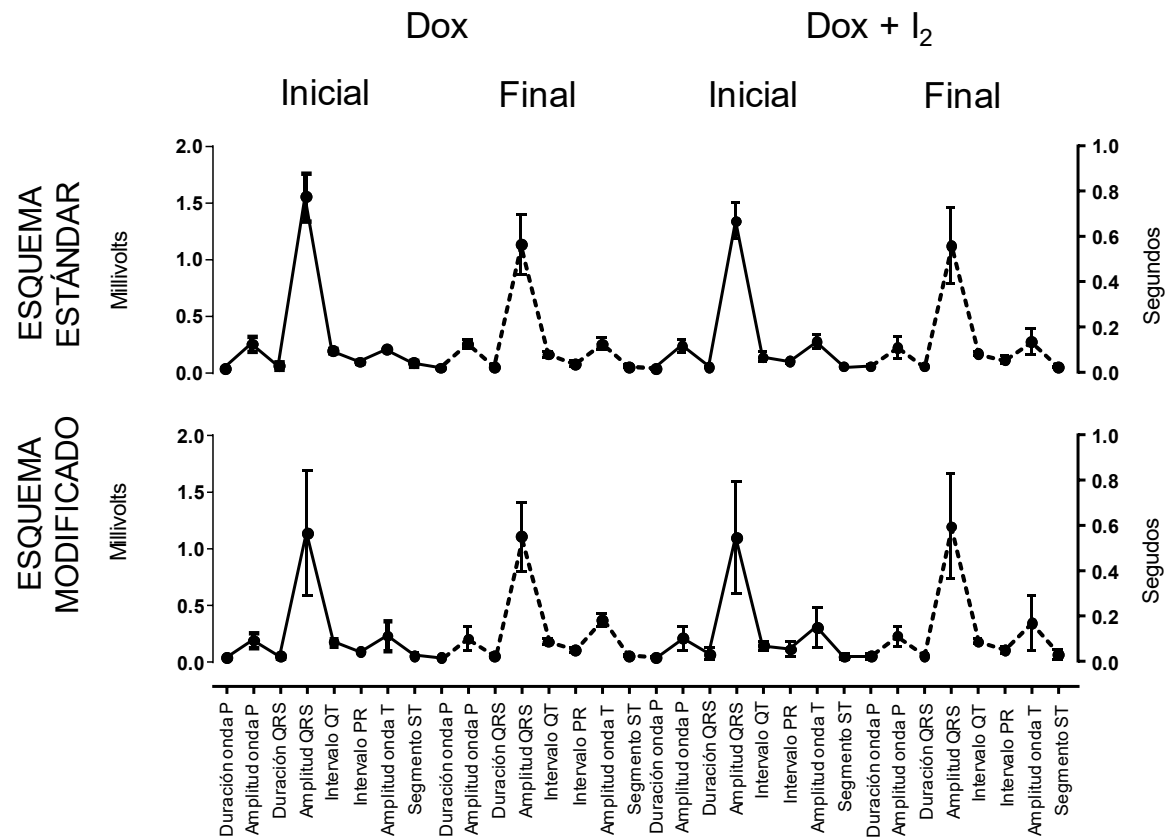
<sup>1</sup>Anemia incluye evaluación de hematocrito, hemoglobina y valores de eritrocitos (volumen globular medio y concentración media de hemoglobina).

La ingesta de I<sub>2</sub>, el estado tiroideo y el daño cardíaco se registraron cuando los pacientes fueron aceptados en el protocolo (inicial) y el día de la mastectomía (final). Los valores totales de yodo en orina fueron superiores a 2000 µg/L en pacientes suplementados, y los grupos DOX no mostraron ningún cambio. La suplementación con I<sub>2</sub> y/o la administración de DOX no modificaron los valores circulantes de T<sub>3</sub> o TSH ni mostraron daño cardíaco medido por la actividad sérica de CK-MB (Figura 8).



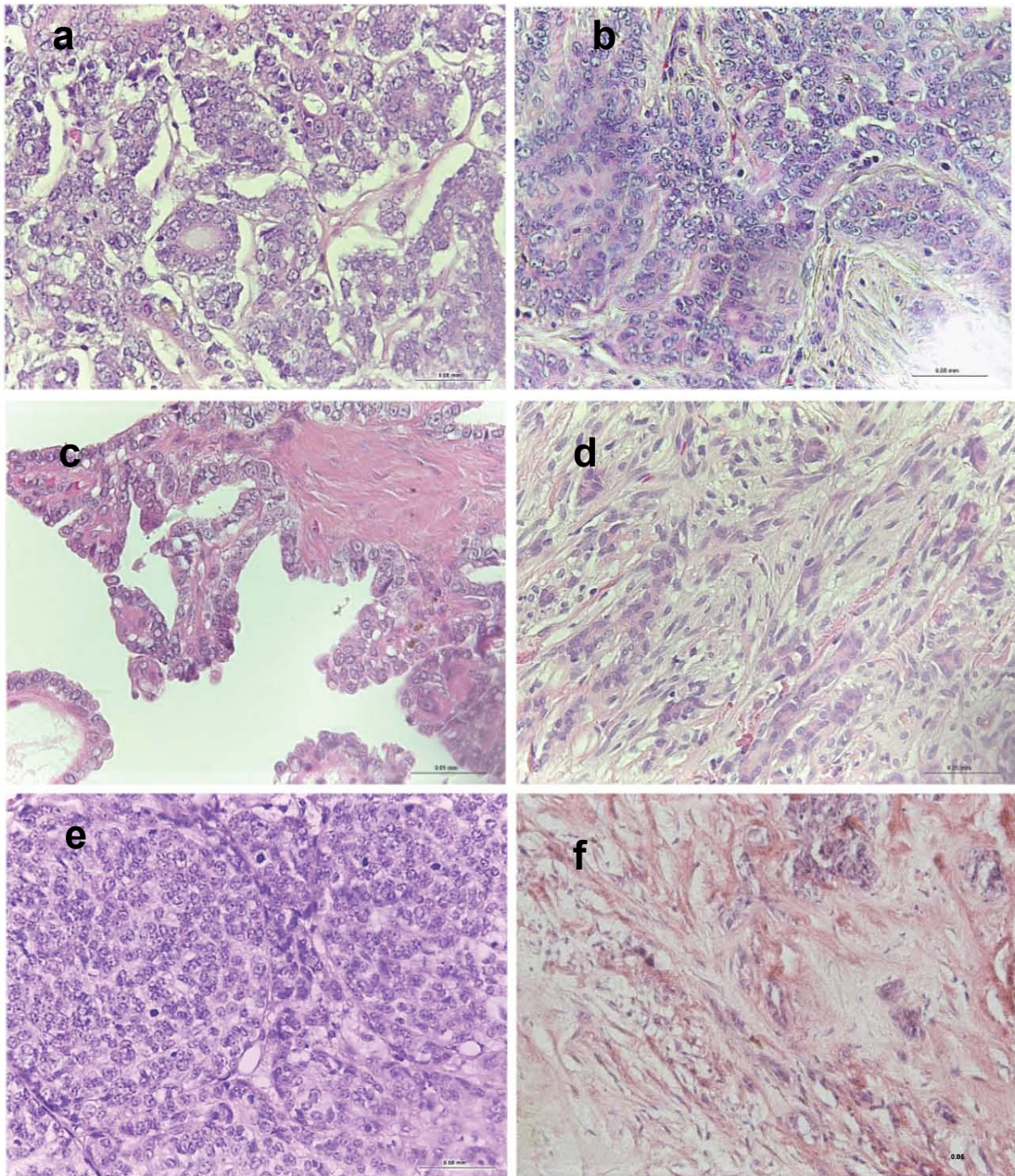
**Figura 8. Ingestión de yodo, estado tiroideo y daño cardíaco durante los tratamientos.** Los valores se registraron el día del ingreso del paciente al protocolo (inicial) y el día de la mastectomía (final). El yodo total se determinó en la orina. La triyodotironina, la tirotropina y la creatina quinasa tipo MB (CK-MB) se cuantificaron en suero. Los datos se expresan como media  $\pm$  SD, y el asterisco indica una diferencia significativa con respecto a la condición inicial ( $P < 0,05$ ).

Las variables del electrocardiograma desde el inicio (tiempo 0) y final (antes de la mastectomía) se resumen en la Figura 9. No se observaron cambios significativos entre los grupos en cualquier día de variable o protocolo.



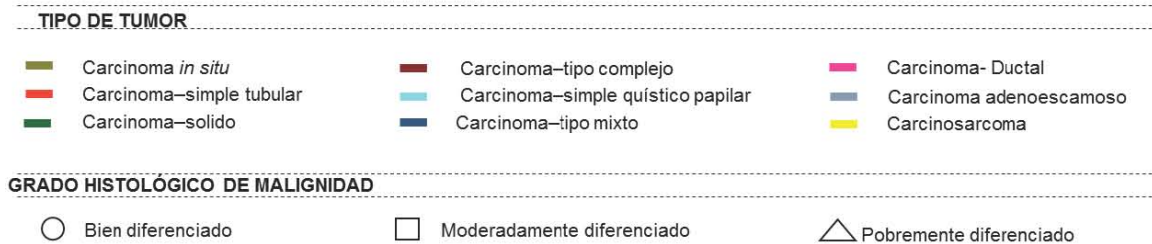
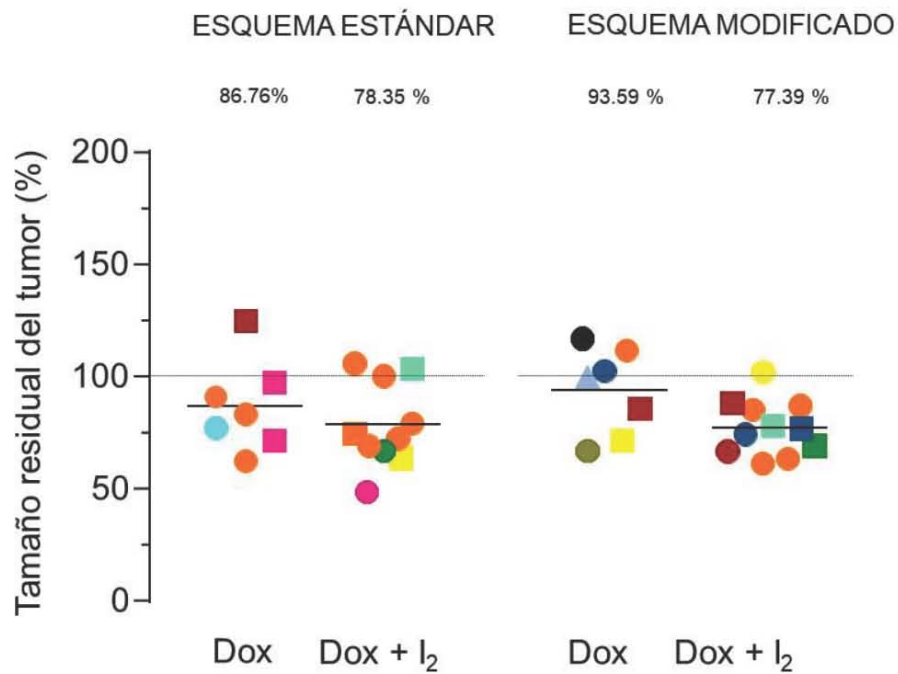
**Figura 9. Perfil electrocardiográfico.** Los valores representan el día de la admisión de la paciente al protocolo (inicial) y una semana antes de la mastectomía (final). Se realizó un ANOVA de una vía para cada variable y no se observaron diferencias significativas.

La figura 10 muestra las microfotografías de los tipos de cáncer observados con más frecuencia teñidas con H&E.



**Figura 10. Caracterización histopatológica de los tipos de tumor en las pacientes (Tinción de H&E, 400 X). a) Carcinoma simple tubular b) Carcinoma ductal c) carcinoma simple quístico papilar d) Carcinoma tipo complejo e) Carcinoma sólido y f) Carcinosarcoma (200X).**

La Figura 11 muestra la clasificación del tumor, el grado histológico y el tamaño del tumor residual. El 91% eran del tipo epitelial, mientras que solo el 9% correspondía al tipo mixto (carcinosarcoma).



**Figura 11. El tamaño residual del tumor (%).** La clasificación histopatológica y el grado de malignidad se analizaron mediante la escala RECIST. Cada punto representa un tumor individual. No se observaron diferencias significativas en la prueba estadística de ANOVA de una vía.

La clasificación histológica mostró que el 60% de los tumores estaban bien diferenciados, el 37% estaba moderadamente diferenciado y solo uno (3%) estaba pobrememente diferenciado. Ningún perro exhibió una respuesta completa (CR). Un paciente de sDOX +

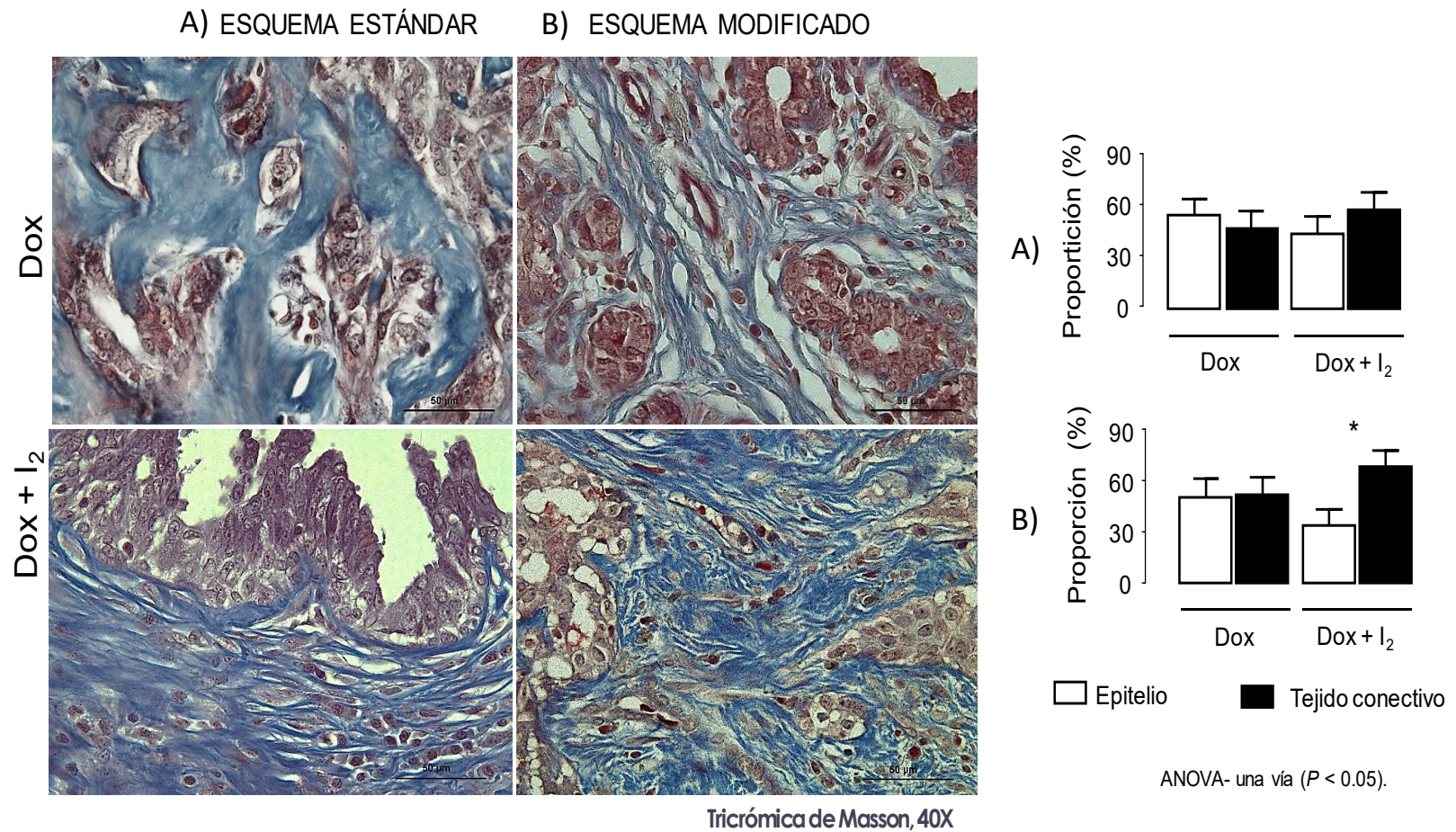


I<sub>2</sub> mostró una respuesta parcial (PR) y uno del grupo sDOX mostró enfermedad progresiva (aumenta  $\geq 25\%$ ). El resto de los tumores (94%) se mantuvieron como enfermedad estable. La tasa de respuesta global para todos los perros fue del 18.0%, donde el tamaño del tumor residual corresponde al 82.0% (intervalo 48-125%). Sin embargo, aunque la respuesta tumoral (tamaño residual) no mostró diferencias estadísticas entre los grupos, la suplementación de I<sub>2</sub> fue acompañada por disminuciones en el tejido epitelial en comparación con el contenido conectivo (Figura 12). Esta observación fue significativa en el grupo mDOX + I<sub>2</sub>, lo que sugiere que I<sub>2</sub> actúa en todos los tipos de tumores al aumentar el efecto antineoplásico de mDOX.

No obstante, lo anterior, un análisis más detallado mostró diferencias significativas en la agresividad tumoral. Con respecto a los tratamientos, la figura 13 muestra el índice inflamatorio.

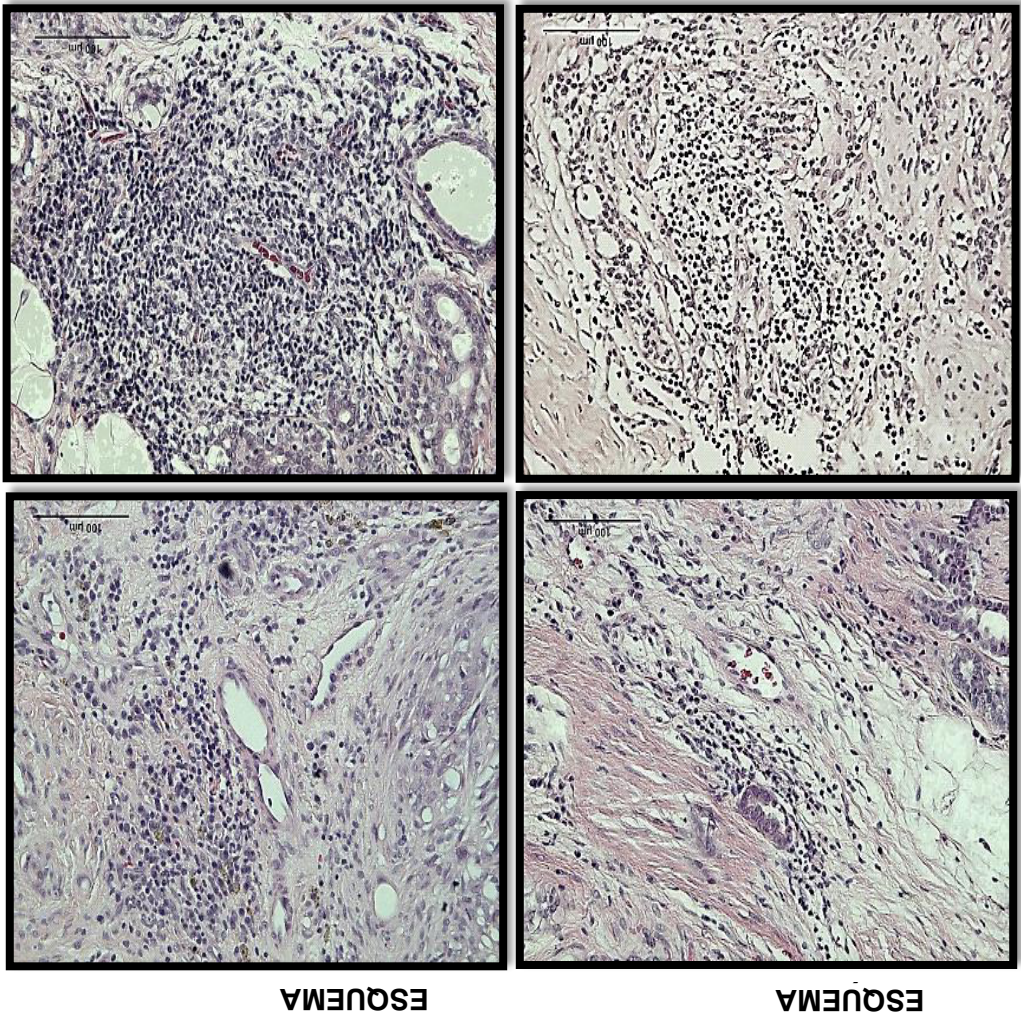
En los grupos de DOX, el índice inflamatorio incrementó, lo que sugiere que la presencia de I<sub>2</sub> reactiva la respuesta inmunológica antitumoral. Se determinó el porcentaje de cambio de los diferentes componentes del tumor, los resultados muestran que el tratamiento de yodo incide diferencialmente en el componente epitelial, disminuyéndolo significativamente. Este dato corrobora estudios previos que indican que el yodo es captado preferentemente por células epiteliales y no del estroma (Aceves *et al.*, 2013).

Se observó un fenómeno interesante en la infiltración linfocítica. La suplementación con I<sub>2</sub> aumenta la presencia de linfocitos en ambos esquemas (Figura 13) y muestra una correlación inversa significativa con la respuesta tumoral (más linfocitos en los tumores de menor tamaño residual).

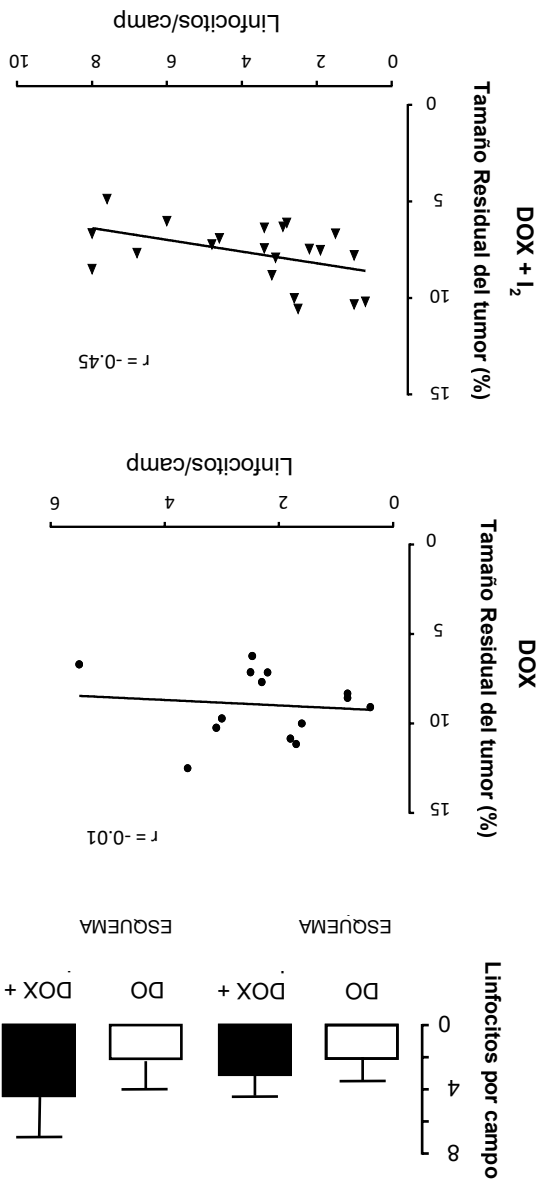


**Figura 12. Proporción de tejido epitelial y conectivo (%) en el tejido residual del tumor.** Micrografía teñida con Tricrómica de Masson (en rojo se observa el epitelio y en azul el tejido conectivo). El análisis cuantitativo se realizó utilizando el promedio de tres regiones aleatorias (400X) usando el programa ImageJ 1.47. Los datos se expresan como media  $\pm$  SD, y el asterisco indica una diferencia significativa entre los grupos. ANOVA de una vía ( $P < 0.05$ ).





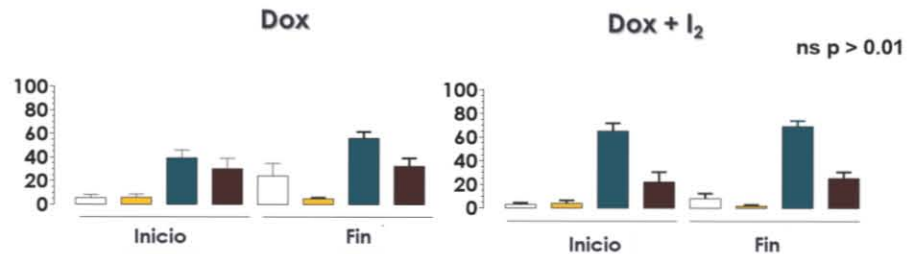
**Figura 13. Efecto de los tratamientos en la infiltración linfocítica.** Micrografías teñidas con H & E (200X). El análisis cuantitativo se realizó como el promedio de tres regiones aleatorias utilizando el programa ImageJ 1.47. Regresión lineal entre el tamaño del tumor residual (%) y el número de linfocitos de los grupos DOX y DOX + I<sub>2</sub>.



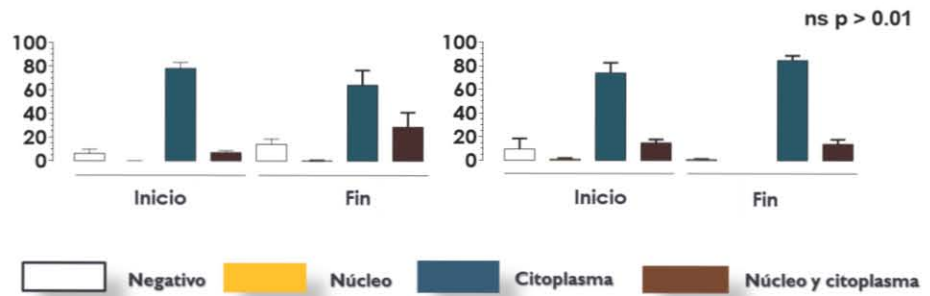


En la Figura 14 se puede observar que el 100% de las muestras son positivas al receptor de estrógenos.

### ESQUEMA ESTÁNDAR

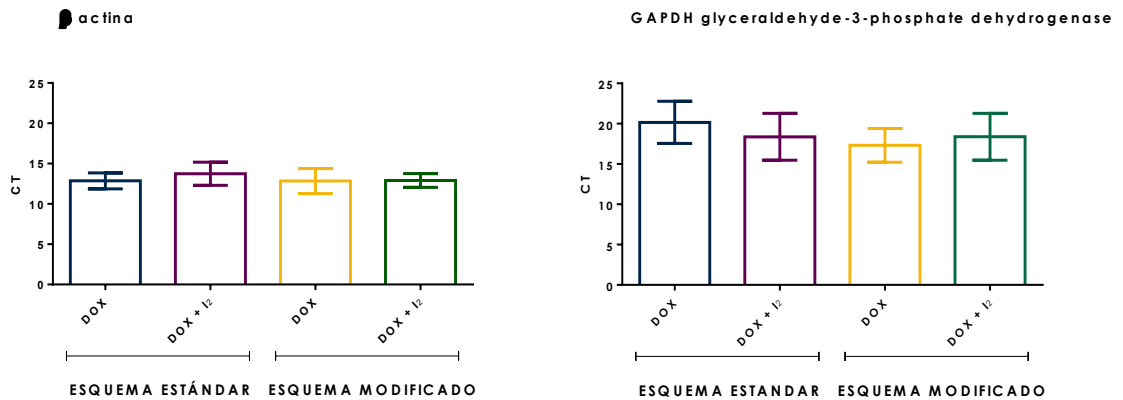


### ESQUEMA MODIFICADO



**Figura 14.** Localización celular del receptor de Estrógeno  $\alpha$ . El receptor de estrógeno alfa no cambio su localización o expresión.  $F(2 \times 2) p < 0.05$  Biopsia (inicio vs fin).

Por otra parte, se analizó la expresión de los genes de referencia  $\beta$ -actina y GAPDH utilizando cDNA de las pacientes en los diferentes protocolos; en la figura 15 puede observarse que los valores son estables en ambos genes. La expresión diferencial de cada gen se normalizó con  $\beta$ -actina.

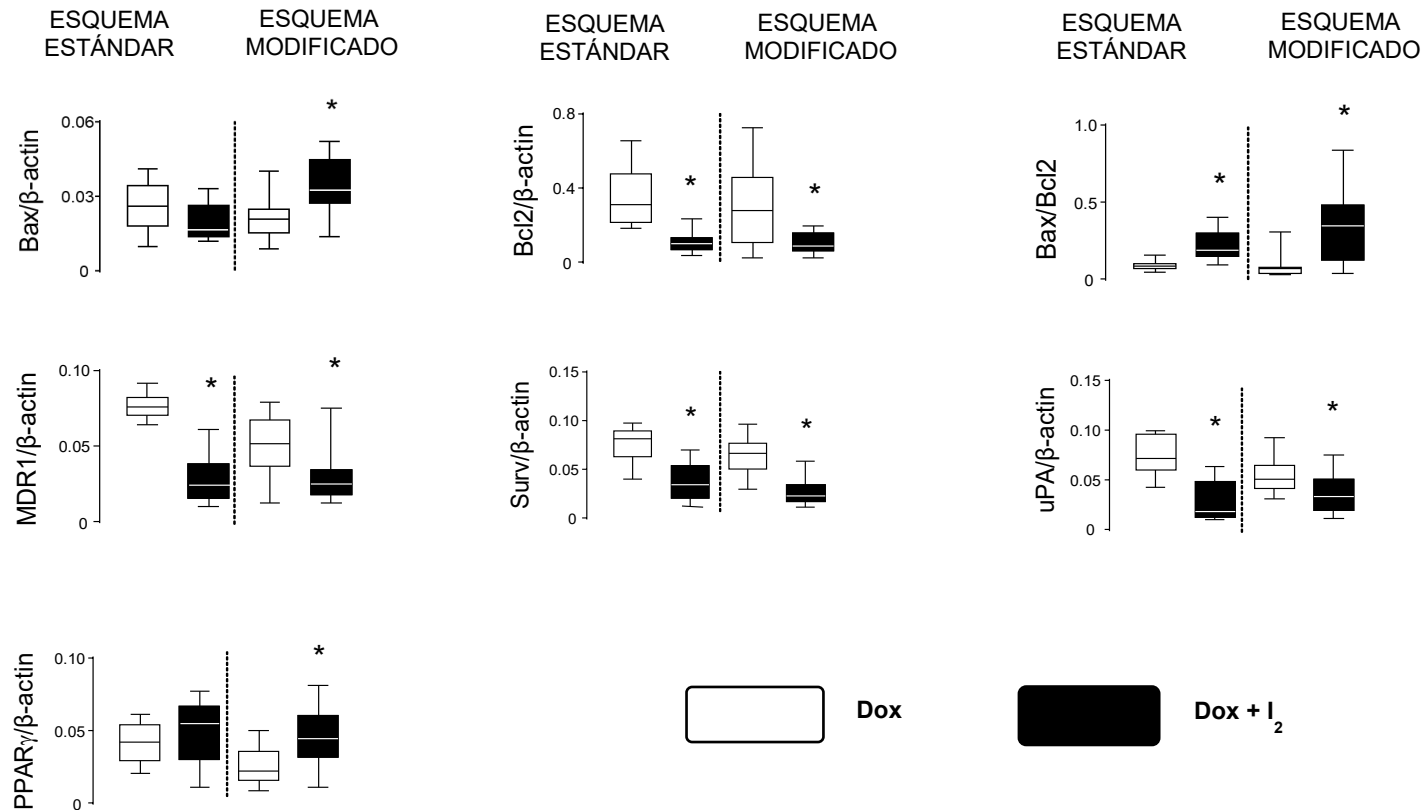


**Figura 15. Análisis de genes de referencia**

En la figura 16 se muestra la respuesta génica de los tratamientos. Se observa que independientemente del esquema de administración, el suplemento de yodo incrementa significativamente la apoptosis (índice Bax/Bcl2) y disminuye los genes de invasión (uPA) y quimiorresistencia (Survivina y MDR1). En el esquema modificado, el suplemento de yodo incrementa significativamente la expresión de los receptores PPAR $\gamma$ . Al respecto, se ha documentado que la activación de estos receptores induce mecanismos de re-diferenciación celular y revierte la instalación de la transición epitelio-mesénquima.

Los análisis moleculares muestran que el tratamiento con I<sub>2</sub> genera respuestas similares en los marcadores apoptóticos e invasivos, independientemente del esquema de administración de DOX. La presencia de I<sub>2</sub> aumenta el índice apoptótico (Bax/Bcl2) y previene la inducción de genes de invasión y quimiorresistencia como MDR1, uPA y Survivina. La combinación de mDOX + I<sub>2</sub> incrementa la expresión de los receptores Bax y PPAR $\gamma$ .

Se ha demostrado que el tejido tumoral contiene doce veces más 6-IL que el tejido mamario normal, y que este yodolípido es un ligando activador de los receptores PPAR $\gamma$ ; el hallazgo de que el suplemento de yodo incrementa la expresión de estos receptores fortalece la hipótesis de que los mecanismos de acción del yodo se realizan a través de la activación de estos receptores (Aceves *et al.*, 2009).



**Figura 16. Efecto de los tratamientos sobre la expresión de marcadores de quimiorresistencia, invasión y diferenciación.** La amplificación RT-qPCR se realizó en tumores residuales analizando índice Bax / Bcl2 como indicador inducción de apoptosis, proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 (MDR1), activador del plasminógeno uroquinasa (uPA), Survivina (Surv) y receptores activados por proliferadores de peroxisoma tipo gamma (PPAR $\gamma$ ). La expresión génica se calculó usando el método del ciclo umbral D y se normalizó al contenido de  $\alpha$ -actina. Los datos se expresan como mediana y los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos DOX y DOX + I<sub>2</sub> en cada tratamiento (Mann-Whitney U; P < 0,05).

Como se mencionó anteriormente, el uso de DOX como monoterapia tiene el beneficio de convertir los tumores irresecables en resecables, pero no de aumentar la supervivencia libre de enfermedad (>207 días). Con esta premisa, todos nuestros pacientes recibieron suplementación de I<sub>2</sub> después de la mastectomía, y el análisis de supervivencia se realizó durante diez meses más (~300 días). El cuadro 4 muestra que la suplementación de I<sub>2</sub> durante todo el tratamiento (antes y después de la cirugía) tiene una supervivencia mejorada libre de enfermedad de 67 y 73% (sDOX + I<sub>2</sub>: 4 perros y mDOX + I<sub>2</sub>: 8 perros, respectivamente) en comparación con el 50% (sDOX: 2 perros; mDOX: 3 perros) observados en aquellos que recibieron I<sub>2</sub> solo en el último período (después de la quimioterapia). Los dos pacientes con metástasis previa (pulmones) recibieron sDOX + I<sub>2</sub> y mDOX + I<sub>2</sub>, cada uno. En el primer caso, desapareció la metástasis y, después de diez meses, el paciente seguía vivo sin recidiva ni metástasis a distancia. En el segundo caso (mDOX + I<sub>2</sub>), la metástasis progresó y el paciente murió cuatro meses después de la cirugía. Dos pacientes (en el grupo sDOX + I<sub>2</sub>) presentaron recidiva local de cáncer de mama siete meses después de la cirugía. Dos pacientes (en el grupo sDOX + I<sub>2</sub>) presentaron recidiva local de cáncer de mama siete meses después de la cirugía. Los tumores fueron eliminados en una segunda cirugía y después de diez meses, ambos aún estaban vivos sin una metástasis evidente. Tres perros murieron por causas independientes del cáncer mamario (dos debido a otros tipos de cáncer y uno debido a complicaciones de piometra).

**Cuadro 4. Análisis de sobrevida**

Raza	Edad (años)	Etapa clínica (TNM)	Sobrevida (10 meses)	Observaciones
<b>Standard scheme (Dox)</b>				
Standard Poodle	12	III	Si	Viva, sin reincidencia
Maltese bichon	9	III	No	Muerta, complicaciones quirúrgicas
Dachshund	13	III	Si	Viva, sin reincidencia
Maltese bichon	7	III	No	Muerta, complicaciones quirúrgicas
<b>Standard scheme (Dox + I<sub>2</sub>)</b>				
Rottweiler	8	III	Si	Viva, sin reincidencia; sin metastasis
Poodle estándar	12	II	Si	Viva, sin reincidencia
Poodle estándar	10	III	Si	Viva, con reincidencia; sin metástasis
Labrador Retriever	10	III	Si	Viva, sin reincidencia
Poodle estándar	12	V	Si	Viva, sin reincidencia
Poodle estándar	9	III	Si	Viva, sin reincidencia
<b>Modified scheme (Dox)</b>				
Cocker Spaniel	9	II	No	Muerta, carcinoma de células transicionales
Mestiza	6	II	No	Eutanasia, sospecha de metastasis
Cocker Spaniel	8	I	Si	Viva, sin reincidencia
Chihuahua	5	I	Si	Viva, sin reincidencia
Pastor Alemán	7	III	No	Muerta, cáncer anaplásico
Dalmata	6	I	Si	Viva, sin reincidencia
<b>Modified scheme (Dox + I<sub>2</sub>)</b>				
Cocker Spaniel	10	III	Si	Viva, sin reincidencia
Mestiza	8	I	Si	Viva, sin reincidencia
Poodle estándar	11	V	No	Muerta, metastasis invasiva
Cocker Spaniel	13	III	Si	Viva, sin reincidencia
Fox terrier Toy	7	I	Si	Viva, sin reincidencia
Poodle estándar	10	III	Si	Viva, sin reincidencia
Cocker Spaniel	13	III	No	Muerta, piometra
Poodle estándar	10	II	Si	Viva, sin reincidencia
Poodle estándar	9	III	Si	Viva, sin reincidencia
Chihuahueño	5	III	Si	Viva, sin reincidencia
Dachshund	10	III	No	Muerta, complicaciones quirúrgicas

## 7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, comparamos dos esquemas de administración de DOX y el efecto adyuvante de I<sub>2</sub> en el cáncer de mama canino. Nuestros resultados mostraron que ambos esquemas de DOX son bien tolerados, ya que ningún paciente exhibió grados elevados (3

o 4 según el VCOG-CTCAE) (Veterinary Cooperative Oncology Group , 2004) de toxicidad, en ninguna condición. Además, el daño cardíaco no fue evidente a través de la actividad de CK-MB en suero o ECG en ningún grupo. La clara atenuación de los eventos adversos observada en mDOX concuerda con los informes previos en humanos en los que la infusión lenta (1 a 6 horas) mostró menos toxicidad (Dalen *et al.*, 2016), lo que sugiere que la farmacocinética de DOX podría ser similar entre humanos y perros. La adición del suplemento I<sub>2</sub> parece atenuar aún más la gravedad de los eventos adversos. Este beneficio podría explicarse por el efecto antioxidante de esta forma química de yodo que *in vitro*, es diez veces más eficiente que el ácido ascórbico y 100 veces más potente que KI (ensayo de potencia de reducción férrica/antioxidante FRAP) (Alfaro *et al.*, 2013). De hecho, informes anteriores de nuestro grupo en un modelo murino de cáncer de mama mostró que la suplementación de I<sub>2</sub> previno la pérdida de peso y la cardiotoxicidad (lipoperoxidación cardíaca y CK-MB sérica) secundaria a DOX, sin deterioro de su acción sinérgica antitumoral (Alfaro *et al.*, 2013).

En cuanto a la respuesta tumoral (RECIST), la respuesta global fue del 18%, lo que demuestra que el 94% de los tumores se mantuvieron como enfermedad estable. Este porcentaje de respuesta es como el descrito por otros autores cuando los fármacos de quimioterapia se usan en forma de monoterapia (Mauri *et al.*, 2005; Wiley *et al.*, 2010; Mestrinho *et al.*, 2012), sin embargo, la importante ventaja observada en los grupos con suplemento de I<sub>2</sub> fue la atenuación significativa del potencial invasivo tumoral corroborada por una inhibición en la expresión de marcadores de quimiorresistencia (MDR1 y Survivina) e invasión (uPA), lo que sugiere un mejor pronóstico. Además, el análisis citológico mostró una disminución significativa en el tejido epitelial, que se considera la fuente de progresión y metástasis tumoral. Este hallazgo concuerda con la literatura que describe que los fibroblastos y el tejido conectivo no capturan I<sub>2</sub>, mientras que varios tipos de epitelio captan este halógeno (Arroyo-Helguera *et al.*, 2008). Además, se conoce que las células cancerosas exhiben entre 10 y 100 veces más sensibilidad a los efectos apoptóticos de I<sub>2</sub> en comparación con su contraparte normal (Rösner *et al.*, 2016; Arroyo-Helguera *et al.*, 2008). Se han propuesto dos vías principales para explicar estos efectos; una directa relacionada con la acción oxidante / antioxidante de I<sub>2</sub> y una indirecta a través de la formación de yodolípidos con actividad biológica. Upadhyay *et al.* , 2002 mostraron que las mitocondrias aisladas del tumor (TT) y el tejido extra-tumoral (TE) de la mama humana

muestran una captación significativa de yodo; pero solo las mitocondrias TT aumentan su permeabilidad y liberan proteínas apoptogénicas, lo que indica una acción proapoptótica directa y diferencial de  $I_2$  en las mitocondrias de las células cancerosas. La vía indirecta implica la generación de un derivado yodado de ácido araquidónico (AA), llamado 6-yodolactona (6-IL). El AA es un lípido esencial de membrana y sus concentraciones elevadas en células cancerosas han sido implicadas en procesos pro-tumorales a través de la formación de prostaglandinas y HETES (Rillema and Mulder, 1978; Razanamahefa *et al.*, 2000). La generación de 6-IL se ha detectado en las glándulas mamarias tumorales de ratas suplementadas con  $I_2$  (Aceves *et al.*, 2009), y este yodolípido es un agonista específico de los receptores PPAR $\gamma$  (Nuñez-Anita *et al.*, 2009). El tratamiento con agonistas de PPAR $\gamma$  inhibe el crecimiento de células cancerosas induciendo la detención del ciclo celular G $_0$ -G $_1$ , promoviendo la diferenciación y revirtiendo la transición epitelio mesénquima (TEM) (Reka *et al.*, 2010). La TEM se caracteriza por la supresión de la expresión de proteínas de adhesión (por ejemplo, E-cadherina) y la inducción de proteínas mesenquimales como N-cadherina o Vimentin. La activación de receptores PPAR $\gamma$  también se acompaña de una disminución en la adquisición de quimiorresistencia mediante la regulación negativa de transportadores de unión a ATP (como MDR1) y marcadores antiapoptóticos como Bcl2, Bcl-xl o Survivina (Wahl and Spike, 2017). En el presente estudio se observó que el suplemento con  $I_2$  en ambos esquemas disminuye la expresión de marcadores asociados a TEM como MDR1, Bcl2, uPA y Survivina y aumenta la expresión de PPAR $\gamma$  reforzando la idea de que  $I_2$  ejerce sus efectos antineoplásicos a través de la activación de PPAR $\gamma$ . Además, la pérdida de capacidad invasiva del tejido canceroso remanente podría explicar la baja tasa de recurrencia y metástasis encontradas en nuestros pacientes incluso después de diez meses.

Otro hallazgo importante de este estudio fue la correlación inversa significativa de la infiltración linfocítica con la respuesta tumoral (tamaño tumoral residual) en muestras de perras suplementados de  $I_2$ . Diversos autores han descrito que la presencia de infiltración linfocítica en tejido de cáncer de mamario humano predice una respuesta positiva de la quimioterapia neoadyuvante, y llevaron a postular que la suplementación de la quimioterapia convencional con activadores del sistema inmune podría ser un paradigma prometedor (Asano *et al.*, 2016; Denkert *et al.*, 2010). El mecanismo específico de  $I_2$  en esta modulación inmunológica no se ha elucidado, pero se ha demostrado que varias

células inmunes pueden captar yodo y dependiendo del contexto celular puede actuar como un agente antiinflamatorio o proinflamatorio (Beukelman *et al.*, 2008; Soriguer *et al.*, 2011). En células polimorfonucleares el suplemento de  $I_2$  suprime la producción de especies reactivas de oxígeno o inhibe la quimiotaxis de neutrófilos (Miyachi and Niwa, 1982; Honma *et al.*, 1990). En contraste, en heridas crónicas, su presencia activa la afluencia de macrófagos y células T (Costa *et al.*, 2013). En condiciones *in vitro*, el yodo aumenta las respuestas de los leucocitos Th1 mediante la secreción de IL-10, IL8-CXCL8 e IL6. Además, en un informe reciente de nuestro laboratorio observamos una respuesta inmunitaria antitumoral similar en xenoinjertos de cáncer mamario cuando los ratones Fox1 nu / nu se suplementaron con  $I_2$  (datos no publicados). Además, la activación de PPAR $\gamma$  podría estar asociada con tales efectos. En una publicación reciente, se demostró que la expresión de PPAR $\gamma$  aumentó casi 5 veces en un régimen de ciclofosfamida metronómica, lo que sugiere que estos receptores contribuyen sustancialmente a la respuesta inmune de este tratamiento (McCarty *et al.*, 2008).

Por último, nos interesó analizar el efecto del suplemento de  $I_2$  sobre la supervivencia cuando DOX se aplica como monoterapia. Solo hay tres informes previos que analizan este parámetro usando la DOX como quimioterapia neoadyuvante en caninos (Mauri *et al.*, 2005; Wiley *et al.*, 2010; Mestrinho *et al.*, 2012) encontraron que el tiempo de supervivencia podría extenderse significativamente con terapias combinadas (dos o tres fármacos más radioterapia), aumentando la media de supervivencia libre de enfermedad a 12 meses (intervalo 213-521 días). En contraste, la supervivencia libre de enfermedad solo dura 7 meses (217 días) cuando se usa DOX como monoterapia (Wiley *et al.*, 2010). Nuestro estudio incluyó un análisis de diez meses (~300 días), que mostró que durante este tiempo la supervivencia libre de enfermedad general fue del 62%. El yodo aumenta la supervivencia del paciente cuando se suministra desde el inicio del tratamiento (67% en sDOX +  $I_2$  y 73% en mDOX +  $I_2$ ), y aumenta en un 50% en ambos tratamientos cuando se administra solo después de la cirugía. En el primer caso, el  $I_2$  podría actuar en dos niveles; primero, aumentando los efectos antineoplásicos de DOX en el sitio tumoral (inducción de diferenciación celular, prevalencia de un fenotipo menos invasivo y/o activación de la respuesta inmune) y segundo, como antioxidante, disminuyendo el daño oxidativo en tejidos normales (digestivo, anemia, etc.) causado por DOX. El beneficio después de la cirugía podría estar relacionado con el efecto antiproliferativo de  $I_2$  *per se*. Varios estudios han



informado que este efecto antiproliferativo del I<sub>2</sub> en patologías mamarias o prostáticas (hiperplasia, fibrosis de glándulas mamarias o cáncer) es útil solo si el suplemento I<sub>2</sub> se mantiene en concentraciones moderadamente altas (miligramos), mientras que su supresión reanuda la progresión patológica (Aceves *et al.*, 2009). Estos efectos concuerdan con estudios epidemiológicos que sugieren que la baja incidencia de cáncer mamario y prostático en la población japonesa se asocia a consumos milimolares de yodo y que el cambio en su dieta (bajo consumo de yodo) revierte los factores protectores (Zava and Zava, 2011).

## 8. CONCLUSIONES

- El esquema de administración modificado de DOX, (intervalos de 15 días y lenta infusión; 60 minutos) disminuye la severidad de los efectos secundarios observados en el tratamiento convencional.
- El suplemento de yodo, independientemente del esquema de DOX, disminuye proporción epitelio/tejido conectivo y reduce los marcadores de invasión y quimiorresistencia haciendo menos agresivos los tumores.
- El suplemento de yodo a largo plazo (hasta 10 meses) no se acompaña de alteraciones en la función tiroidea (niveles de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>) y aumenta la sobrevida de los pacientes en un 63% en comparación con lo reportado en la literatura con esquemas similares de quimioterapia.

Proponemos al tratamiento modificado DOX + I<sub>2</sub> como un protocolo eficaz, seguro y susceptible a mejorarse con menores dosis de DOX en el tratamiento del cáncer mamario canino.

## 9. REFERENCIAS

- Aceves C. Anguiano B. and Delgado G. The Extrathyronine Actions of Iodine as Antioxidant, Apoptotic, and Differentiation Factor in Various Tissues. *Thyroid*. 2013; 23 (8): 938–946.
- Aceves C. García-Solís P. Arroyo-Helguera O. Vega-Riveroll L. Delgado G. and Anguiano B. Antineoplastic effect of iodine in mammary cancer: participation of 6-iodolactone (6-IL) and peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Mol Cancer*. 2009; 8: 33.
- Aceves C. Peralta G. Torres J. Delgado G. Domínguez A. Obaldía R De. Duarte L. Paredes E. and Vecilla C. Iodine-supplemented diets prevents the development of resistance in breast cancer chemotherapy: Participation of proliferative peroxisome-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ). In *AACR Spec Conf Adv Breast Cancer Res*. 2011; San Francisco, CA.
- Alfaro Y. Delgado G. Cárabez A. Anguiano B. and Aceves C. Iodine and doxorubicin, a good combination for mammary cancer treatment: antineoplastic adjuvancy, chemoresistance inhibition, and cardioprotection. *Mol Cancer*. 2013; 12: 45.
- Alvarez FJ. Hosoya K. García AL. Kisseberth W. and Guillermo Couto. VAC Protocol for Treatment of Dogs with Stage III Hemangiosarcoma. *Am Anim Hosp Assoc*. 2013; 49 (6) 370-377.
- Angsutararux P. Luanpitpong S. and Issaragrisil S. Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity: Overview of the Roles of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2015; doi: 10.1155/2015/795602.
- Arroyo-Helguera O. Anguiano B. Delgado G. and Aceves C. Uptake and antiproliferative effect of molecular iodine in the MCF-7 breast cancer cell line. *Endocr Relat Cancer*. 2006; 13 (4): 1147–1158.
- Arroyo-Helguera O. Rojas E. Delgado G. and Aceves C. Signaling pathways involved in the antiproliferative effect of molecular iodine in normal and tumoral breast cells: Evidence that 6-iodolactone mediates apoptotic effects. *Endocr Relat Cancer*. 2008; 15 (4): 1003–1011.
- Asano Y. Kashiwagi S. Goto W. Kurata K. Noda S. Takashima T. Onoda N. Tanaka S. Ohsawa M. and Hirakawa K. Tumour-infiltrating CD8 to FOXP3 lymphocyte ratio in predicting treatment responses to neoadjuvant chemotherapy of aggressive breast cancer. *Br J Surg*. 2016; 103 (7): 845–854.

- Beauvais W. Cardwell JM. and Brodbelt DC. The effect of neutering on the risk of mammary tumours in dogs--a systematic review. *J Small Anim Pract.* 2012; 53 (6): 314–322.
- Betz D. Schoenrock D. Mischke R. Baumgärtner W. and Nolte I. Postoperative treatment outcome in canine mammary tumors. Multivariate analysis of the prognostic value of pre- and postoperatively available information. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere.* 2012; 40 (4): 235–242.
- Beukelman C. Berg A van den. Hoekstra M. Uhl R. Reimer K. and Mueller S. Anti-inflammatory properties of a liposomal hydrogel with povidone-iodine (Repithel) for wound healing in vitro. *Burns.* 2008; 34 (6): 845–855.
- Biller B. Metronomic Chemotherapy in Veterinary Patients with Cancer: Rethinking the Targets and Strategies of Chemotherapy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2014; 44 (5): 817–829.
- Chandra SA. Mark Cline J. and Adler RR. Cyclic morphological changes in the beagle mammary gland. *Toxicol Pathol.* 2010; 38 (6): 969–83.
- Costa RO. Macedo PM De. Carvalhal A. and Bernardes-Engemann AR. Use of potassium iodide in Dermatology: updates on an old drug. *An Bras Dermatol.* 2013; 88 (3): 396–402.
- Dalen EC van. Pal HJ van der. and Kremer LC. Different dosage schedules for reducing cardiotoxicity in people with cancer receiving anthracycline chemotherapy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016; 3: 1–5. doi: 10.1002 / 14651858.CD005008.pub4.
- De Buen de Argüero Nuria. *Citología diagnóstica Veterinaria.* México: El manual Moderno; 2001.
- Denkert C. Loibl S. Noske A. Roller M. Müller BM. Komor M. Budczies J. et al. Tumor-Associated Lymphocytes As an Independent Predictor of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2010; 28 (1): 105–113.
- Dobson JM, Hohenhaus EA and Peaston EA. Cancer chemotherapy. In *Small Anim Clin Pharmacol.* 2nd ed. Philadelphia (USA): Saunders Elsevier; 2008
- Dobson JM. Breed-Predispositions to Cancer in Pedigree Dogs. *Vet Sci.* 2013; 10.1155 / 2013/941275.
- Doré M. Cyclooxygenase-2 expression in animal cancers. *Vet Pathol.* 2011; 48 (1): 254–65.
- Evans HE. and Lahunta A de. *Miller's anatomy of the dog.* 4th ed. St. Louis, Missouri (USA): Saunders Elsevier; 2013.
- Finotello R. Stefanello D. Zini E. and Marconato L. Comparison of doxorubicin-

- cyclophosphamide with doxorubicin-dacarbazine for the adjuvant treatment of canine hemangiosarcoma. *Vet Comp Oncol.* 2015; 15 (1): 9–11.
- Giovacchini G. Giovanella L. Haldemann A. Staub U. Füchsel FG. and Koch P. Potentiometric measurement of urinary iodine concentration in patients with thyroid diseases with and without previous exposure to non-radioactive iodine. *Clin Chem Lab Med.* 2015; 53 (11): 1753-1760.
- Goldschmidt M. Peña L. Rasotto R. and Zappulli V. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol.* 2011; 48 (1): 117–131.
- Gupta K. Sood NK. Uppal SK. Mohindroo J. Mahajan S. Raghunath M. and Singh K. Epidemiological Studies on Canine Mammary Tumour and its Relevance for Breast Cancer Studies. *IOSR J of Pharm.* 2012; 2 (2): 322–333.
- Honma K. Saga K. Onodera H. and Takahashi M. Potassium iodide inhibits neutrophil chemotaxis. *Acta Dermato- Venereol.* 1990; 70 (3): 247–49.
- Im KS. Kim IH. Kim NH. Lim HY. Kim JH. and Sur JH. Breed-related differences in altered BRCA1 expression, phenotype and subtype in malignant canine mammary tumors. *Vet J.* 2013; 195 (3): 366–72.
- Jooste PL. and Strydom E. Methods for determination of iodine in urine and salt. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2010; 24 (1): 77–88.
- Kim H-W. Lim H-Y. Shin J-I. Seung B-J. Ju J-H. and Sur J-H. Breed- and age-related differences in canine mammary tumors. *Can J Vet Res.* 2016; 80 (2): 146–155.
- Klopfleisch R. Euler H von. Sarli G. Pinho SS. Gärtner F. and Gruber AD. Molecular Carcinogenesis of Canine Mammary Tumors. *Vet Pathol.* 2011; 48 (1): 98–116.
- Komazawa S. Sakai H. Itohi Y. Kawabe M. Murakami M. Mori T. and Maruo K. Canine tumor development and crude incidence of tumors by breed based on domestic dogs in Gifu prefecture. *J Vet Med Sci.* 2016; 78 (8): 1269–1275.
- Lana SE. Rutteman GR. and Withrow SJ. Tumors of the Mammary Gland. In *Small Anim Clin Oncol.* 4th ed. St. Louis, Missouri (USA): Stephen J. Withrow and David M. Vail; 2007.
- Lawrence J. Cameron D. and Argyle D. Species differences in tumour responses to cancer chemotherapy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015; 370 (1673): 11–14.
- Lee C. Kim W. Lim J. Kang M. Kim D. and Kweon O. Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *J Vet Sci.* 2004; 5 (1): 63–69.
- Lim HY. Im KS. Kim NH. Kim HW. Shin JI. and Sur JH. Obesity, expression of

- adipocytokines, and macrophage infiltration in canine mammary tumors. *Vet J.* 2015; 203 (3): 326–331.
- Lutful Kabir F. Alvarez C. and Bird R. Canine Mammary Carcinomas: A Comparative Analysis of Altered Gene Expression. *Vet Sci.* 2015; 3 (1): 1–21.
- Matos AJF and Santos AA. Advances in the understanding of the clinically relevant genetic pathways and molecular aspects of canine mammary tumours: Part 1. Proliferation, apoptosis and DNA repair. *Vet J.* 2015; 205 (2): 136–143.
- Mauri D. Pavlidis N. and Ioannidis J. Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: A meta-analysis. *J Ntl Cancer Inst.* 2005; 97 (3): 188–194.
- McCarty MF. Barroso-Aranda J. and Contreras F. PPAR gamma agonists can be expected to potentiate the efficacy of metronomic chemotherapy through CD36 up-regulation. *Med Hypotheses.* 2008; 70 (2): 419–423.
- Mendecki L. Chen X. Callan N. Thompson DF. Schazmann B. Granados-Focil S. and Radu A. Simple, Robust, and Plasticizer-Free Iodide-Selective Sensor Based on Copolymerized Triazole-Based Ionic Liquid. *Anal Chem.* 2016; 88 (8): 4311–4317.
- Mestrinho LA. Bernardo E. Niza M. Lloret A. and Buracco P. Neoadjuvant chemoradiotherapy and surgery as treatment for oral maxillary squamous cell carcinoma in a dog. *Aust Vet J.* 2012; 90 (7): 264–268.
- Misdorp W. Tumors of the Mammary Gland. In *Tumours Domestic Anim.* 4th ed. Iowa (USA): Donald J Meuten; 2002.
- Miyachi Y. and Niwa Y. Effects of potassium iodide, colchicine and dapsone on the generation of polymorphonuclear leukocyte-derived oxygen intermediates. *Br J Dermatol.* 1982; 107 (2): 209–214.
- Mordente A. Meucci E. Silvestrini A. Martorana GE. and Giardina B. Anthracyclines and Mitochondria. In *Advances in Mitochondrial Medicine.* Rome (Italy): Springer Science+Business Media B.V; 2012.
- Mross K. and Steinbild S. Metronomic anti-cancer therapy – an ongoing treatment option for advanced cancer patients. *J Cancer Ther Res.* 2012; 1 (1): 32.
- Mutsaers AJ. Chemotherapy: New Uses for Old Drugs. *Vet Clin Small Anim Pract.* 2007; 37 (6): 1079–1090.
- Mutsaers AJ. Metronomic Chemotherapy. *Top Companion Anim Med.* 2009; 24 (3): 137–43.
- Nuñez-Anita RE. Arroyo-Helguera O. Cajero-Juárez M. López-Bojorquez L. and Aceves C.

- A complex between 6-iodolactone and the peroxisome proliferator-activated receptor type gamma may mediate the antineoplastic effect of iodine in mammary cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2009; 89 (1–2): 34–42.
- Octavia Y. Tocchetti CG. Gabrielson KL. Janssens S. Crijns HJ. and Moens AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol.* 2012; 52 (6): 1213–1225.
- Orfanou DC. Poulis A. Ververidis HN. Mavrogianni VS. Taitzoglou IA. Boscos CM. and Fthenakis GC. Histological features in the mammary glands of female dogs throughout lactation. *J Vet Med Ser C Anat Histol Embryol.* 2010; 39 (5): 473–478.
- atsikas M.N. and Dessiris A. The Lymph Drainage of the Mammary Glands in the Bitch: a Lymphographic Study Part II: The 3rd Mammary Gland. *Anat Histol Embryol.* 1996; 25: 139–146.
- Patsikas MN. Karayannopoulou M. Kaldrymidoy E. Papazoglou LG. Papadopoulou PL. and Tzegas SI. The Lymph Drainage of the Neoplastic Mammary Glands in the Bitch: A Lymphographic Study. *Anat Histol Embryol.* 2006; 234: 228–34.
- Pawłowski KM. Mucha J. Majchrzak K. Motyl T. and Król M. Expression and role of PGP, BCRP, MRP1 and MRP3 in multidrug resistance of canine mammary cancer cells. *BMC Vet Res.* 2013; 9: 119.
- Pena L. De Andres PJ. Clemente M. Cuesta P. and Perez-Alenza MD. Prognostic Value of Histological Grading in Noninflammatory Canine Mammary Carcinomas in a Prospective Study With Two-Year Follow-Up: Relationship With Clinical and Histological Characteristics. *Vet Pathol.* 2012; 50 (1): 94–105.
- Peralta G, Torres JM, Delgado G, Domínguez A, De Obaldía L, Duarte E, Paredes C, Avecilla S, Hernández L, Riveroll V and Aceves C. Iodine exhibits dual effects on breast cancer as a co-treatment with anthracyclines: antineoplastics synergy and cardioprotector. In *AACR Spec Conf Adv Breast Cancer Res.* 2011; Orlando FL.
- Pérez-Alenza MD. Rutteman G. Peña L. and Cuesta PL. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. *J Vet Intern Med.* 1998; 12: 132–39.
- Preedy VR. Burrow GN. Watson R. and Jooste PL. Knowledge of Iodine Nutrition. In *Compr Handb Iodine.* San Diego, California (USA); 2009.
- Preedy VR. Burrow GN. Watson R. Yun AJ. and Doux JD. Iodine in the Ecosystem: An Overview. In *Compr Handb Iodine.* San Diego, California (USA); 2009.
- Queiroga FL. Contribution of cyclo-oxygenase-2 to the angiogenic switch in canine

- inflammatory mammary carcinomas. *Vet J.* 2013; 197: 124–125.
- Queiroga FL. Pires I. Parente M. Gregório H. and Lopes CS. COX-2 over-expression correlates with VEGF and tumour angiogenesis in canine mammary cancer. *Vet J.* 2011; 189 (1): 77–82.
- Razanamahefa L. Prouff S. and Bardon S. Stimulatory effect of arachidonic acid on T-47D human breast cancer cell growth is associated with enhancement of cyclin D1 mRNA expression. *Nutr Cancer.* 2000; 38 (2): 274–280.
- Reif JS. The Epidemiology and incidence of Cancer. In *Small Anim Clin Oncol.* 4th ed. St. Louis, Missouri (USA): Stephen J. Withrow and David M. Vail; 2007.
- Reka AK. Kurapati H. Narala VR. Bommer G. Chen J. Standiford TJ. and Keshamouni VG. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- Activation Inhibits Tumor Metastasis by Antagonizing Smad3-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition. *Mol Cancer Ther.* 2010; 9 (12): 3221–3232.
- Rillema JA. and Mulder JA. Arachidonic acid distribution in lipids of mammary glands and dmba-induced tumors of rats. *Prostaglandines Med.* 1978; 1 (1): 31–38.
- Rivera P. and Euler H von. Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors. *Vet Pathol.* 2011; 48 (1): 132–146.
- Rodolfo G. Conde J. Reiono JGG. Lago F. and Gualillo O. Las adipocinas : mediadores emergentes de la respuesta inmune y de la inflamación. *Reumatol Clin.* 2009; 5: 6–12.
- Romiti A. Falcone R. Roberto M. and Marchetti P. Current achievements and future perspectives of metronomic chemotherapy. *Invest New Drugs.* 2017; 35 (3): 359–74.
- Rösner H. Möller W. Groebner S. and Torremante P. Antiproliferative / cytotoxic effects of molecular iodine , povidone-iodine and Lugol ' s solution in different human carcinoma cell lines. *Oncol Lett.* 2016; 12: 2159–2162.
- Salas Y. Márquez A. Diaz D. and Romero L. Epidemiological study of mammary tumors in female dogs diagnosed during the period 2002-2012: A growing animal health problem. *PLoS One.* 2015; 10 (5): 1–15.
- Santos M. Marcos R. and Faustino A. Histological Study of Canine Mammary Gland During the Oestrous Cycle. *Reprod Domest Anim.* 2010; 45 (5): 146–154.
- Seluanov A. Gladyshev VN. Vijg J. and Gorbunova V. Mechanisms of cancer resistance in long- lived mammals. *Nat Rev Cancer.* 2018; 18 (7): 433–441.
- Seymour L. Bogaerts J. Perrone A. Ford R. Schwartz LH. Mandrekar S. Lin NU. *et al.* RECIST: guidelines for response criteria for use in trials testing immunotherapeutics.

- Lancet Oncol. 2017; 18 (3): 143–152.
- Shin JI. Lim HY. Kim HW. Seung BJ. Ju JH. and Sur JH. Analysis of Obesity-Related Factors and their Association with Aromatase Expression in Canine Malignant Mammary Tumours. J Comp Pathol. 2016; 155 (1): 15–23.
- Silver I. The Anatomy of the Mammary Gland of the Dog and Cat. J Small Anim Pr. 1966; 7 (September): 689–696.
- Simon D. Schoenrock D. Baumgartner W. and Ingo N. Postoperative Adjuvant Treatment of Invasive Malignant Mammary Gland Tumors in Dogs with Doxorubicin and Docetaxel. J Vet Intern Med. 2006; 20: 1184–1190.
- Sleeckx N. Rooster H de. Veldhuis Kroeze E. Ginneken C Van. and Brantegem L Van. Canine Mammary Tumours, an Overview. Reprod Domest Anim. 2011; 46 (6): 1112–1131.
- Sontas BH. Ozyogurtcu H. Gurel A. and Ekici H. Evaluation of clinical and pathological characteristics of 155 canines with mammary tumours: A retrospective study. Arch Med Vet. 2009; 41 (1): 53–59.
- Sorenmo KU. Rasotto R. Zappulli V. and Goldschmidt MH. Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms. Vet Pathol. 2011; 48 (1): 85–97.
- Soriguer F. Gutiérrez-Repiso C. Rubio-Martin E. Linares F. Cardona I. López-Ojeda J. Pacheco M. *et al.* Iodine intakes of 100–300 µg/d do not modify thyroid function and have modest anti-inflammatory effects. Br J Nutr. 2011; 105 (12): 1783–1790.
- Steenbruggen TG. Ramshorst MS van. Kok M. Linn SC. Smorenburg CH. and Sonke GS. Neoadjuvant Therapy for Breast Cancer: Established Concepts and Emerging Strategies. Drugs. 2017; 77 (12): 1313–1336.
- Stratmann N. Failing K. Richter A. and Wehrend A. Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy. Vet Surg. 2008; 37 (1): 82–86.
- Tomcik P. and Bustin D. Voltammetric determination of iodide by use of an interdigitated microelectrode array. Anal Bioanal Chem. 2001; 371 (4): 562-564.
- Upadhyay G. Singh R. Sharma R. Balapure AK. and M. Godbole M. Differential action of iodine on mitochondria from human tumoral- and extra-tumoral tissue in inducing the release of apoptogenic proteins. Mitochondrion. 2002; 2: 199–210.
- Uva P. Aurisicchio L. Watters J. Loboda A. Kulkarni A. Castle J. Palombo F. *et al.*



- Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BMC Genomics*. 2009; doi: 10.1186 / 1471-2164-10-135.
- Varga T. Czimmerer Z. and Nagy L. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2011; 1812 (8): 1007–1022.
- Venturi S. Evolutionary Significance of Iodine. *Curr Chem Biol*. 2011; 5 (November): 155–62.
- Veterinary Cooperative Oncology Group. Common Terminology Criteria for Adverse Events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.0. *Vet Comp Oncol*. 2004; 2 (4): 195–213.
- Voutilainen M. Molecular Regulation of Embryonic Mammary Gland Development Molecular Regulation of Embryonic Mammary Gland Development (PhD thesis). Helsinki; Finlandia. University of Helsinki; 2013
- Wahl GM. and Spike BT. Cell state plasticity, stem cells, EMT, and the generation of intratumoral heterogeneity. *Npj Breast Cancer*. 2017; 3 (1): 14.
- Wiley JL. Rook KA. Clifford CA. Gregor TP. and Sorenmo KU. Efficacy of doxorubicin-based chemotherapy for non-resectable canine subcutaneous haemangiosarcoma. *Vet Comp Onc*. 2010; 8 (3): 221–233.
- Wittenburg LA. Thamm DH. and Gustafson DL. Development of a limited-sampling model for prediction of doxorubicin exposure in dogs. *Vet Comp Oncol*. 2014; 12 (2): 114–119.
- Yang F. Teves SS. Kemp CJ. and Henikoff S. Biochimica et Biophysica Acta Doxorubicin , DNA torsion , and chromatin dynamics. *BBA - Rev Cancer*. 2014; 1845 (1): 84–89.
- Zava TT. and Zava DT. Assessment of Japanese iodine intake based on seaweed consumption in Japan: A literature-based analysis. *Thyroid Res*. 2011; 4 (1): 14.
- Zavlaris M. Angelopoulou K. Vlemmas I. and Papaioannou N. Telomerase Reverse Transcriptase ( TERT ) Expression in Canine Mammary Tissues : A Specific Marker for Malignancy ? . *Anticancer Res*. 2009; 29 (1): 319–325.
- Zhang W. Mnatsakanov A. Hower R. Cantor H. and Wang Y. Urinary iodine assays and ionophore based potentiometric iodide sensors. *Front Biosci*. 2005; 10 (August): 88–93.

## 10. ANEXOS

- **Anexo 1.** Evaluación clínica inicial
- **Anexo 2.** Encuesta para evaluar la salud y la calidad de vida relacionada con la quimioterapia en el cáncer mamario canino
- **Anexo 3.** Evaluación anatomopatológica
- **Anexo 4.** Artículo publicado en la revista BMC Veterinary Record

Zambrano-Estrada X, Landaverde-Quiroz B, Dueñas-Bocanegra AA, De Paz-Campos MA, Hernández-Alberto G, Solorio-Perusquia B, Trejo-Mandujano M, Pérez-Guerrero L, Delgado-González E, Anguiano B, Aceves C. Molecular iodine/doxorubicin neoadjuvant treatment impair invasive capacity and attenuate side effect in canine mammary cancer. BMC Vet Res. 2018 Mar 12;14(1):87. doi: 10.1186/s12917-018-1411-6.



**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA. UNAM, Campus Juriquilla,  
HOSPITAL VETERINARIO DE ESPECIALIDADES EN PEQUEÑAS ESPECIES/UAQ  
HOSPITAL DE PEQUEÑAS ESPECIES FES-C/UNAM**



## CMC. Evaluación inicial

**Expediente:** \_\_\_\_\_ **Fecha de evaluación inicial** \_\_\_\_\_

Propietario \_\_\_\_\_

Dirección \_\_\_\_\_ Tel. casa \_\_\_\_\_

Cel. \_\_\_\_\_ correo electrónico: \_\_\_\_\_

**HISTORIA CLÍNICA:** Nombre \_\_\_\_\_ Raza \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_

Desde cuando tiene a su mascota:	Qué enfermedades y en qué fecha ha padecido:
Ha estado expuesto recientemente a animales enfermos:	
Convive con otros animales:	
Ha presentado alguna reacción adversa a algún medicamento:	
Lugar y tipo de alojamiento:	
Ejercicio:	Frecuencia: Tipo:
Evolución del crecimiento tumoral:	
¿Ha recibido algún tratamiento para los tumores de glándula mamaria:	

### ◆ ALIMENTACIÓN

<b>Alimento:</b>			
Casero: Tipo _____	Cantidad: _____	Frecuencia: _____	Horario: _____
Comercial: Marca _____	Cantidad: _____	Frecuencia: _____	Horario: _____
<b>Agua:</b>			

### ◆ SISTEMA DIGESTIVO

<b>Apetito:</b> Anorexia / Normal / Hiporexia / Selectivo:	<b>Ingestión de agua (&lt;, &gt; o =):</b>
<b>Vomito:</b> Descripción:	<b>Relacionado con las comidas:</b>
<b>Frecuencia:</b>	<b>Relacionado con las comidas:</b>
Deglución: Con dolor:	Flatulencia: Estreñimiento:
<b>Frecuencia de evacuaciones:</b> Normal, incrementada, disminuida	
<b>Consistencia:</b> Firme, pastosa, líquida, dura Apariencia:	

### ◆ SISTEMA GENITOURINARIO

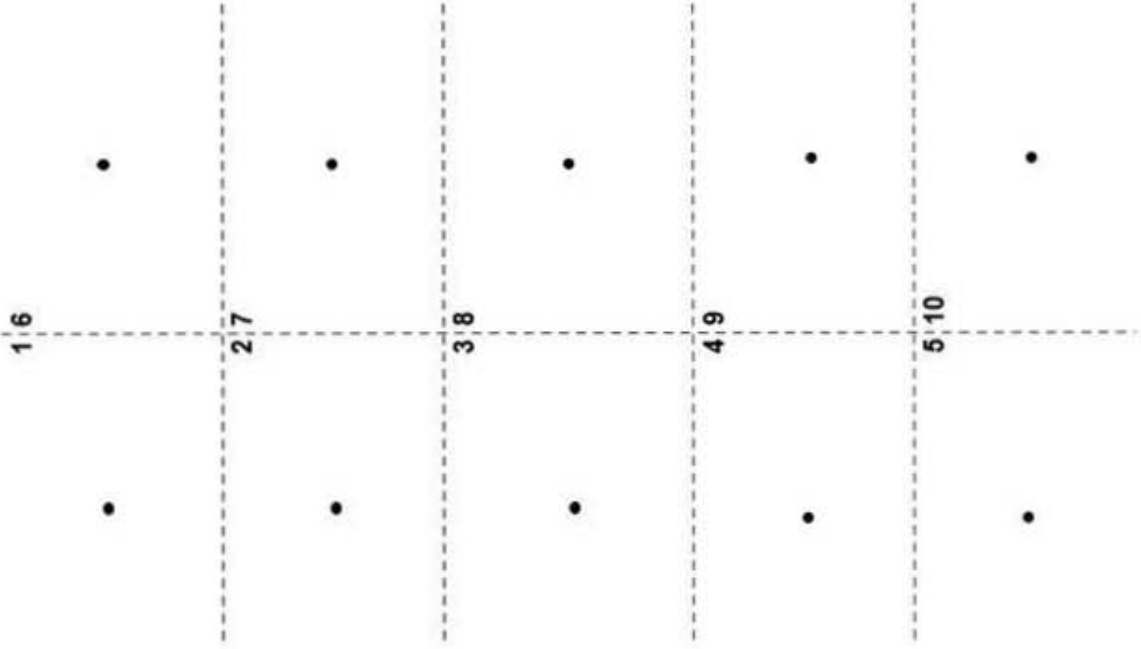
<b>Salpingo-ovario-histerectomía:</b>	<b>Tratamiento para aborto o el celo:</b>	<b>Ultimo celo:</b>
<b>Número de partos:</b>	<b>Fechas de partos:</b>	<b>Signos de pseudogestación (Pseudociesis):</b>
<b>Descarga vaginal:</b>	<b>Tipo:</b> sanguinolenta / purulenta / mucosa	
<b>Producción de orina:</b> Normal Poliuria Oliguria Anuria		
<b>Características de la micción:</b> Normal / Polaquiuria / Disuria / Estranguria		
<b>Características de la orina:</b> Normal / Hematuria	<b>Horario de micción:</b> Normal / Nocturia	
Color: Olor:		

### ◆ SISTEMA MUSCULO ESQUELÉTICO

Anormalidades cuando camina:	Miembro afectado:	¿Dolor en alguna región?
Es intermitente o constante:	Se incrementa o desaparece con el ejercicio:	
Ha empeorado o mejorado el problema:	Se mejora con medicamentos:	



VISTA VENTRO DORSAL  
 CADENA DERECHA      CADENA IZQUIERDA



CARACTERÍSTICAS		TUMOR ANALIZADO			OBSERVACIONES
<b>DIMENSIONES</b>					
Largo					
Ancho					
Profundidad					
<b>FORMA</b>					
Nodular					
Multinodular					
Otro					
<b>DISTRIBUCION</b>					
Focal					
Multifocal					
Coalescentes					
Zonal					
Zonalmente extensiva					
Difusa (en toda la GM)					
<b>SUPERFICIE</b>					
Elevada					
Deprimida					
Plana					
<b>CONSISTENCIA</b>					
Suave					
Firme					
Duro					
Crepita (cruje)					
<b>ADHESION</b>					
Se desplaza					
No desplazable					
<b>OTROS</b>					
Úlcera (s)					
Costras (s)					
Hemorragias (s)					
Exudado (tipo)					
Cambio de color					
Quiiste (s)					
PAAF					
BIOPSIA					
<b>OBSERVACIONES</b>					

◆ ESCALA DE VALOR FUNCIONAL: \_\_\_\_\_

◆ LISTA DE PROBLEMAS

Lista de problemas	Dx diferenciales	Dx presuntivo	Plan Dx	Observaciones

◆ CONTROL DE MUESTRAS Y ESTUDIOS

MUESTRA (Características y cantidad)	CONSERVACION	ESTUDIO	OBSERVACIONES
SANGRE COMPLETA c/EDTA, microtainer 0,5 mL	Refrigeración	Hemograma	
SANGRE SIN ANTICOAGULANTE, mínimo 3 mL ó suero 1.0 mL	Congelación	GS Completa	
SANGRE SIN ANTICOAGULANTE, mínimo 2 mL ó suero 0.5 mL	Congelación	TSH	
SANGRE SIN ANTICOAGULANTE, mínimo 2 mL ó suero 0.5 mL	Congelación	T3	
ORINA, 5 mL Proteger de la luz. Indicar método de obtención	Refrigeración	EGO	
ORINA 1 mL Proteger de la luz	Congelación	Yodo	
		Rayos X (VD y LI-LD)	
		Ultrasonido	

◆ ETAPA CLINICA DEL CÁNCER :

I   
  II   
  III   
  IV   
  V

Observaciones:



# INVESTIGACIÓN EN CÁNCER MAMARIO CANINO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA. UNAM,  
 Universidad Autónoma de Querétaro / Hospital Veterinario de Pequeñas Especies FES -Cuautitlán  
EVALUACIÓN DE LA SALUD POSTERIOR A LA QUIMIOTERAPIA

NOMBRE DEL PROPIETARIO: \_\_\_\_\_ EXPEDIENTE: \_\_\_\_\_ PACIENTE: \_\_\_\_\_

FECHA DE QUIMIOTERAPIA: \_\_\_\_\_ SESIÓN DE QUIMIOTERAPIA:  1  2  3  4

**NOTA:** El tratamiento a base de **YODO MOLECULAR** busca disminuir los efectos secundarios que ocurren por la administración de la quimioterapia, además de disminuir el tamaño tumoral y evitar su diseminación, por lo cual, requerimos y le solicitamos de su entera y atenta observación y llenado del siguiente formato para **EVALUAR DE MANERA EFECTIVA Y REAL** los resultados de nuestros tratamientos. A continuación, le presentamos una serie de alteraciones que pudiera presentar su perrita.

ALTERACIONES	DIAS POST QUIMIOTERAPIA							OBSERVACIONES
FECHA ⇒								
	⇒ <b>V O M I T O</b> ⇐							
· Translucido o transparente								
· Color amarillo o verde esmeralda (como bilis)								
· Color rojo brillante (sangre fresca)								
· Color rojo obscura o negra (sangre no fresca)								
· Consistencia viscosa (como baba)								
· Consistencia líquida (como agua)								
· Sin alimento								
· Con alimento DIGERIDO								
· Con alimento NO DIGERIDO								
<b>Frecuencia del vomito</b>								
· Leve (1 a 2 veces al día)								
· Moderado (3 a 5 veces al día)								
· Severo (Más de 5 veces al día)								
<b>Observaciones</b>								
<b>NAUSEA ¿Lengüetea constantemente?</b>								

ALTERACIONES		DIAS POST QUIMIOTERAPIA							OBSERVACIONES
FECHA ⇒									
		⇒ D I A R R E A ⇐							
· Color café oscuro difuso									
· Color café oscuro difuso y coágulos oscuros									
· Color verde									
· Color café claro									
· Color blanca									
· Consistencia semilíquida (pastosa)									
· Consistencia líquida									
· Consistencia sólida									
· Con moco (transparente, blanco o anaranjado)									
· Con coágulos o gotas de sangre de color rojo brillante (sangre fresca)									
<b>Frecuencia de evacuaciones</b>									
· Leve (1 a 2 veces al día)									
· Moderado (3 a 5 veces al día)									
· Severo (Más de 5 veces al día)									
<b>Observaciones:</b>									
		⇒ C O N S U M O D E A L I M E N T O ⇐							
<b>Cuántas veces al día come normalmente su perrita</b>									
<b>Número de consumo (s) de alimento al día</b>									
<b>Cantidad de alimento consumido</b>									
Nada (0 %)									
Poco (20 % de su ración)									
Moderado (50 % de su ración)									
Moderado (80 % de su ración)									
Normal (100 % de su ración)									
<b>Observaciones</b>									
		⇒ A P E T I T O ⇐							
· Su apetito es normal, come con hambre									
· Come, pero sin apetito									
· Come solo algunos alimentos (selectivo)									
· No quiere comer, come a la fuerza, con ayuda del propietario									
· No come nada, ni con ayuda									
Observaciones									
		⇒ C O N S U M O D E A G U A ⇐							
· Nada									
· Poca									
· Abundante									
· Normal									



SIGNOS		DÍAS POST QUIMIOTERAPIA						OBSERVACIONES
	FECHA ⇒							
⇒ D E P R E S I O N ⇐								
(para su correcto diagnóstico se requiere de la evaluación de los puntos abajo descritos por el Médico Veterinario, el cual debe descartar algún problema físico, sin embargo, la observación de los siguientes datos solo los puede aportar el propietario mediante la observación de la respuesta al tratamiento de su mascota)								
Se altera, salta o corre cuando lo sacan a pasear (falta de ánimo)								
No quiere correr, solo camina lento								
No quiere socializar o jugar con otros perros								
Falta de interés por jugar con el dueño								
Duerme más tiempo de lo habitual								
No puede dormir								
Deja de comer								
Come excesivamente								
Se esconde en algún rincón								
Gime y llora frecuentemente								
Esta nerviosa, es decir, va de un lado a otro								
Apego excesivo al dueño								
Se automutila								
Observaciones								
⇒ L E T A R G I A ⇐								
(Estado de inactividad, tiempo que permanece echada o descansa)								
· <b>NORMAL. Sin letargia, activa (80.100%)</b> Puede realizar sus actividades de la vida diaria como comer, orinar, defecar, sin dificultad o ayuda)								
· <b>GRADO I. Inactividad leve (70%)</b> AMBULA LA MAYOR PARTE DEL TIEMPO, puede realizar sus actividades de la vida diaria como comer, orinar, defecar)								
· <b>GRADO 2. Inactividad moderada (50 a 60%).</b> AMBULA DE FORMA ESPONTÁNEA Y SE MANTIENE DE PIE POR POCO TIEMPO, solo se levanta a sus actividades de la vida diaria como comer, orinar, defecar.								
· <b>GRADO 3. Inactividad severa (30 a 40%).</b> AMBULA DE FORMA ESPONTÁNEA Y SE MANTIENE DE PIE POR POCO TIEMPO, solo se levanta a sus actividades de la vida diaria como comer, orinar, defecar, aunque con dificultad.								

SIGNOS		DIAS POST QUIMIOTERAPIA							OBSERVACIONES
	FECHA ⇒								
<b>GRADO 4. Inactividad total (0 a 20%).</b> NO AMBULA, no puede realizar sus actividades de la vida diaria, estas están severamente limitadas o ausentes no quiere o puede levantarse para comer, orinar, defecar.									
Observaciones									
⇒ E S T A D O D E C O N C I E N C I A ⇐									
Responde a estímulos (a un golpe en la mesa o palmada, chifido, voz de llamado del dueño, etc.									
¿Es lenta para responder a estímulos?									
Observaciones									
⇒ O T R O S S I G N O S ⇐									
¿Se queja?									
Caída de pelo									
Comezón									
Dificultad al respirar									
Disminución severa de peso									
Observaciones									

COMENTARIOS U OBSERVACIONES:



**INFORME DE ANATOMÍA PATOLÓGICA . CÁNCER MAMARIO CANINO**

Nombre: \_\_\_\_\_ Expediente: \_\_\_\_\_ Glándula mamaria (GM) \_\_\_\_\_ Biopsia inicial (BX 1) \_\_\_\_\_ Biopsia final (BX 2) \_\_\_\_\_

**DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA**

**▲ CELULAS EPITELIALES**

<b>▲ PATRÓN DE CRECIMIENTO</b> Multilobular <input type="checkbox"/> Infiltrativo <input type="checkbox"/>	<b>▲ DENSIDAD CELULAR</b> Discreta <input type="checkbox"/> Moderada <input type="checkbox"/> Intensa <input type="checkbox"/>	<b>▲ NÚCLEO</b> Redondo <input type="checkbox"/> Oval <input type="checkbox"/> Fusiforme <input type="checkbox"/>	<b>▲ ÍNDICE MITÓTICO (10 campos / 40X)</b> 1_ 0 a 9 mitosis / ocasional hiper cromatismo <input type="checkbox"/> 2_ 10 a 19 mitosis / 2-3 núcleos hiper cromáticos <input type="checkbox"/> 3_ Más de 20 mitosis / 2-3 núcleos hiper cromáticos <input type="checkbox"/>
<b>▲ LÍMITES</b> Delimitado <input type="checkbox"/> Encapsulado <input type="checkbox"/> Pobremente encapsulado <input type="checkbox"/>	<b>▲ FORMA CELULAR</b> Redondas <input type="checkbox"/> Cúbicas <input type="checkbox"/> Cilíndrico bajo <input type="checkbox"/> Poliédricas <input type="checkbox"/> Ovals <input type="checkbox"/> Columnar <input type="checkbox"/> Fusiformes <input type="checkbox"/> Planas <input type="checkbox"/> Pleomórfico <input type="checkbox"/>	<b>▲ NÚCLEO</b> 1_Forma.no varia mucho <input type="checkbox"/> 2_Forma, variación moderada <input type="checkbox"/> 3_Forma, variación marcada <input type="checkbox"/> 1_Tamaño uniforme, regular pequeño <input type="checkbox"/> 2_Tamaño variable moderado <input type="checkbox"/> 3_Tamaño variable marcado <input type="checkbox"/> 1_Pleomorfismo leve <input type="checkbox"/> 2_Pleomorfismo moderado <input type="checkbox"/> 3_Pleomorfismo marcado <input type="checkbox"/> 1_Nucleolo ocasional <input type="checkbox"/> 2_Un nucleolo ocasional, prominente <input type="checkbox"/> 3_Un nucleolo o más, prominentes <input type="checkbox"/>	
<b>▲ ARREGLO</b> <b>Tubular</b> 1_ Más del 75 % <input type="checkbox"/> 2_Entre 10 y 75 % <input type="checkbox"/> 3_Menos del 10 % <input type="checkbox"/>	<b>▲ CITOPLASMA</b> Anisocitosis <input type="checkbox"/> Bordes bien definidos <input type="checkbox"/> Bordes poco definidos <input type="checkbox"/> Eosinofílico <input type="checkbox"/> Basofílico <input type="checkbox"/> Pálido <input type="checkbox"/> Vacuolado <input type="checkbox"/> Diferenciación escamosa <input type="checkbox"/>	Cromatina gruesa granular <input type="checkbox"/> Cromatina fina granular <input type="checkbox"/> Eucromático <input type="checkbox"/>	<b>▲ OTROS HALLAZGOS</b> Metaplasia apocrina <input type="checkbox"/> Perlas de queratina <input type="checkbox"/> Actividad lactacional <input type="checkbox"/>
Estratos celulares <input type="checkbox"/> Rebasan M. basal <input type="checkbox"/>			<b>▲ GRADO DE MALIGNIDAD</b> 3 a 5 Grado I, Bien diferenciado <input type="checkbox"/> 6 a 7 Grado II, Moderadamente diferenciado <input type="checkbox"/> 8 a 9 Grado III, Pobremente diferenciado <input type="checkbox"/>
<b>Otros arreglos celulares %</b> Ductos o conductos <input type="checkbox"/> Cordones <input type="checkbox"/> Sólido <input type="checkbox"/> Nidos <input type="checkbox"/> Cribiforme <input type="checkbox"/> Quistes <input type="checkbox"/> Papilas <input type="checkbox"/> Micropapilar <input type="checkbox"/> Comedon <input type="checkbox"/> Otro: <input type="checkbox"/>			

**▲ MIOEPITELIALES**  
 Benignas   
 Malignas

**▲ HUESO:**  
 Benigno   
 Maligno   
 Focos de carcinoma

**▲ CARTILAGO**  
 Benigno   
 Maligno

**▲ LINFONODO**  
 Metastasis

**▲ PERMEACIÓN**  
 Linfática   
 Vascul ar

**▲ ESTROMA** **GRADO**  
 Respuesta mixoide estromal   
 Respuesta desmoplásica   
 Desmoplasia   
 Otro:

**▲ INFLTRADO INFLAMATORIO \***  
 Linfocitos   
 Celulas plasmaticas   
 Macrófagos   
 Neutrófilos

**▲ NECROSIS**  
 Licuefactiva   
 Coagulativa

**GRADO** **DISTRIBUCIÓN**  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

\* La localización: Intraluminal, intralobular, interlobular, peritumoral, perivascular

Marcar  en caso afirmativo y/o  
 Leve + Moderado ++ Grave +++  
 según corresponda

**DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO:**

**OBSERVACIONES:**

**Patólogo:**




RESEARCH ARTICLE

Open Access



# Molecular iodine/doxorubicin neoadjuvant treatment impair invasive capacity and attenuate side effect in canine mammary cancer

Xóchitl Zambrano-Estrada<sup>1</sup>, Brianda Landaverde-Quiroz<sup>2</sup>, Andrés A. Dueñas-Bocanegra<sup>2</sup>, Marco A. De Paz-Campos<sup>2</sup>, Gerardo Hernández-Alberto<sup>2</sup>, Benjamín Solorio-Perusquia<sup>3</sup>, Manuel Trejo-Mandujano<sup>3</sup>, Laura Pérez-Guerrero<sup>3</sup>, Evangelina Delgado-González<sup>1</sup>, Brenda Anguiano<sup>1</sup> and Carmen Aceves<sup>1\*</sup> 

## Abstract

**Background:** Mammary cancer has a high incidence in canines and is an excellent model of spontaneous carcinogenesis. Molecular iodine (I<sub>2</sub>) exerts antineoplastic effects on different cancer cells activating re-differentiation pathways. In co-administration with anthracyclines, I<sub>2</sub> impairs chemoresistance installation and prevents the severity of side effects generated by these antineoplastic drugs. This study is a random and double-blind protocol that analyzes the impact of I<sub>2</sub> (10 mg/day) in two administration schemes of Doxorubicin (DOX; 30 mg/m<sup>2</sup>) in 27 canine patients with cancer of the mammary gland. The standard scheme (sDOX) includes four cycles of DOX administered intravenously for 20 min every 21 days, while the modified scheme (mDOX) consists of more frequent chemotherapy (four cycles every 15 days) with slow infusion (60 min). In both schemes, I<sub>2</sub> or placebo (colored water) was supplemented daily throughout the treatment.

**Results:** mDOX attenuated the severity of adverse events (VCOG-CTCAE) in comparison with the sDOX group. The overall tumor response rate (RECIST criteria) for all dogs was 18% (interval of reduction 48–125%), and no significant difference was found between groups. I<sub>2</sub> supplementation enhances the antineoplastic effect in mDOX, exhibiting a significant decrease in the tumor epithelial fraction, diminished expression of chemoresistance (MDR1 and Survivin) and invasion (uPA) markers and enhanced expression of the differentiation factor known as peroxisome proliferator-activated receptors type gamma (PPAR $\gamma$ ). Significant tumor lymphocytic infiltration was also observed in both I<sub>2</sub>-supplemented groups. The ten-month survival analysis showed that the entire I<sub>2</sub> supplementation (before and after surgery) induced 67–73% of disease-free survival, whereas supplementation in the last period (only after surgery) produced 50% in both schemes.

**Conclusions:** The mDOX+I<sub>2</sub> scheme improves the therapeutic outcome, diminishes the invasive capacity, attenuates the adverse events and increases disease-free survival. These data led us to propose mDOX+I<sub>2</sub> as an effective treatment for canine mammary cancer.

**Keywords:** Canine mammary cancer, Molecular iodine, Neoadjuvant chemotherapy, Doxorubicin, Animal welfare

\* Correspondence: [caracev@unam.mx](mailto:caracev@unam.mx)

<sup>1</sup>Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard Juriquilla 3001, CP 76230 Querétaro, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article



## Background

Mammary cancer is the neoplasia with most incidences in intact female dogs [1]. Currently, surgery remains the mainstay of canine mammary cancer treatment, but several studies describe adjuvant chemotherapy as an approach that increases quality of life and disease-free survival [2–5]. In women, the use of systemic chemotherapy before local surgical excision, known as neoadjuvant therapy, may also reduce the extent of local surgery without jeopardizing patient survival and disease-free survival [6]. This practice is still scarce in dogs, but recent reports describe the use of this approach to transform unresectable tumors into resectable ones even though disease-free survival or survival time was not significantly longer when different chemotherapeutic drugs were used as monotherapy [7–9].

One of the most important considerations in chemotherapy treatment is the attenuation of toxicity and chemoresistant effects. Slow infusion is one of the most explored strategies to reduce toxicity. Doxorubicin (DOX), a widely used therapeutic drug, exhibited a direct correlation between its toxic effects and its peak plasma concentration. Rapid intravenous bolus results in higher peak levels, whereas slow infusion rates lead to a greater area under the curve associated with less toxicity. However, the pharmacokinetics of this drug could be different between species. In humans, slow infusion (1 to 6 h or more) exhibited less toxicity in cardiac tissue and other organs [10], whereas in rodents fast infusion (5 versus 30 min) seems to be better protection [11]. Related studies in canines were not available until now. A second strategy, more represented in canine studies, is the use of chemotherapeutic drugs in different schemes or pharmaceutical presentations (metronomic therapy, liposomes, nanoparticles) [12–15], specific molecules that act as inhibitors of growth factor receptors (toceranib phosphate) [16, 17], components that exacerbate immune anti-tumor responses (anti Her2, TNF $\alpha$ ) [18, 19] or even natural products with adjuvant antineoplastic effects (Curcumin) [20].

In this regard, previous work by several research groups has shown that molecular iodine ( $I_2$ ) exerts antineoplastic effects on different cancer cells grown under basal, chemoresistant and stem (spheroid) conditions by activating re-differentiation pathways and reversing chemoresistance and epithelial-mesenchymal transition (EMT) [21–23]. Similarly, pre-clinic (immunosuppressed mice and pharmacologically induced rats) and clinic mammary cancer protocols have shown that  $I_2$  supplementation inhibits tumor growth, activates the anti-tumor immune system and exerts antioxidant actions that prevent the severity of side effects generated by antineoplastic drug toxicity [24, 25]. The antineoplastic actions of  $I_2$  include direct mechanisms exerting oxidant

effects on the mitochondrial membrane and indirectly generating an iodinated lipid known as 6-iodolactone (6-IL), a specific ligand of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) [26]. PPARs are ligand-activated transcription factors, and three subtypes have been identified (PPAR alpha, beta, and gamma). PPAR $\gamma$  is involved in lipid metabolism and has recently been shown to play a significant role in cell proliferation, differentiation, and apoptosis in many types of cancer [27]. The present study was designed to analyze the effect of  $I_2$  supplementation in two DOX administration schedules: standard (21-day cycles; 20 min infusion) versus modified (15-day cycles; 60 min infusion) regimens in canine patients with mammary cancer.

## Methods

### Patients

The study was performed to include at least between 4 and 10 dogs per group according to our previous studies in rodents [25]. We invited and registered 93 patients who gradually abandoned the protocol for various reasons. Some of them related to the side effects (although we were very attentive to their health and well-being, many owners did not accept the loss of hair or the temporary change of mood), or due to other difficulties (abandonment of treatment, death independent of cancer, pyometra, etc.). As the study was double-blind, the confirmation of the groups was revealed until the day of the surgery and it was not possible to re-adjust them. Twenty-seven intact female dogs with acceptable health and a diagnosis of mammary cancer finished the protocol. All procedures were performed at the Veterinary Hospital of the Universidad Autónoma de Querétaro and at the Veterinary Hospital of FES-Cuautitlán, UNAM. Additionally, all procedures followed the Animal Care and Use program (NIH, USA) and were approved by the Research Ethics Committee of INB-UNAM (Protocol #102).

### Clinical protocol

Cytological diagnostic of mammary cancer was performed by a sample of puncture fine needle aspiration. Eligibility criteria also included signed informed consent and normal hepatic, renal and cardiovascular function (general blood and urine analysis and electrocardiogram, respectively). A biopsy was performed in accepted dogs to confirm the cytological diagnosis and determine the tumor classification according to Goldschmidt et al. [28]. A dog health questionnaire was filled out by the veterinary surgeon and the dog owner before every chemotherapy cycle. Toxicity was graded using the Veterinary Cooperative Oncology Group - Common Terminology Criteria for Adverse Events (VCOG-CTCAE) [29]. The clinical signs considered in the present work

were weight, vomitus, diarrhea, anorexia, lethargy, anemia and neutropenia. Distant metastasis disease was identified using ultrasound and thorax radiographs.

### Chemotherapy

The standard scheme (sDOX) comprises four cycles of DOX (30 mg/m<sup>2</sup>) administered intravenously for 20 min every 21 days, while the modified regimen (mDOX) consists in the same amount of chemotherapy infused for 60 min in four, 15-day cycles.

### Molecular iodine

Was prepared with Lugol solution (Golden Bell, Edo. de Mexico, Mx) and diluted in distilled water. Iodine (10 mg/day) or placebo (water with artificial food coloring) was administered orally with daily food 1 week before chemotherapy and continuously until mastectomy. The file for each dog was opened on the day of the mastectomy to identify the subgroup (I<sub>2</sub> or placebo). To analyze the effect of I<sub>2</sub> supplementation on survival and disease-free survival rates, all patients received the halogen supplementation for ten more months.

### Mastectomy

The veterinary surgeon carried out the pre-surgical protocol and the corresponding postoperative monitoring during the peri-mastectomy period. The surgery was performed 6 weeks after the last chemotherapy to ensure the complete re-establishment of the patients' health. Anesthesia included premedication with 0.01 mg/kg Acepromazine (Vetoquinol, Mexico City, MX), induction and maintenance with 2 mg/kg Propofol (App pharmaceuticals, Los Angeles, CA) and fluid therapy (saline solution). For pain management, 0.005–0.02 µg/kg with Buprenorphine (Schering-Plough, NJ, USA), 0.2 mg/kg Meloxicam (Aranda Lab, Queretaro, MX) and 1 mg/kg Tramadol (Pisa, Mexico City, MX), as well as antibiotic therapy with 5 mg/kg Enrofloxacin (Bayer, Edo de Mexico, MX).

### Iodine consumption, thyroid status, cardiac damage and tumor response

All these parameters were recorded on the day that the dogs were accepted into the protocol (initial) and on the day of the mastectomy (final). The content of total iodine in urine was determined by ionic analysis (potentiometer Thermo Scientific Orion Star A214 with ion selective electrode; ISE; LIS-1461CM), triiodothyronine (T3) and thyrotropin (TSH) circulating levels by ELISA (International immuno-diagnostics/IIDE-2021 and Abnova/KA2296, respectively). Serum creatine kinase type MB (CK-MB) activity, used as a marker of cardiac damage, was measured by using the CK-MB Test (Stanbio Laboratory/0980–103). Electrocardiogram (ECG) recordings were made over a minimum 30-s period in

each dog, while conscious and lightly restrained, on initial (time 0), 10 min before each chemotherapy session and 1 week before mastectomy. The ECG traces from each animal were examined by a certified veterinary cardiologist to determine the following variables: heart rate, P-wave duration, P-wave amplitude, PR interval, QRS duration, QRS amplitude, QT interval, ST segment structure, and T-wave amplitude.

The tumor response rate was determined according to the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) which use only the longest diameters of tumors in the axial plane [30]. The response is placed into one of four categories: complete response (CR; disappearance of all target lesions), partial response (PR; ≥ 50% decrease in sum of target lesions from baseline), stable disease (SD; meets criteria for PR or PD) or progressive disease (PD; ≥ 25% increase in sum of target lesions or appearance of new lesions).

### Immunohistochemistry

Was performed on 3 or 5 µm formalin-fixed paraffin-embedded specimens that were float-mounted onto silanized glass slides. ERα was analyzed by a sandwich protocol (polyclonal first antibody HC-20, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA; and goat anti-rabbit-immunoglobulin, peroxidase labeled, Dako/K4011). Sections were counterstained with hematoxylin. ERα-positive cells were identified by the presence of a brown stain over the nucleus and cytoplasm. Five regions were analyzed, and tumor samples were considered ERα-positive when 20 or more cells per field were positively labeled in the nucleus, in the cytoplasm or in both, and were found in at least three fields at 40X. Negative controls were obtained by using only the secondary antibody (Dako/K4011). The positive control was performed employing ovary tissue.

### Histopathological analysis

Classification and grading of mammary tumors was determined by Goldschmidt et al. criteria which include tubule formation, nuclear pleomorphism and mitoses/hyperchromatism [28]. The histologic malignancy was described as well differentiated (low values), moderately differentiated (intermediate values) and poorly differentiated (high values). Hematoxylin and eosin (H&E) staining was used to observe histological malignancy and lymphocytic infiltration. Masson's trichrome staining was used to identify epithelial (red) and connective (blue) proportions of representative slides per group. Two independent observers evaluated all these characteristics in anonymized and blinded samples. The analysis was performed as the mean of three random regions. The number of lymphocytes and the



percentages of stained areas were calculated using the ImageJ 1.47 program (Wayne Rasband. NIH, USA).

**Molecular expression**

Bax, Bcl2, urokinase plasminogen activator (uPA), Survivin, multidrug resistance protein 1 (MDR1) and PPARγ expression were analyzed by quantitative real-time PCR (qPCR) [21]. Total RNA was obtained using the TRIZOL reagent (Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA), and the extracted RNA (2 μg) was reverse transcribed using oligo-deoxythymidine. qPCR was performed with SYBR green dye (Thermo Scientific/K0221) in detector system Roto-Gene 3000 (Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia) with the canine gene-specific primers listed in Table 1. Validation of qPCR was performed using β-actin and phosphoglycerate kinase 1 (PGK1) as non-regulated housekeeping genes. Gene expression was calculated using the D cycle threshold method and normalized to β-actin content.

**Statistical analysis**

All statistical analysis was performed in Prism version 6.01 (GraphPad Software). An unpaired, Student’s *t*-test was used to compare average (initial and final) of total urine iodine, serum thyroid hormones and cardiac enzyme (CK-MB). Unpaired one-way ANOVAs were used to analyze electrocardiogram profile, residual tumor size and epithelial/connective tissue proportion. The differential gene response was performed with Mann-Whitney U, and Pearson correlation was used to determine correlations between residual tumor size and lymphocyte number. A *p* value of less than 0.05 was considered significant.

**Results**

Table 2 summarizes the patients’ characteristics. The median age was 9.2 ± 2.4 years, and the most affected breed was the Standard Poodle (33%). Sixty-eight percent of dogs were nulliparous, and none received hormone therapy. Only 20% (6 dogs) of the patients exhibited overweight (between 10% and 30% above

standard weight). Two patients presented distant metastasis (lungs) at the time of diagnosis (clinical state V).

Grading of adverse events for each group throughout the treatment is summarized in Fig. 1. Patients started with excellent conditions (0), and lower and medium grades (1 to 2) were observed after the second or third chemotherapy cycle (before the third or fourth chemotherapy cycle, respectively). No patients exhibited significant weight loss or developed grades 3, 4 or 5 (death) during treatments. Table 3 describes the number of patients who presented clinical signs and their severity (grade) at any time during chemotherapy treatment. The mDOX scheme reduces the severity of the general symptoms in comparison with sDOX. The I<sub>2</sub> supplement further attenuates the severity of the symptoms in both treatments. The six dogs that presented grade 2 vomiting and/or diarrhea were complemented with supportive care: antibiotic (Metronidazole, 30–40 mg/kg for 14 days) and probiotics (Enterogermina 2 billion/5 mL); with Omeprazole (20 mg/kg for 24 h), Ranitidine (3 mg/kg every 12 h for 8 days), Difenidol (1 mg/kg for 4 days), and/or fluid therapy (saline solution).

I<sub>2</sub> ingestion, thyroid status and cardiac damage were recorded when patients were accepted into the protocol (initial) and on the day of mastectomy (final). Total urinary iodine values were above 2000 μg/L in supplemented patients and DOX groups did not show any changes. I<sub>2</sub> supplementation and/or DOX administration neither modified T3 or TSH circulating values or showed cardiac damage measured by serum CK-MB activity (Fig. 2). The electrocardiogram variables from initial (time 0) and final (before mastectomy) are summarized in Fig. 3. No significant changes were observed between groups in any variable or protocol day.

Figure 4 shows the tumor classification, histological grade and residual tumor size. Most patients developed more than one tumor (Table 2). The tumors with enough size (more than 1 cm<sup>3</sup>) were analyzed as individual tumors. Ninety-one percent were of the epithelial type, whereas only 9% corresponded to the mixed type (carcinosarcoma). Histological grading showed that 60%

**Table 1** Oligonucleotides

Gen	Reference	Forward primer	Reverse primer	pb
β-actin <sup>1</sup>	NM_0011101	acagagtacttgcgctcagga	ccatcatgaagtgtgacgttg	175
PGK1 <sup>2</sup>	NM_053291.3	tgactttggacaagctggacgtga	cagcagccttgatcctttggtgt	110
Bax <sup>3</sup>	NM_001003011.1	aagctgagcagagtgtctcaagcgc	tcccgccacaagatggtcacg	366
Bcl <sub>2</sub> <sup>4</sup>	NM_000633.2	gtggaggagctcttcagggga	aggcaccagggtgatgcaa	304
PPARγ <sup>5</sup>	XM_005632014.1	ttccattctcaagagcggacc	tctccacagactcggcattcaa	190
Survivin <sup>6</sup>	NM_001003348.1	accgcgtctctacgttcaag	ccaagtctggctcgttctca	114
uPA <sup>7</sup>	XM_005618862.1	ttggggagatgaagtttgaggtgg	cagaacggatcttcagcaaggc	105
MDR1 <sup>8</sup>	NM_001003215.1	tatcagcagcccagctcatc	cagccactgctacctacgag	214

<sup>1, 3, 4</sup> Human, <sup>2</sup> Rat, <sup>5, 6, 7, 8</sup> Canine



**Table 2** Patient characteristics

Breed	Age (years)	Body weight (kg)	Clinical stage (TNM) $\phi$	Number of tumors	Parturition	ERa
Standard scheme (Dox)						
Standard Poodle	12	6	III	2	0	Positive
Maltese bichon	9	<b>9.9</b>	III	7	2	Positive
Dachshund	13	6.6	III	4	2	Positive
Maltese bichon	7	<b>6.6</b>	III	5	0	Positive
Standard scheme (Dox + I <sub>2</sub> )						
Rottweiler	8	38	III	1	2	Positive
Standard Poodle	12	5.8	II	5	0	Positive
Standard Poodle	10	3.8	III	5	0	Positive
Labrador Retriever	10	30	III	7	0	Positive
Standard Poodle	12	6.4	V	8	1	Positive
Standard Poodle	9	7	III	9	1	Positive
Modified scheme (Dox)						
Cocker Spaniel	9	10.3	II	8	0	Positive
Mixed breed	6	4.2	II	2	0	Positive
Cocker Spaniel	8	13	I	6	3	Positive
Chihuahua	5	2.2	I	3	0	Positive
German Shepherd	7	30.1	III	7	0	Positive
Dalmatian	6	23	I	1	0	Positive
Modified scheme (Dox + I <sub>2</sub> )						
Cocker Spaniel	10	<b>16.8</b>	III	1	0	Positive
Mixed breed	8	<b>7.6</b>	I	5	0	Positive
Standard Poodle	11	4.2	V	7	0	Positive
Cocker Spaniel	13	9.8	III	7	0	Positive
Fox terrier Toy	7	2.4	I	5	0	Positive
Standard Poodle	10	4.5	III	3	0	Positive
Cocker Spaniel	13	<b>17.4</b>	III	7	3	Positive
Standard Poodle	10	6	II	8	0	Positive
Standard Poodle	9	4.7	III	6	4	Positive
Chihuahua	5	<b>3.8</b>	III	5	0	Positive
Dachshund	10	5.2	III	5	1	Positive

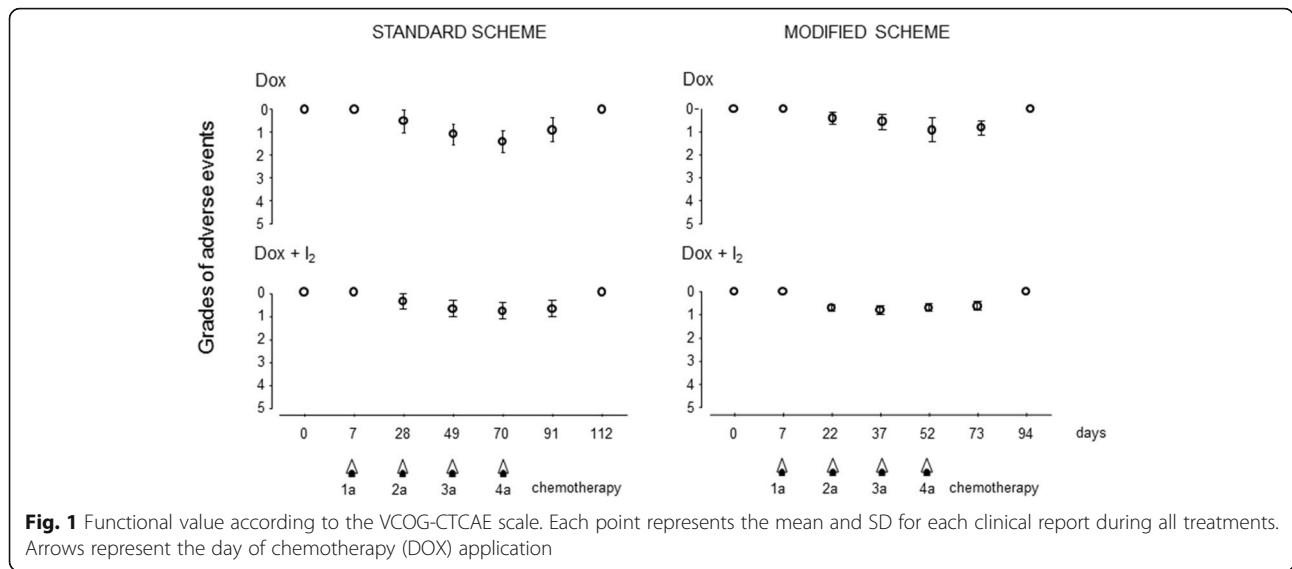
$\phi$  T – Primary tumor, N – Regional lymph nodes, M – Distant metastasis [28]; Bold numbers, overweight animals (10–30% of standard weight)

of tumors were well differentiated, 37% were moderately differentiated and only one (3%) was poorly differentiated. No dogs exhibited a complete response (CR). One patient from sDOX+I<sub>2</sub> showed partial response (PR) and one from the sDOX group exhibited progressive disease (increases  $\geq$ 25%). The rest of the tumors (94%) were maintained as stable disease. The overall response rate for all dogs was 18.0%, where the residual tumor size corresponds to 82.0% (interval 48–125%). However, even though tumor response (residual size) did not show statistical differences between groups, I<sub>2</sub> supplementation was accompanied by decreases in epithelial tissue in comparison with connective content (Fig. 5). This

observation was significant in the mDOX+I<sub>2</sub> group, suggesting that I<sub>2</sub> acts on all tumor types by increasing the antineoplastic effect of mDOX.

The molecular analyses (Fig. 6) show that I<sub>2</sub> treatment generates similar responses in apoptotic and invasive markers independent of the DOX administration scheme. The presence of I<sub>2</sub> increases the apoptotic index (Bax/Bcl2) and impairs the induction of invasive or chemoresistant genes such as MDR1, uPA and Survivin. The combination of mDOX+I<sub>2</sub> synergies the expression of Bax and PPAR $\gamma$  receptors.

One interesting phenomenon was observed in lymphocytic infiltration. I<sub>2</sub> supplementation increases the



**Fig. 1** Functional value according to the VCOG-CTCAE scale. Each point represents the mean and SD for each clinical report during all treatments. Arrows represent the day of chemotherapy (DOX) application

**Table 3** Adverse events (VCOG-CTCAE)

	Grade	sDox	sDox + I <sub>2</sub>	mDox	mDox + I <sub>2</sub>
Vomiting	1	1 (25%)	1 (17%)	1 (17%)	2 (18%)
	2	1 (25%)	1 (17%)	1 (17%)	
	3				
	4				
Diarrhea	1	1 (25%)	1 (17%)	1 (17%)	2 (18%)
	2	1 (25%)	1 (17%)	1 (17%)	1 (9%)
	3				
Anorexia	1	2 (50%)	1 (17%)	1 (17%)	1 (9%)
	2	1 (25%)	1 (17%)		
	3				
Lethargy	1	1 (25%)	1 (17%)	1 (17%)	1 (9%)
	2	1 (25%)	1 (17%)	1 (17%)	1 (9%)
	3				
Anemia <sup>a</sup>	1	2 (50%)	2 (33%)	2 (33%)	3 (27%)
	2				
	3				
	4				
Neutropenia	1	1(25%)	1 (17%)	1 (17%)	1 (9%)
	2				
	3				
	4				

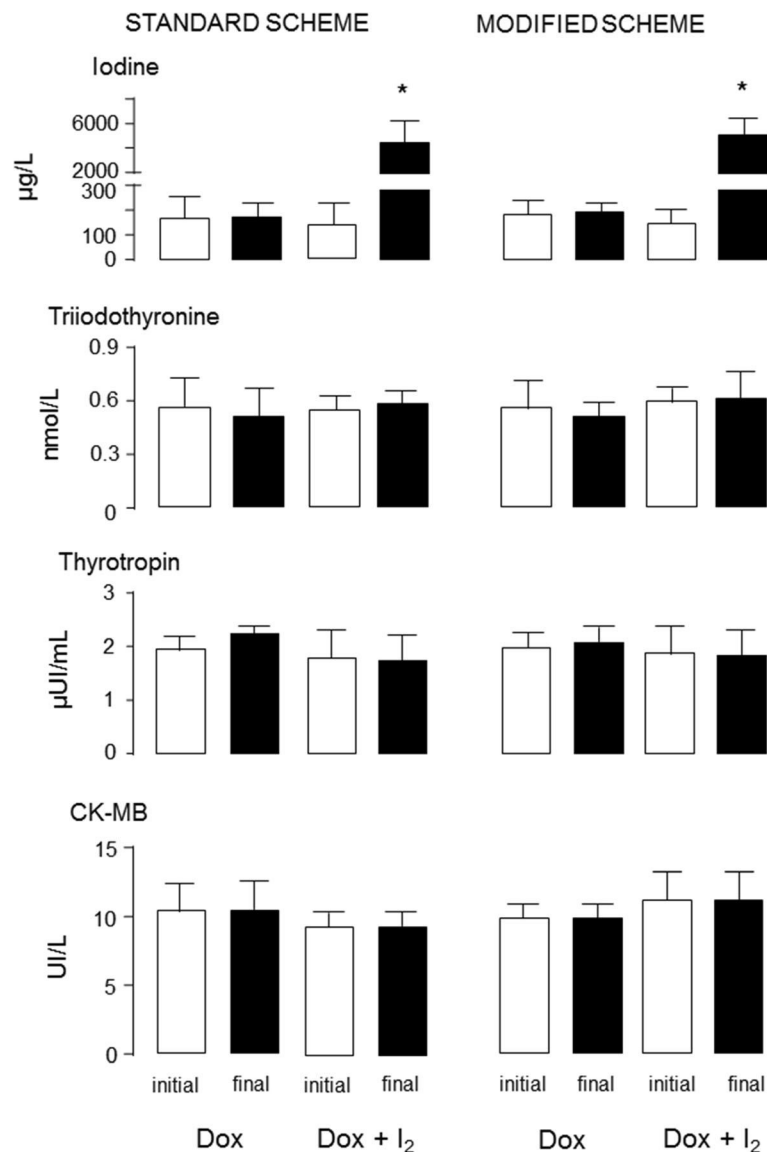
<sup>a</sup>Anemia includes: hematocrit, hemoglobin and erythrocyte values (mean globular volume and mean hemoglobin concentration)

presence of lymphocytes in both schemes (Fig. 7) and exhibits a significant inverse correlation with the tumor response (more lymphocytes in the small residual tumor size).

As mentioned before, the use of DOX as monotherapy has the benefit of converting the unresectable tumors into resectable ones, but it does not increase the disease-free survival (~207 days). With this premise, all our patients received I<sub>2</sub> supplementation after the mastectomy, and the survival analysis was performed for ten more months (~300 days). Table 4 shows that I<sub>2</sub> supplementation during the entire treatment (before and after surgery) has an improved disease-free survival of 67 and 73% (sDOX+I<sub>2</sub>: 4 dogs and mDOX+I<sub>2</sub>: 8 dogs, respectively) compared with the 50% (sDOX: 2 dogs; mDOX: 3 dogs) observed in those that received I<sub>2</sub> only in the last period (after chemotherapy). The two patients with previous metastasis (lungs) received sDOX+I<sub>2</sub> and mDOX +I<sub>2</sub>, each. In the first case, metastasis disappeared and after 10 months the patient was still alive without relapse or distant metastasis. In the second case (mDOX +I<sub>2</sub>), the metastasis progressed, and the patient died 4 months after surgery. Two patients (in the sDOX+I<sub>2</sub> group) exhibited local mammary cancer relapse 7 months after surgery. Tumors were removed in a second surgery and after 10 months, both were still alive without evident metastasis. Three dogs died from causes independent of mammary cancer (two due to other cancers and one due to pyometra complications).

### Discussion

In the present work, we compared two DOX administration schemes and the adjuvant effect of I<sub>2</sub> in canine mammary cancer. Our results showed that both DOX schemes are well tolerated, since no patients exhibited

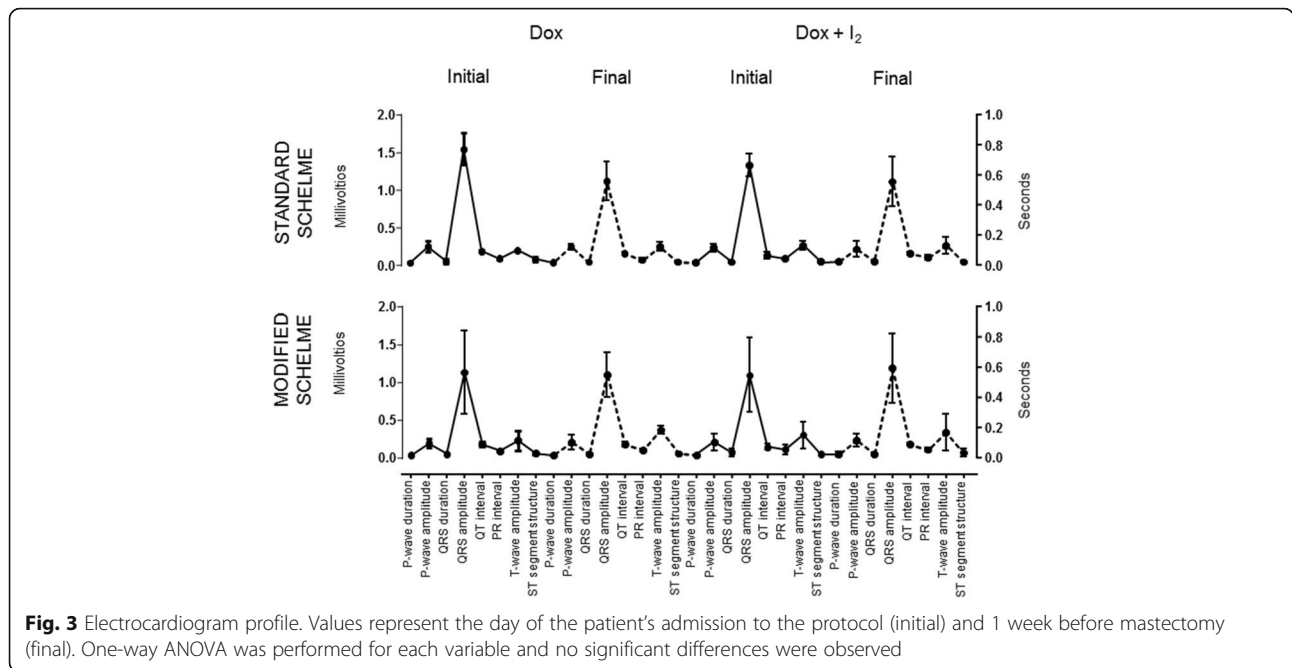


**Fig. 2** Iodine ingestion, thyroid status and cardiac damage during treatments. Values were recorded on the day of the patient's admission to the protocol (initial) and on the day of mastectomy (final). Total iodine was determined in urine. Triiodothyronine, thyrotropin and creatine kinase type MB (CK-MB) were quantified in serum. Data are expressed as mean  $\pm$  SD, and the asterisk indicates a significant difference with respect to the initial condition (unpaired Student t test;  $P < 0.05$ )

grades 3 or 4, according to the VCOG-CTCAE [29], in both conditions. Moreover, cardiac damage was not evident through serum CK-MB activity or ECG in any group. The clear attenuation of adverse events observed in mDOX agrees with previous reports in humans where slow infusion (1 to 6 h) exhibited less toxicity [10], suggesting that the pharmacokinetics of DOX could be similar between humans and dogs. The addition of the I<sub>2</sub> supplement appears to further attenuate the severity of adverse events. This benefit could be explained by the antioxidant effect of this chemical form of iodine, which is ten times more efficient than ascorbic acid and 100

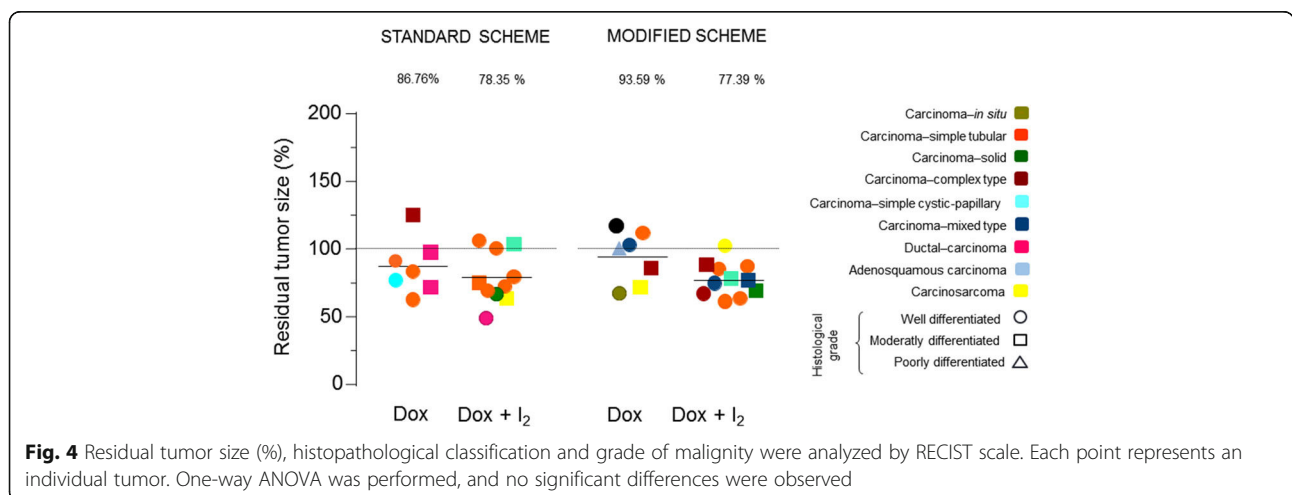
times more potent than KI (Ferric reducing/antioxidant power assay; FRAP) in vitro [24]. Indeed, previous reports from our group in a rodent mammary cancer model showed that I<sub>2</sub> supplementation prevented weight loss and cardiotoxicity (cardiac lipoperoxidation and serum CK-MB) secondary to DOX, without impairment of its synergistic antitumor action [24].

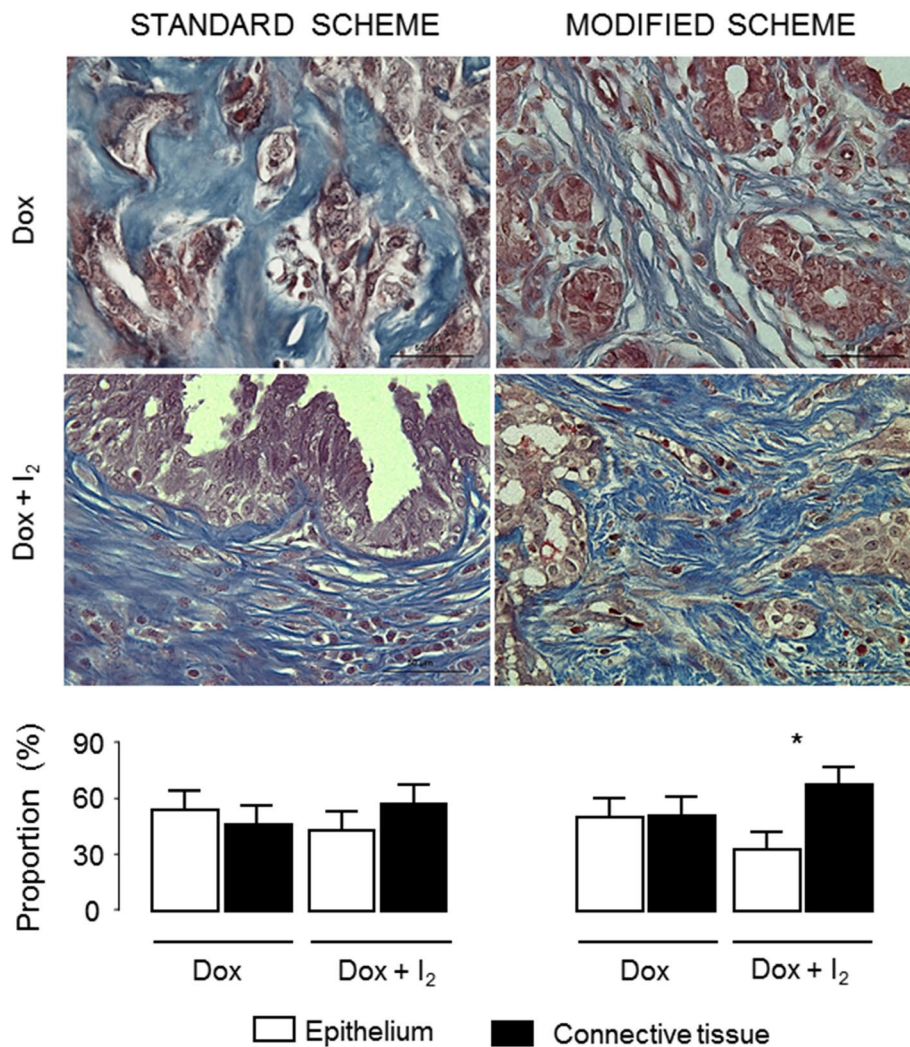
Regarding the tumor response (RECIST), the overall response was 18% showing that 94% of tumors were maintained as stable disease. This percentage of response is like that described by other authors when chemotherapy drugs are used in the form of



monotherapy [6–8]; however, the important advantage observed in the I<sub>2</sub>-supplemented groups was the significant attenuation of invasive potential in the residual tumor mass. The tumor content showed a significant decrease in epithelial tissue, which is considered the source of tumor progression and metastasis, and a minimum expression of chemoresistance (MDR1 and Survivin) and invasion (uPA) markers, suggesting a better prognosis. It is well established that fibroblast and connective tissue are not I<sub>2</sub>-capturing tissues, whereas several types of epithelium uptake this halogen [31]. Moreover, it is described that cancerous cells exhibited between 10 and 100 times more sensitivity to apoptotic I<sub>2</sub> effects than its normal counterpart [22, 31]. Two main pathways have been proposed to explain these effects; one concerning

the direct oxidant/antioxidant action of I<sub>2</sub> and a second pathway through iodolipid formation. Upadhyay et al. [32] showed that mitochondria isolated from the tumor (TT) and extra-tumoral tissue (ET) of human breast display significant uptake of iodine; but only TT mitochondria respond by increasing their permeability transition and releasing apoptogenic proteins, indicating a direct and differential proapoptotic action of I<sub>2</sub> in mitochondria from cancerous cells. The second pathway is the generation of an iodinated derivative of arachidonic acid (AA), called 6-iodolactone (6-IL). AA is an essential membrane lipid, and its elevated concentrations in cancerous cells have been implicated in tumoral processes [33, 34]. 6-IL has been detected in tumor mammary glands from rats supplemented with I<sub>2</sub> [35], and this





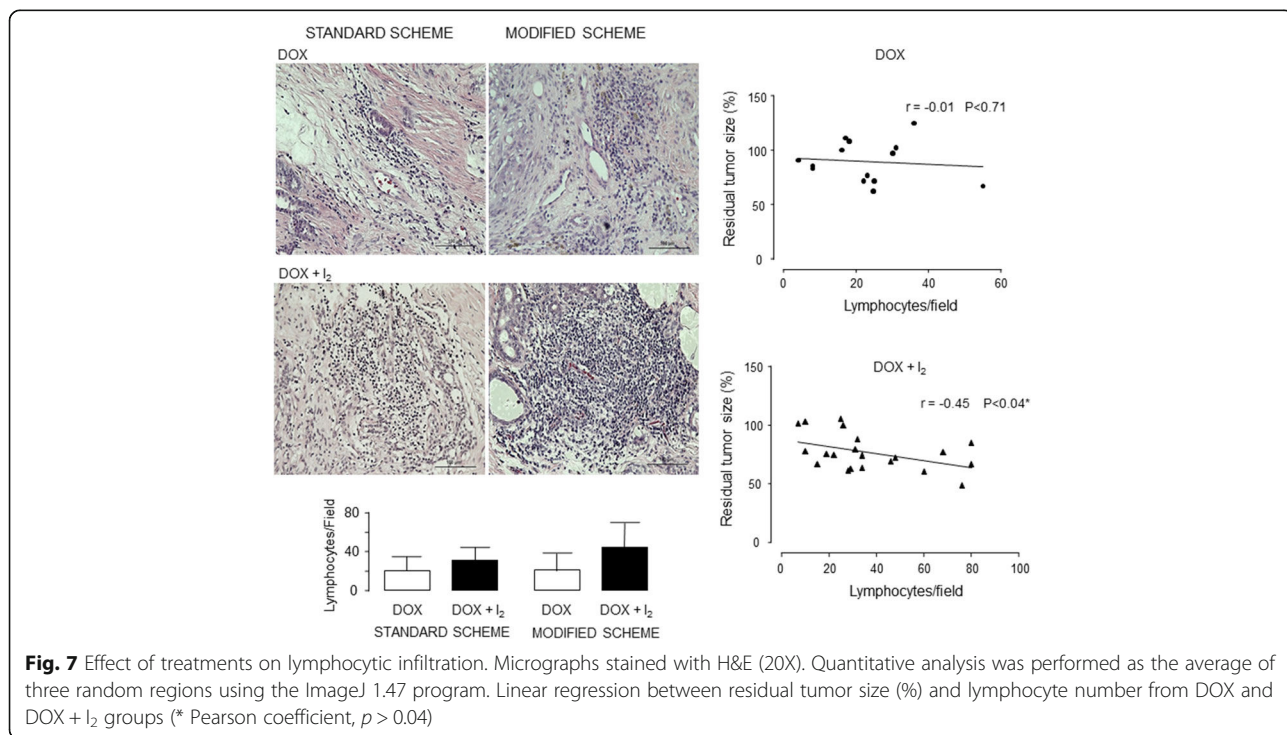
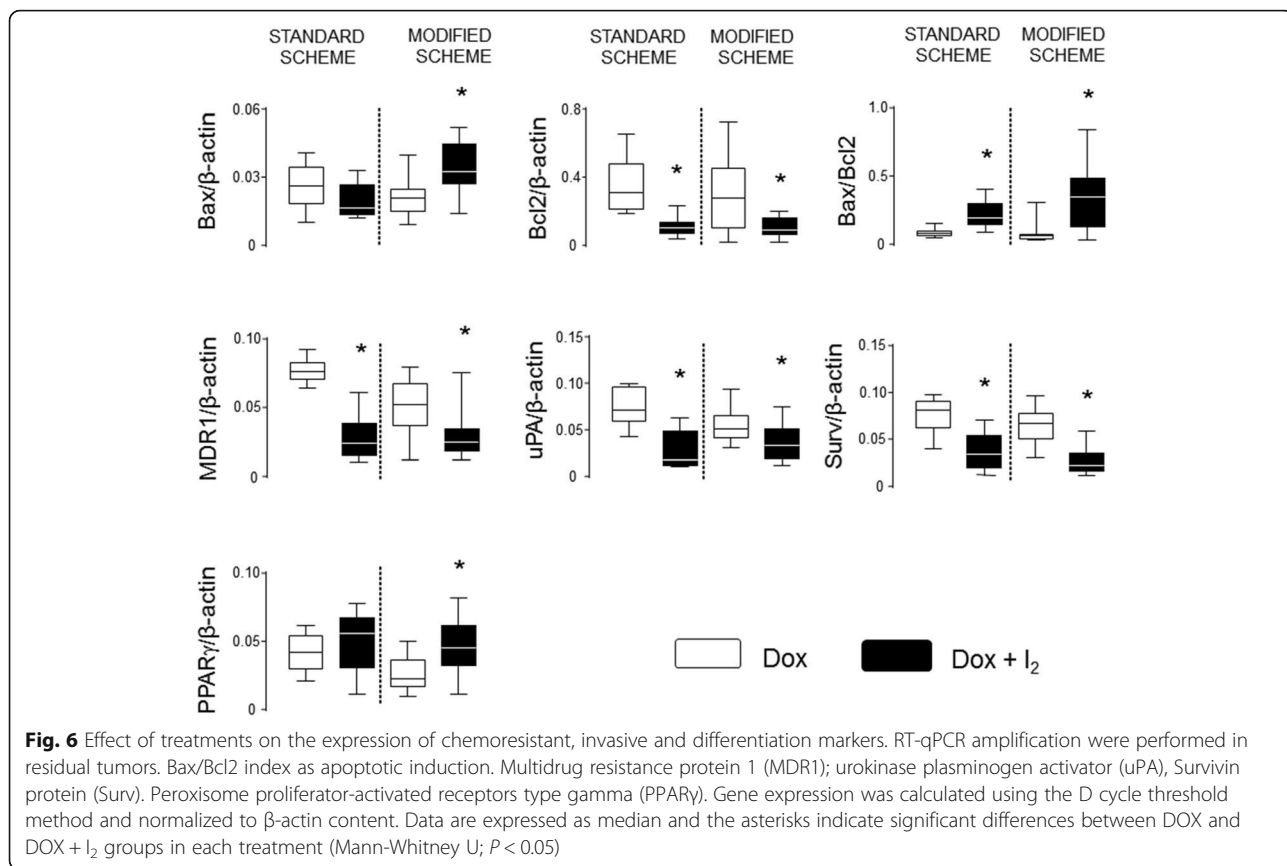
**Fig. 5** Epithelial and connective tissue proportion (%) in the final tumor mass. Micrograph staining with Masson's trichrome method (red, epithelium; blue, connective tissue). Quantitative analysis was performed as the average of three random regions (40X) using the ImageJ 1.47 program. Data are expressed as mean  $\pm$  SD, and the asterisk indicates a significant difference between groups. Student's *t*-test ( $P < 0.05$ )

iodolipid is a specific agonist of PPAR $\gamma$  [36]. Treatment with PPAR $\gamma$  agonists inhibits cancer cell growth by inducing G<sub>0</sub>–G<sub>1</sub> cell-cycle detention, promoting differentiation and reverting the EMT [37]. EMT is characterized by the suppression of adhesion molecule expression (e.g., E-cadherin), the induction of mesenchymal proteins such as N-cadherin or Vimentin and the acquisition of chemoresistance by up-regulation of ATP-binding cassette (ABC) transporters (such as MDR1) and anti-apoptotic markers like Bcl2, Bcl-xl or Survivin [38]. Our observation that I<sub>2</sub> supplementation in both schemes diminishes part of these markers (MDR1, Bcl2, uPA and Survivin) and increases the expression of PPAR $\gamma$  agrees with the notion that I<sub>2</sub> exerts its antineoplastic effects through PPAR $\gamma$  activation. Moreover, the loss of invasive capacity of remnant cancerous tissue

could explain the low rate of recurrence and metastasis found in our patients even after 10 months.

Another important finding was the significant inverse correlation of lymphocytic infiltration with the tumor response (residual tumor size) in samples from dogs treated with I<sub>2</sub> supplementation. Previous reports described that the presence of lymphocytic infiltration in breast cancer tissue predicts a positive response of neoadjuvant chemotherapy, and led to speculate that the inclusion of conventional chemotherapy with sensitization of the immune system could be a promising paradigm [39, 40]. The specific mechanism of I<sub>2</sub> in this putative immune modulation has not been elucidated, but it is demonstrated that several immune cell types can internalize I<sub>2</sub>, which can act as an anti- or pro-inflammatory agent depending on the cellular context





**Table 4** Survival analysis

Breed	Age (years)	Clinical stage (TNM)	Survival at ten months	Observations
Standard scheme (Dox)				
Standard Poodle	12	III	Yes	Alive without relapse
Maltese bichon	9	III	No	Death, surgical complications
Dachshund	13	III	Yes	Alive without relapse
Maltese bichon	7	III	No	Death, surgical complications
Standard scheme (Dox + I <sub>2</sub> )				
Rottweiler	8	III	Yes	Alive with relapse; no metastasis
Standard Poodle	12	II	Yes	Alive without relapse
Standard Poodle	10	III	Yes	Alive with relapse; no metastasis
Labrador Retriever	10	III	Yes	Alive without relapse
Standard Poodle	12	V	Yes	Alive without relapse
Standard Poodle	9	III	Yes	Alive without relapse
Modified scheme (Dox)				
Cocker Spaniel	9	II	No	Death, transitional cell cancer
Mixed breed	6	II	No	Euthanasia, suspected metastasis
Cocker Spaniel	8	I	Yes	Alive without relapse
Chihuahua	5	I	Yes	Alive without relapse
German Shepherd	7	III	No	Death, anaplastic cancer
Dalmatian	6	I	Yes	Alive without relapse
Modified scheme (Dox + I <sub>2</sub> )				
Cocker Spaniel	10	III	Yes	Alive without relapse
Mixed breed	8	I	Yes	Alive without relapse
Standard Poodle	11	V	No	Death, extensive metastasis
Cocker Spaniel	13	III	Yes	Alive without relapse
Fox terrier Toy	7	I	Yes	Alive without relapse
Standard Poodle	10	III	Yes	Alive without relapse
Cocker Spaniel	13	III	No	Death, pyometra
Standard Poodle	10	II	Yes	Alive without relapse
Standard Poodle	9	III	Yes	Alive without relapse
Chihuahua	5	III	Yes	Alive without relapse
Dachshund	10	III	No	Death, surgical complications

[41, 42]. I<sub>2</sub> can have anti-inflammatory effects either by suppressing the production of toxic oxygen intermediates in polymorphonuclear cells or by inhibiting neutrophil chemotaxis [43, 44]. In contrast, I<sub>2</sub> may act directly on immune cells by inducing their reactivation. In chronic wounds, its presence activates the influx of macrophages and T cells [45]. In vitro, I<sub>2</sub> enhances TNF $\alpha$  secretion from macrophages stimulated with bacterial lipopolysaccharides [46]. We observed a similar anti-tumor immune response in mammary cancer xenografts when mice Fox1 nu/nu were supplied with I<sub>2</sub> (data not published). Moreover, PPAR $\gamma$  activation could be associated with such effects. In a recent publication, it was demonstrated that PPAR $\gamma$  expression increased

almost 5-fold in a metronomic cyclophosphamide regime, suggesting that these receptors substantially contribute to the immune responsiveness of this treatment [47].

Finally, we wanted to test the effect of I<sub>2</sub> supplementation on disease-free-survival and survival when DOX is applied as monotherapy. There are only three previous reports that analyze this parameter using neoadjuvant chemotherapy in canines [6–8]. They found that survival time could be significantly extended with combination therapies (two or three drugs plus radiotherapy), rising the disease-free survival mean to 12 months (interval 213–521 days). In contrast, the disease-free survival only lasts 7 months (217 days) when DOX is used as monotherapy [7]. Our study included a ten-month (~300 days)

analysis, which showed that during this time overall disease-free survival was of 62%. I<sub>2</sub> increases the patient's survival when it is supplied from the beginning of treatment (67% in sDOX+I<sub>2</sub> and 73% in mDOX+I<sub>2</sub>), and by 50% in both treatments when it is provided only after surgery. In the first case, I<sub>2</sub> could act on two levels; first, by increasing the antineoplastic effects of DOX at the tumor site (differentiation induction, though less invasive phenotype and/or activation of immune response) and second, as an antioxidant, diminishing the oxidative damage in normal tissues (digestive, anemia, etc.) caused by DOX. The benefit after surgery (impaired relapse) could be linked to the antiproliferative effect of I<sub>2</sub> per se. Several studies have reported that this antiproliferative action of I<sub>2</sub> in mammary or prostatic pathologies (hyperplasia, mammary gland fibrosis or cancer) is useful only if the I<sub>2</sub> supplement is maintained at moderated high concentrations, whereas its suppression resumes pathology progression [48]. These effects agree with epidemiological studies showing that Japanese population that decreased I<sub>2</sub> consumption increased the incidences in mammary and prostatic pathologies [49].

## Conclusions

The combination of DOX + I<sub>2</sub> in the modified scheme improved the therapeutic outcome of mammary cancer, increasing both survival rate and relapse-free survival.

## Abbreviations

6-IL: 6-iodolactone; ANOVA: Analysis of variance; DOX: Doxorubicin; ECG: Electrocardiogram; EMT: Epithelial-mesenchymal transition; H&E: Hematoxylin and eosin; I<sub>2</sub>: Molecular iodine; mDOX: Modified scheme; MDR1: Multidrug resistance protein 1; PPAR $\gamma$ : Peroxisome proliferator-activated receptors type gamma; qPCR: Quantitative real-time PCR; RECIST: Response evaluation criteria in solid tumors; sDOX: Standard scheme; Surv: Survivin; T3: Triiodothyronine; TSH: Thyrotropin; uPA: Urokinase plasminogen activator; VCOG-CTCAE: Veterinary co-operative oncology group – common terminology criteria for adverse events

## Acknowledgements

The authors appreciate the invaluable contribution of the Small Animal Veterinary Hospital of the Universidad Autónoma de Querétaro and Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM, proprietors of the patients, veterinary doctors and students. We also thank Alexander Bontempo, Maarten C. Anthey Werdler, Elsa Nydia Hernández Ríos, Brenda Ugalde Villanueva and María Juana Cárdenas for technical assistance; Lourdes Lara for academic support; Alberto Lara, Omar Gonzalez, Ramon Martínez and Sandra Hernández for computer assistance and Jessica González Norris for proofreading.

## Ethical approval and consent to participate

Protocol and clinical methods were accepted by the signed informed consent of the proprietors of the patients. Additionally, all procedures followed the Animal care and use program (NIH, USA) and were approved by the Research ethics committee of El Instituto de Neurobiología, Campus UNAM-Juriquilla (Protocol #102).

## Funding

This work was supported by grants from *Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica* (PAPIIT-UNAM; 200813, 209717 and 201516) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (235961). Xóchitl Zambrano-Estrada was a graduate student from the Programa de Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal at UNAM and received

fellowship from CONACYT (356685). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## Authors' contributions

XZE performed the clinical protocols as the coordinator of both Veterinary Hospital teams, participated in scientific discussions and wrote the manuscript. BLQ, AADB, MADPC, and GHA performed the staff of Veterinary Hospital FES-Cuautitlán UNAM and were responsible for the care and management of canine patients; BSP, MTM, and LPG performed the faculty of Veterinary Hospital at UAQ and were responsible for the care and management of canine patients. EDG performed qPCR and thyroid status assay. BA contributed to statistical and scientific discussions. CA provided the concept design and academic direction and contributed to editing and drafting of the manuscript. All authors have read and approved the final document.

## Consent for publication

Not applicable.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Author details

<sup>1</sup>Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard Juriquilla 3001, CP 76230 Querétaro, Mexico. <sup>2</sup>Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico. <sup>3</sup>Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Mexico City, Mexico.

Received: 8 November 2017 Accepted: 5 March 2018

Published online: 12 March 2018

## References

- Pinho SS, Carvalho S, Cabral J, Reis CA, Gärtner F. Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. *Transl Res*. 2012; 159:165–72.
- Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC, Dessiris A. Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. 2001;48:85–96.
- Lavalle GE, De Campos CB, Bertagnolli AC, Cassali GD. Canine malignant mammary gland neoplasm with advanced clinical staging treated with carboplatin and cyclooxygenase inhibitors. *In Vivo*. 2012;26:375–9.
- Arenas C, Peña L, Granados-Soler JL, Pérez-Alenza MD. Adjuvant therapy for highly malignant canine mammary tumours: Cox-2 inhibitor versus chemotherapy: a case-control prospective study. *Vet Rec*. 2016; <https://doi.org/10.1136/vr.103398>.
- Karayannopoulou M, Lafiontatis S. Recent advances on canine mammary cancer chemotherapy: a review of studies from 2000 to date. *Revue Med Vet*. 2016;167:192–200.
- Mauri D, Pavlidis N, Ioannidis JP. Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. *J Ntl Cancer Inst*. 2005;97:188–94.
- Wiley JL, Rook KA, Clifford CA, Gregor TP, Sorenmo KU. Efficacy of doxorubicin-based chemotherapy for non-resectable canine subcutaneous haemangiosarcoma. *Vet Comp Oncol*. 2010;8:221–33.
- Mestrinho LA, Bernardo E, Niza MM, Lloret A, Buracco P. Neoadjuvant chemoradiotherapy and surgery as treatment for oral maxillary squamous cell carcinoma in a dog. *Aust Vet J*. 2012;90:264–8.
- Wouda RM, Hocker SE, Higginbotham ML. Safety evaluation of combination carboplatin and toceranib phosphate (palladia) in tumour-bearing dogs: a phase I dose finding study. *Vet Comp Oncol*. 2017; <https://doi.org/10.1111/vco.12332>.
- van Dalen EC, van der Pal HJ, Kremer LC. Different dosage schedules for reducing cardiotoxicity in people with cancer receiving anthracycline



- chemotherapy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016:CD005008. <https://doi.org/10.1002/14651858>.
11. Tien CC, Peng YC, Yang FL, Subeq YM, Lee RP. Slow infusion rate of doxorubicin induces higher pro-inflammatory cytokine production. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2016;81:69–76.
  12. Polton G. Novel drug approaches in veterinary cancer therapy. *Vet Ireland J.* 2014;4:27–32.
  13. Leach TN, Childress MO, Greene SN, Mohamed AS, Moore GE, Schrempp DR, Lahrman SR, Knapp DW. Prospective trial of metronomic chlorambucil chemotherapy in dogs with naturally occurring cancer. *Vet Comp Oncol.* 2012;10:102–12.
  14. Elmslie RE, Glawe P, Dow SW. Metronomic therapy with cyclophosphamide and piroxicam effectively delays tumor recurrence in dogs with incompletely resected soft tissue sarcomas. *J Vet Intern Med.* 2008;22:1373–9.
  15. Vail DM, von Euler H, Rusk AW, Barber L, Clifford C, Elmslie R, Fulton L, Hirschberger J, Klein M, London C, Martano M, McNeil EA, Morris JS, Northrup N, Phillips B, Polton G, Post G, Rosenberg M, Ruslander D, Sahara A, Siegel S, Thamm D, Westberg S, Winter J, Khanna C. A randomized trial investigating the efficacy and safety of water soluble micellar paclitaxel (Paccal vet) for treatment of nonresectable grade 2 or 3 mast cell tumors in dogs. *J Vet Intern Med.* 2012;26:598–607.
  16. London CA, Malpas PB, Wood-Follis SL, Boucher JF, Rusk AW, Rosenberg MP, Henry CJ, Mitchener KL, Klein MK, Hintermeister JG, Bergman PJ, Couto GC, Mauldin GN, Michels GM. Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumor following surgical excision. *Clin Cancer Res.* 2009;15:3856–65.
  17. London C, Mathie T, Stingle N, Clifford C, Haney S, Klein MK, Beaver L, Vickey K, Vail DM, Hershey B, Ettinger S, Vaughan A, Alvarez F, Hillman L, Kiselow M, Thamm D, Higginbotham ML, Gauthier M, Krick E, Phillips B, Ladue T, Jones P, Bryan J, Gill V, Novasad A, Fulton L, Carreras J, McNeill C, Henry C, Gillings S. Preliminary evidence for biologic activity of toceranib phosphate (palladia<sup>®</sup>) in solid tumours. *Vet Comp Oncol.* 2012;10:194–205.
  18. Fazekas J, Fördös I, Singer J, Jensen-Jarolim E. Why man's best friend, the dog, could also benefit from an anti-HER-2 vaccine. *Oncol Lett.* 2016;12:2271–6.
  19. Thamm DH, Kurzman ID, Clark MA, Ehrhart EJ, Kraft SL, Gustafson DL, Vail DM. Preclinical investigation of PEGylated tumor necrosis factor  $\alpha$  in dogs with spontaneous tumors: phase I evaluation. *Clin Cancer Res.* 2010;16:1498–508.
  20. Bolger GT, Licollari A, Tan A, Greil R, Vcelar B, Majeed M, Helson L. Distribution and metabolism of lipocurc<sup>™</sup> (liposomal curcumin) in dog and human blood cells: species selectivity and pharmacokinetic relevance. *Anticancer Res.* 2017;37:3483–92.
  21. Aceves C, Anguiano B, Delgado G. The extrathyronine actions of iodine as antioxidant, apoptotic, and differentiation factor in various tissues. *Thyroid.* 2013;23:938–46.
  22. Rösner H, Möller W, Groebner S, Torremante P. Antiproliferative/cytotoxic effects of molecular iodine, povidone-iodine and Lugol's solution in different human carcinoma cell lines. *Oncol Lett.* 2016;12:2159–62.
  23. Bontempo A, Ugalde-Villanueva B, Delgado-González E, Rodríguez AL, Aceves C. Molecular iodine impairs chemoresistance mechanisms, enhances doxorubicin retention and induces downregulation of the CD44+/CD24+ and E-cadherin+/vimentin+ subpopulations in MCF-7 cells resistant to low doses of doxorubicin. *Oncol Rep.* 2017; <https://doi.org/10.3892/or.2017.5934>.
  24. Alfaro Y, Delgado G, Cárabez A, Anguiano B, Aceves C. Iodine and doxorubicin, a good combination for mammary cancer treatment: antineoplastic adjuvancy, chemoresistance inhibition, and cardioprotection. *Mol Cancer.* 2013;12:45–56.
  25. Aceves C, Peralta G, Torres J, Delgado G, Domínguez A, De Obaldía R, Duarte LF, Paredes E, Avecilla C. Iodine-supplemented diets prevents the development of resistance in breast cancer chemotherapy: participation of proliferative peroxisome-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ). In: AACR special conference: Advances in Breast Cancer Research; 2011.
  26. Nava-Villalba M, Nuñez-Anita RE, Bontempo A, Aceves C. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is crucial for antitumoral effects of 6-iodolactone. *Mol Cancer.* 2015;14:168–72.
  27. Yousefi B, Zarghami N, Samadi N, Majidinia M. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands in cancer drug- resistance: opportunity or challenge. *Anti Cancer Agents Med Chem.* 2016;16:1541–8.
  28. Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R, Zappulli V. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol.* 2011;48:117–31.
  29. Veterinary cooperative oncology group - common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.1. *Vet Comp Oncol.* 2016;14:417–46.
  30. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer.* 2009;45:228–47.
  31. Arroyo-Helguera O, Rojas E, Delgado G, Aceves C. Signaling pathways involved in the antiproliferative effect of molecular iodine in normal and tumoral breast cells: evidence that 6-iodolactone mediates apoptotic effects. *Endocr Relat Cancer.* 2008;15:1003–11.
  32. Upadhyay G, Singh R, Sharma R, Balapure AK, Godbole MM. Differential action of iodine on mitochondria from human tumoral- and extra-tumoral tissue in inducing the release of apoptogenic proteins. *Mitochondrion.* 2002;2:199–210.
  33. Rillema JA, Mulder JA. Arachidonic acid distribution in lipids of mammary glands and DMBA-induced tumors of rats. *Prostaglandins Med.* 1978;1:31–8.
  34. Razanamahefa L, Prouff S, Bardon S. Stimulatory effect of arachidonic acid on T-47D human breast cancer cell growth is associated with enhancement of cyclin D1 mRNA expression. *Nutr Cancer.* 2000;38:274–80.
  35. Aceves C, García-Solis P, Arroyo-Helguera O, Vega-Riveroll L, Delgado G, Anguiano B. Antineoplastic effect of iodine in mammary cancer: participation of 6-iodolactone (6-IL) and peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Mol Cancer.* 2009;8:33–6.
  36. Nuñez-Anita RE, Arroyo-Helguera O, Cajero-Juárez M, López-Bojorquez L, Aceves C. A complex between 6-iodolactone and the peroxisome proliferator-activated receptor type gamma may mediate the antineoplastic effect of iodine in mammary cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2009;89:34–42.
  37. Reka AK, Kurapati H, Narala VR, Bommer G, Chen J, Standiford TJ, Keshamouni VG. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation inhibits tumor metastasis by antagonizing Smad3-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cancer Ther.* 2010;9:3221–32.
  38. Wahl GM, Spike BT. Cell state plasticity, stem cells, EMT, and the generation of intra-tumoral heterogeneity. *NPJ Breast Cancer.* 2017; <https://doi.org/10.1038/s41523-017-0012-z>.
  39. Asano Y, Kashiwagi S, Goto W, Kurata K, Noda S, Takashima T, Onoda N, Tanaka S, Ohsawa M, Hirakawa K. Tumour-infiltrating CD8 to FOXP3 lymphocyte ratio in predicting treatment responses to neoadjuvant chemotherapy of aggressive breast cancer. *Br J Surg.* 2016;103:845–54.
  40. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, Budczies J, Darb-Esfahani S, Kronenwett R, Hanusch C, von Törne C, Weichert W, Engels K, Solbach C, Schrader I, Diel M, von Minckwitz G. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28:105–13.
  41. Beukelman CJ, van den Berg AJ, Hoekstra MJ, Uhl R, Reimer K, Mueller S. Anti-inflammatory properties of a liposomal hydrogel with povidone-iodine (Repithel) for wound healing in vitro. *Burns.* 2008;34:845–55.
  42. Soriguer F, Gutiérrez-Repiso C, Rubio-Martin E, Linares F, Cardona I, López-Ojeda J, Pacheco M, González-Romero S, Garriga MJ, Velasco I, Santiago P, García-Fuentes E. Iodine intakes of 100–300  $\mu\text{g}/\text{d}$  do not modify thyroid function and have modest anti-inflammatory effects. *Br J Nutr.* 2011;105:1783–90.
  43. Miyachi Y, Niwa Y. Effects of potassium iodide, colchicine and dapsone on the generation of polymorphonuclear leukocyte-derived oxygen intermediates. *Br J Dermatol.* 1982;209–14.
  44. Honma K, Saga K, Onodera H, Takahashi M. Potassium iodide inhibits neutrophil chemotaxis. *Acta Derm Venereol.* 1990;70:247–9.
  45. Costa RO, Macedo PM, Carvalho A, Bernardes-Engemann AR. Use of potassium iodide in dermatology: updates on an old drug. *An Bras Dermatol.* 2013;88:396–402.
  46. Moore K, Thomas A, Harding KG. Iodine released from the wound dressing iodisorb modulates the secretion of cytokines by human macrophages responding to bacterial lipopolysaccharide. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997;29:163–71.
  47. McCarty MF, Barroso-Aranda J, Contreras F. PPAR gamma agonists can be expected to potentiate the efficacy of metronomic chemotherapy through CD36 up-regulation. *Med Hypotheses.* 2008;70:419–23.

48. Aceves C, Anguiano B. Is iodine an antioxidant and Antiproliferative agent for the mammary and prostate glands? In: Preedy VR, Burrow GN, Watson RR, editors. *Comprehensive Handbook of Iodine*. Oxford: Academic Press, Elsevier; 2009. p. 249–57.
49. Zava TT, Zava DT. Assessment of Japanese iodine intake based on seaweed consumption in Japan: a literature-based analysis. *Thyroid Res*. 2011; <https://doi.org/10.1186/1756-6614-4-14>.

Submit your next manuscript to BioMed Central  
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)

