



**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
FACULTAD DE VETERINARIA
INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD
ALIMENTARIA
DIVISIÓN DE HISTOLOGÍA Y PATOLOGÍA ANIMAL
PROGRAMA DE DOCTORADO DE SANIDAD Y PATOLOGÍA ANIMAL**

**“EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA 14-3-3 σ EN
TEJIDOS NORMALES Y NEOPLASIAS MAMARIAS DE
LA ESPECIE CANINA”**

**ALEJANDRO SUÁREZ BONNET
LAS PALMAS DE GRAN CANARIA, MAYO DE 2011**



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
FACULTAD DE VETERINARIA
INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD
ALIMENTARIA
DIVISIÓN DE HISTOLOGÍA Y PATOLOGÍA ANIMAL
PROGRAMA DE DOCTORADO DE SANIDAD Y PATOLOGÍA ANIMAL

**“EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA 14-3-3 σ EN
TEJIDOS NORMALES Y NEOPLASIAS MAMARIAS DE
LA ESPECIE CANINA”**

*Tesis Doctoral presentada por D. Alejandro Suárez Bonnet para optar al grado
de Doctor en Veterinaria.*

Fdo: Alejandro Suárez Bonnet

LAS PALMAS DE GRAN CANARIA, MAYO DE 2011



ANTONIO ESPINOSA DE LOS MONTEROS Y ZAYAS, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD DEL ÁREA DE CONOCIMIENTO DE ANATOMÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA COMPARADAS DEL DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA U.L.P.G.C.

INFORMA:

Que **D. Alejandro Suárez Bonnet**, Licenciado en Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado “**Expresión de la proteína 14-3-3 σ en tejidos normales y neoplasias mamarias de la especie canina**”, el cual considero reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

FDO: DR. ANTONIO ESPINOSA DE LOS MONTEROS Y ZAYAS

LAS PALMAS DE GRAN CANARIA, MAYO DE 2011



**PEDRO HERRÁEZ THOMAS, PROFESOR TITULAR DE UNIVERSIDAD DEL
ÁREA DE CONOCIMIENTO DE ANATOMÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA
COMPARADAS DEL DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA DE LA
FACULTAD DE VETERINARIA DE LA U.L.P.G.C.**

INFORMA:

Que **D. Alejandro Suárez Bonnet**, Licenciado en Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado “**Expresión de la proteína 14-3-3 σ en tejidos normales y neoplasias mamarias de la especie canina**”, el cual considero reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

FDO: DR. PEDRO HERRÁEZ THOMAS

LAS PALMAS DE GRAN CANARIA, MAYO DE 2011

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Embriología, Anatomía e Histología de la glándula mamaria canina	7
2.1.1. Embriología	8
2.1.2. Anatomía	10
2.1.2.1. Riego sanguíneo	10
2.1.2.2. Drenaje linfático	11
2.1.3. Histología.....	12
2.2. Neoplasias mamarias en la especie canina	19
2.2.1. Características Clínicas y Pronóstico.....	19
2.2.1.1. Edad	19
2.2.1.2. Sexo	20
2.2.1.3. Razas	20
2.2.1.4. Variables geográficas y medioambientales	21
2.2.1.5. Hormonas	21
2.2.1.6. Dietas y Obesidad	23
2.2.1.7. Presentación Clínica.....	24
2.2.1.8. Diagnóstico y Estadiaje	26
2.2.1.9. Factores pronósticos clínicos	30
2.2.2. Características Histológicas	34
2.2.2.1. Clasificación.....	34
2.2.2.2. Factores pronósticos histológicos	35
2.2.3. Tratamiento	44
2.2.4. Etiopatogenia: Carcinogénesis	47
2.2.4.1. Oncogenes.....	49
2.2.4.2. Genes supresores de tumores.....	51
2.2.4.3. Apoptosis	52
2.3. Proteínas p63.....	53
2.4. Proteínas 14-3-3	55
2.4.1. Proteína 14-3-3 σ	58
2.4.1.1. Regulación del gen y la proteína 14-3-3 σ en respuesta al daño genético	59
2.4.1.2. Funciones de la proteína 14-3-3 σ en los queratinocitos	62

2.4.1.3. Expresión de la proteína 14-3-3 σ en tejidos normales humanos	63
2.4.1.4. Expresión de la proteína 14-3-3 σ en tejidos neoplásicos humanos	64
3. MATERIAL Y MÉTODOS	69
3.1. Estandarización de la técnica inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ en tejidos de la especie canina	71
3.1.1. Anticuerpos primarios	71
3.1.2. Procedimiento	72
3.1.3. Evaluación de las preparaciones y análisis estadístico.....	76
3.2. Estandarización de la técnica de detección mediante Western blot de la proteína 14-3-3 σ en tejidos de la especie canina.....	77
3.2.1. Anticuerpos primarios	77
3.2.2. Extracción total de la proteína.....	78
3.2.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y Western blot.....	78
3.3. Técnica de doble inmunotinción para la detección de las proteínas 14-3-3 σ y p63 en tejidos de la especie canina	81
3.3.1. Protocolo de tinción.....	81
3.3.2. Evaluación de las preparaciones.....	84
3.4. Tejidos empleados en el estudio	84
3.4.1. Tejidos control.....	84
3.4.2. Tejidos normales caninos	85
3.4.3. Tejidos neoplásicos mamarios caninos	86
3.4.3.1. Características microscópicas analizadas de las neoplasias incluidas en el estudios	88

4. RESULTADOS	91
4.1. Localización y distribución inmunohistoquímica de las proteínas 14-3-3 σ en tejidos normales de la especie canina.	93
4.1.1. Expresión de la proteína 14-3-3 σ en tejidos control.....	93
4.1.2. Expresión de la proteína 14-3-3 σ en tejidos normales caninos	95
4.1.2.1. Piel.....	97
4.1.2.2. Aparato digestivo	99
4.1.2.3. Aparato respiratorio	106
4.1.2.4. Aparato urinario.....	107
4.1.2.5. Aparato reproductor del macho	109
4.1.2.6. Aparato reproductor de la hembra.....	110
4.1.2.7. Glándula mamaria	111
4.1.2.8. Glándulas endocrinas.....	112
4.1.2.9. Tejido linfoide.....	113
4.1.2.10. Otros tejidos.....	114
4.2. Expresión de la proteína 14-3-3 σ en tejidos normales de la especie canica mediante Western blot	115
4.3. Localización y distribución inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ en tejidos normales, displásicos y neoplásicos mamarios de la especie canina.....	116
4.3.1. Glándula mamaria normal y displásica.....	117
4.3.2. Neoplasias benignas	119
4.3.3. Neoplasias malignas	123
4.3.4. Invasiones vasculares	131
4.3.5. Metástasis	132
4.3.6. Análisis estadístico	134
4.4. Expresión de la proteína 14-3-3 σ en tejidos normales, displásicos y neoplásicos mamarios de la especie canina mediante Western blot	136
4.5. Co-expresión de las proteínas 14-3-3 σ y p63 en tejidos normales y neoplásicos mamarios de la especie canina	137
4.5.1. Controles positivos.....	137
4.5.2. Glándula mamaria normal.....	138
4.5.3. Neoplasias malignas	139

5. DISCUSIÓN	143
5.1. Expresión de la proteína 14-3-3 σ en función del clon y la técnica empleada para su análisis.	145
5.2. Expresión de la proteína 14-3-3 σ en tejidos normales caninos	148
5.3. Expresión de la proteína 14-3-3 σ en tejidos mamarios normales, displásicos y neoplásicos caninos.	160
5.4. Relevancia clínica de la expresión de la proteína 14-3-3 σ en los tejidos neoplásicos mamarios caninos.....	172
6. CONCLUSIONES	175
7. RESUMEN/SUMMARY	179
8. AGRADECIMIENTOS	185
9. BIBLIOGRAFÍA	191
10. ANEXO I	237

Las neoplasias de la glándula mamaria son los tumores más frecuentes en la perra, particularmente, en muchos países europeos donde los animales no son rutinariamente esterilizados a edades tempranas. Histológicamente, aproximadamente el 50% de estas neoplasias son diagnosticadas como malignas y la metástasis a distancia es una causa común de muerte en estos pacientes (Misdorp, 2002; Lana *et al.*, 2007; Klopfleisch *et al.*, 2011). El tratamiento de los tumores de mama caninos es predominantemente quirúrgico, de tal manera que los tejidos fijados en formol están disponibles para su examen histopatológico recayendo sobre el patólogo la responsabilidad de dar una clasificación precisa del tumor así como una estimación del pronóstico.

Por otra parte, debido a que los tumores de mama espontáneos de la perra y la mujer comparten numerosas características morfológicas y clínicas, múltiples investigadores han propuesto a esta patología como un modelo animal de enfermedad humana (Antuofermo *et al.*, 2007; Klopfleisch *et al.*, 2011).

Sin embargo, en contraposición a la especie humana o a los animales de laboratorio, se tienen pocos conocimientos precisos sobre los mecanismos y las moléculas involucradas en el desarrollo de tumores mamarios en la especie canina (Klopfleisch *et al.*, 2011). De hecho, cada año son numerosas las publicaciones que tratan de arrojar luz sobre el papel de moléculas involucradas en el cáncer de mama humano y para las que se espera un papel similar para la especie canina.

Las proteínas 14-3-3 constituyen una familia de proteínas ácidas, altamente conservadas entre especies, compuesta por al menos siete isoformas. Se ha descrito que las proteínas 14-3-3 pueden interaccionar con más de 200 proteínas a través de uniones dependientes o independientes de fosforilación. Hasta la fecha se conocen sólo algunas consecuencias de estas interacciones y, por tanto, son sujeto de estudios exhaustivos. Las proteínas 14-3-3 controlan el ciclo, el crecimiento, la diferenciación, la supervivencia, la apoptosis y la migración celular. Recientes estudios han revelado nuevos mecanismos y funciones de las proteínas 14-3-3, dando a los investigadores

un mayor entendimiento de esta compleja y fascinante familia de proteínas (Tzivion *et al.*, 2006).

De las siete isoformas, la proteína 14-3-3 σ parece estar directamente involucrada en el cáncer en la especie humana. El gen 14-3-3 σ es regulado por el gen p53 tras producirse un daño en el ADN y por procesos epigenéticos y, en este sentido, se ha descrito tanto la pérdida de expresión de la proteína 14-3-3 σ como su sobreexpresión en diferentes tipos de cáncer humano, incluido el carcinoma de mama (Hermeking 2003; Li *et al.*, 2009). Por otra parte, la proteína 14-3-3 σ ha demostrado ser un marcador muy sensible y específico de células mioepiteliales en la mama humana (Simpson *et al.*, 2004).

En la especie canina no se han realizado estudios que detecten la expresión de la proteína 14-3-3 σ . Por tanto los objetivos de la presente Tesis Doctoral fueron los siguientes:

1. Estandarizar la técnica inmunohistoquímica de detección de la proteína 14-3-3 σ en muestras de tejido de la especie canina fijadas en formol e incluidas en parafina y la técnica de Western blot en tejidos frescos conservados a -80°C.
2. Estudiar la presencia y distribución de la proteína 14-3-3 σ en muestras de tejidos normales de la especie canina.
3. Estudiar la presencia y distribución de la proteína 14-3-3 σ en muestras de neoplasias mamarias de la especie canina y sus metástasis.
4. Comparar la utilidad de la proteína 14-3-3 σ como marcador de células mioepiteliales con el marcador específico de dichas células, la proteína p63.

2.1. EMBRIOLOGÍA, ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DE LA GLÁNDULA MAMARIA CANINA

Para comprender las diferentes alteraciones de tipo displásico y neoplásico, así como los fenómenos de diseminación y metástasis tumoral que afectan a la glándula mamaria, se justifica como *conditio sin equanom* describir la mama desde un punto de vista anatómico, embriológico e histológico. Y es que, para realizar un diagnóstico histológico preciso de las enfermedades mamarias, es imprescindible estudiar la morfología estructural de esta glándula en su estadio normal. En este sentido, hay que destacar que la histología de la glándula mamaria evoluciona y se modifica desde la época fetal, pasando por la pubertad y los diferentes periodos del ciclo reproductor, hasta llegar a la vejez. Por lo tanto, para determinar cuándo una muestra de tejido mamario es normal o, por el contrario, revela alteraciones patológicas, deben de tenerse en cuenta estas variables (Santos *et al.*, 2010).

Ontogénicamente, y desde un punto de vista estrictamente anatómico, la glándula mamaria o mama se considera una glándula cutánea (Monteiro-Riviere y Stinson, 1998). Las mamas sólo se desarrollan por completo en la hembra, estando su fisiología supeditada a los ritmos gestacionales: los estados de gestación y postparto en la hembra condicionan los de reposo y actividad funcional de la glándula mamaria. En el macho estas glándulas permanecen como rudimentos no funcionales (Sandoval, 2003; Guyton y Hall, 2008).

El desarrollo de la glándula mamaria está influenciado por múltiples hormonas, entre ellas, los estrógenos, la hormona del crecimiento, la prolactina, los glucocorticoides adrenales y la insulina. Desde la época fetal hasta el periodo prepuberal, el crecimiento del sistema ductal es proporcional al del resto del crecimiento corporal. En la pubertad los estrógenos activan el crecimiento y desarrollo ductal, mientras que los progestágenos son necesarios para el desarrollo lobulillo-alveolar. Por su parte, la somatotropina y la prolactina hipofisaria inducen el crecimiento del parénquima y el mantenimiento de la lactación, respectivamente (Guyton y Hall, 2008).

2.1.1. EMBRIOLOGÍA

La glándula mamaria, como todo órgano cutáneo, procede del ectodermo. Las **bandas mamarias** (Fig. 1), que se corresponden con un par de engrosamientos epidérmicos longitudinales, dispuestas lateralmente al eje sagital del embrión, constituyen los primeros esbozos de las mamas. Por proliferación epitelial de su centro longitudinal, las bandas mamarias se transforman en **crestas mamarias** (Fig. 1). La localización lateral de las crestas se modifica en función del estiramiento progresivo de los dermatomos y del mesénquima subyacente que preside el desarrollo de la pared corporal (Sandoval, 2003).

Las crestas dejan paso a las **eminencias mamarias** (Fig. 1) que se definen a manera de “cordón perlado” en dirección cráneo-caudal. Estas eminencias son consecuencia de la multiplicación y concentración de las células epidérmicas de la cresta y paralela condensación del mesénquima subyacente. Es decir, entre eminencia y eminencia desaparece cualquier vestigio de cresta mamaria (Sandoval, 2003).

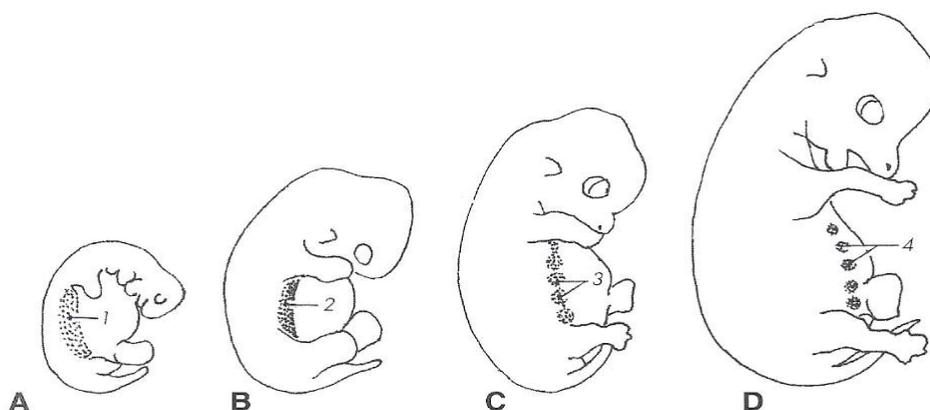


Figura 1. **Embriología mamaria. Representación semi-esquemática de las primeras etapas del desarrollo prenatal (A-D) de las mamas.** 1, banda mamaria; 2, cresta mamaria; 3, eminencias mamarias; 4, yemas mamarias. Nótese la posición de las eminencias y yemas respecto a la primitiva banda mamaria, debido al estiramiento de los dermatomos durante la morfogénesis de la pared corporal (Sandoval, 2003).

Sin embargo, en ocasiones, este proceso no se desarrolla de una manera eficaz y quedan restos de la misma que pueden dar lugar a "eminencias mamarias accesorias" y que en el adulto forman finalmente pezones supernumerarios, susceptibles de padecer transformaciones neoplásicas (Sandoval, 2003).

A partir de las eminencias, y por condensación de su epitelio que invade la dermis, se forman las **yemas mamarias** (Fig.1), que tienen un aspecto piriforme. Simultáneamente, el mesénquima aerolar que rodea la yema, y del que provienen los *brotos glandulares primarios*, induce la formación de cordones lactíferos y *brotos glandulares secundarios* durante el desarrollo fetal. Se forma así el *seno lactífero primitivo* que a su vez deja paso a los *conductos lactíferos primarios y secundarios* (Sandoval, 2003).

Finalmente, a la vez que se desarrolla el sistema de conductos, se produce una profusa queratinización de la epidermis que formó la yema mamaria dejando paso al *esbozo de la papila mamaria* (Fig. 2), conformándose su tejido adyacente como *circunvolución cutánea*. A la papila mamaria, ya constituida como tal, desembocan de 6-25 conductos papilares que comunican con el exterior (Fig. 2) (Sandoval, 2003).

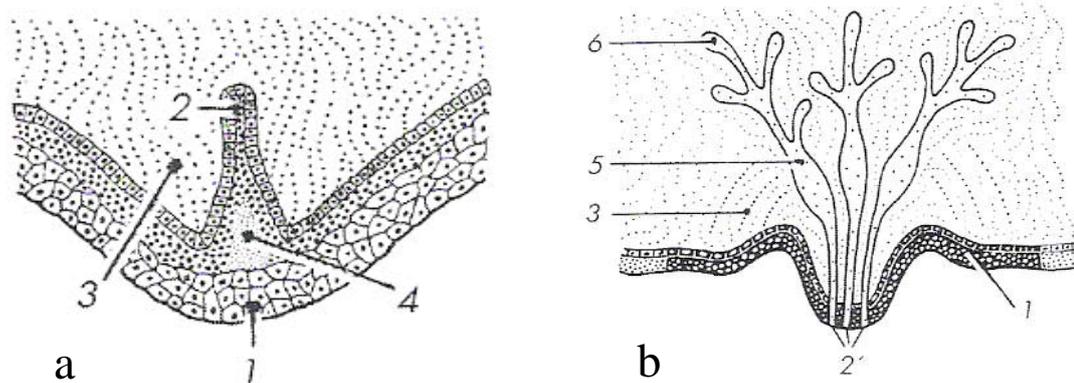


Figura 2. **Secciones sagitales de dos etapas de la formación de la papila mamaria.** a) Feto precoz. 1, epitelio del esbozo de la papila; 2, yema mamaria; 3, mesénquima areolar; 4, seno lactífero primitivo. b) Feto a término. 1, circunvolución cutánea, 2, conductos papilares; 3, mesénquima diferenciándose en fibras musculares esfintéricas; 5, cisterna o seno lactífero glandular; 6, brotes glandulares precursores de los conductos lactíferos (Sandoval, 2003).

2.1.2. ANATOMÍA

Debido al carácter múltiparo de la perra, y para asegurar la lactancia de la camada, la perra posee normalmente cinco pares de mamas, aunque a veces puede presentar cuatro o seis. Para describir la localización de una mama se utilizan dos sistemas: numerándolas del 1 al 5, siguiendo un orden de craneal a caudal, o son nombradas según la región donde se sitúen; torácicas craneales (1), torácicas caudales (2), abdominales craneales (3), abdominales caudales (4) e inguinales (5) (Morales, 2003; Sandoval, 2003).

Las mamas permanecen separadas entre si en estado de reposo, pero en periodos de lactación, debido a su aumento de tamaño, se aproximan las unas a las otras adoptando un aspecto coniforme (Sandoval, 2003).

La glándula mamaria de la perra carece de un aparato suspensorio específico. En esta región están descritas únicamente unas láminas incompletas que proceden de la fascia superficial del tronco y que, en colaboración con la piel, sustentan las mamas durante la lactación. En esta región también encontramos dos músculos supramarios que tensan y movilizan la piel de revestimiento. El músculo supramamario craneal se origina mediante dos fascículos en la región xifoidea y se extiende en finas y delicadas fibras por la base cutánea de las mamas más craneales y estribaciones craneales de la tuberosidad iliaca; el músculo supramamario caudal se origina en los músculos de la vulva (Sisson y Grossman, 1975; Sandoval, 2003).

2.1.2.1. Riego sanguíneo

El riego arterial de las mamas 1, 2 y 3 procede, lateralmente, de la arteria torácica lateral (de la arteria axilar) y, en profundidad, de la arteria epigástrica craneal superficial y de los ramos perforantes de las arterias intercostales (procedentes de la arteria torácica interna). Las mamas 4 y 5 son irrigadas por la arteria epigástrica caudal superficial (de la arteria pudenda externa) y, en profundidad, por ramas de las arterias abdominales craneal y circunfleja iliaca profunda. Las arterias y las venas satélites se anastomosan formando plexos arteriales y venosos (Fig. 3) (Morales, 2003; Sandoval, 2003).

2.1.2.2. Drenaje linfático

Las mamas 1, 2 y 3 drenan hacia el linfocentro axilar, tanto directa como indirectamente, al anastomosarse los vasos linfáticos de cada una de estas mamas con los de la mama que le precede. El linfonodo axilar es difícilmente palpable al estar cubierto por el músculo pectoral; no obstante, puede explorarse haciendo progresar el miembro cranealmente y pellizcando la piel existente a nivel del primer espacio intercostal o segunda costilla. El linfocentro axilar accesorio es de presencia inconstante. Las mamas 4 y 5 drenan a los linfonodos inguinales superficiales (mamarios), igualmente, tanto directa como indirectamente. Estos nódulos pueden palparse fácilmente, localizándose dorsal al borde caudal de la mama inguinal. Las porciones caudales de la mama 3 también drenan a este nódulo linfático, al anastomosarse sus vasos linfáticos con los de la mama 4 (Fig. 3) (Morales, 2003; Sandoval, 2003).

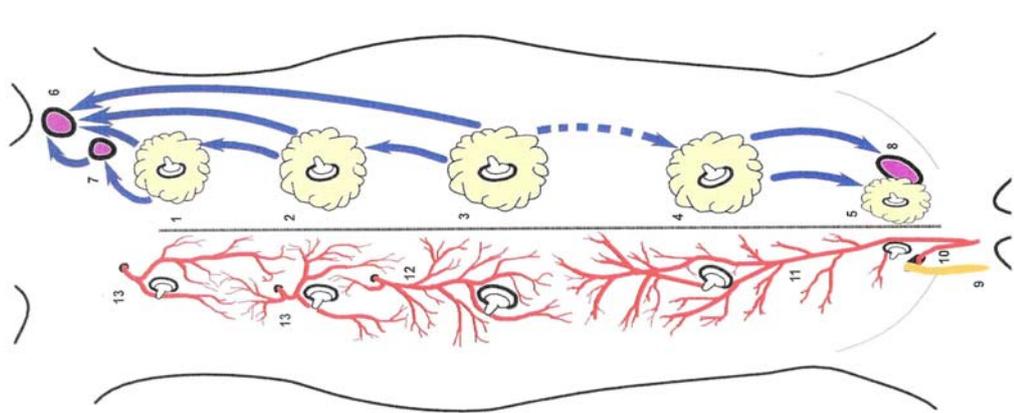


Figura 3. **Riego arterial y drenaje linfático de las mamas de la perra.** Las flechas azules indican la dirección de la linfa. 1, 2, 3, 4, 5: mamas torácica craneal, torácica caudal, abdominal craneal, abdominal caudal e inguinal. 6: linfonodo axilar. 7: linfonodo axilar accesorio. 8: linfonodo inguinal superficial. 9: proceso vaginal. 10: arteria pudenda externa. 11: arteria epigástrica caudal superficial. 12: Arteria epigástrica craneal superficial. 13: ramos perforantes de la arteria torácica interna (Morales, 2003).

Patsikas *et al.* (1996a, 1996b, 2006) investigaron el drenaje linfático de la glándula mamaria normal y neoplásica de perra, cuyos resultados se muestran en la Tabla 1. En perras sanas, el drenaje linfático se produce a los ganglios ipsilaterales, no existiendo drenaje hacia la glándula contralateral y sus linfonodos, no obstante el drenaje puede verse alterado en las neoplasias mamarias (Pereira *et al.*, 2003, 2008).

Tabla 1. Drenaje linfático de la glándula mamaria normal y neoplásica canina.

GLÁNDULA MAMARIA	DRENAJE LINFÁTICO NORMAL	DRENAJE LINFÁTICO NEOPLÁSICO
M1, craneal torácica	LN axilar	LN axilar, LN esternal
M2, caudal torácica	LN axilar	LN axilar, LN esternal
M3, craneal abdominal	LN axilar, LN inguinal superficial	LN axilar, LN inguinal superficial, LN ilíaco medial
M4, caudal abdominal	LN inguinal superficial	LN inguinal superficial, LN axilar
M5, inguinal	LN inguinal superficial	LN inguinal superficial, LN poplíteo

2.1.3. HISTOLOGÍA

Desde un punto de vista histológico, la mama es una glándula sudorípara apocrina modificada presente en el tejido conectivo subcutáneo. Es una glándula de tipo túbulo-alveolar compuesta en la que grupos de unidades secretoras (alveolos glandulares) forman lóbulos separados por septos de tejido conectivo, de origen mesodérmico, de espesor variable. Los alveolos glandulares, a través de un entramado de conductos, moviliza su producto de secreción (leche) hacia el exterior (Monteiro-Riviere, 2006).

El componente celular del sistema túbulo-alveolar es bifásico y consiste en una capa luminal simple de células epiteliales y una capa subyacente, también simple, de células mioepiteliales.

El alveolo glandular está tapizado por un epitelio simple cúbico, cuya altura varía según la fase de la actividad secretora (Fig. 4). Las **células epiteliales** de la mama son de morfología cúbica, tienen un citoplasma típicamente eosinofílico y un núcleo uniformemente ovalado. En estado de

lactancia, las células epiteliales alveolares (poseedoras de retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias en abundancia, varios complejos de Golgi, muchas gotitas de lípidos, múltiples vesículas que contienen caseínas y lactosa), secretan lípidos y proteínas (Monteiro-Riviere, 2006).

Los lípidos se almacenan como pequeñas gotas en el citoplasma. Su eliminación se realiza por la modalidad *apocrina* de exocitosis, que consiste en la coalescencia de gotas pequeñas para formar gotas cada vez más grandes que se movilizan a la periferia de la célula. Finalmente, se expulsan a la luz como vesículas compuestas por una gota central de lípidos rodeada por una pequeña porción de citoplasma y encerrada en un fragmento de membrana citoplasmática (Monteiro-Riviere, 2006).

Las proteínas que se sintetizan dentro de estas células secretoras se liberan de las células mediante la modalidad *merocrina* de exocitosis. Por otra parte, en la luz de los acinos pueden acumularse células descamadas, algunos macrófagos y leucocitos que forman parte de la secreción en la época de lactación principalmente (Monteiro-Riviere, 2006).

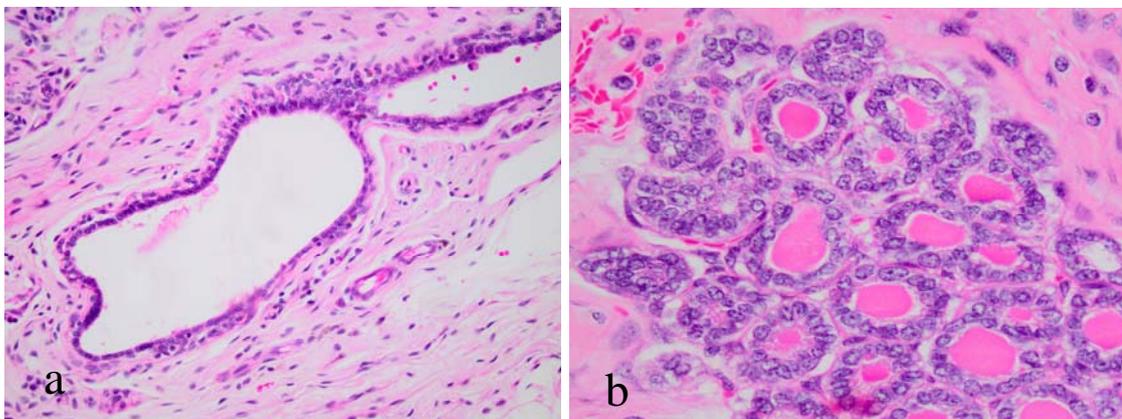


Figura 4. **Glándula mamaria normal canina.** El sistema lobular ductal de la mama está delimitado por una doble población celular, una capa interna de células epiteliales y otra externa de células mioepiteliales. a) Conducto lobular. Las capas de células epiteliales y mioepiteliales se distinguen con claridad. 10x. HE. b) Lóbulo mamario. Las células mioepiteliales que rodean los acinos son variablemente evidentes. 40x. HE.

Las células epiteliales se caracterizan por expresar citoqueratinas (CKs) de bajo peso molecular como son la CK5, CK7, CK8, CK13, CK18 y CK19

(Hellmén y Lindgren, 1989b; Destexhe *et al.*, 1993; Griffey *et al.*, 1993; Vos *et al.*, 1993a; 1993b).

Entre las células epiteliales y la membrana basal se localizan las **células mioepiteliales**. Estas células tienen capacidad contráctil y responden a la oxitocina de origen hipofisario, facilitando el paso de la secreción láctea de los acinos a los conductos (Guyton y Hall, 2008). Las células mioepiteliales poseen un elevado pleomorfismo celular. Pueden ser células muy difíciles de distinguir, células aplanadas con un núcleo comprimido o incluso células prominentes de tipo epitelioides con abundante citoplasma claro (Fig. 5a). En algunos casos las células mioepiteliales tienen una apariencia de fibra muscular (Fig. 5b), presentándose como células en forma de huso con un citoplasma eosinófilo y denso, reminiscencias todas ellas de un origen de fibra muscular lisa (Collins y Schnitt, 2007).

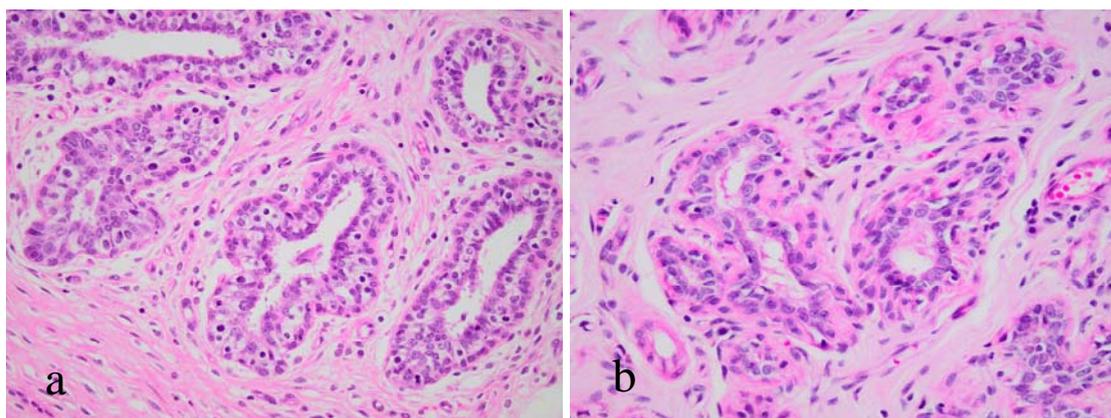


Figura 5. **Glándula mamaria normal canina**. Las células mioepiteliales pueden variar su apariencia histológica. a) En este lóbulo se aprecia un marcado aclaramiento de su citoplasma. 20x. HE. b) En este lóbulo presentan marcadas características musculares. 20x. HE.

Las células mioepiteliales se caracterizan por expresar CKs de alto peso molecular como la CK5, CK6, CK14 y CK17, además de otros marcadores como la actina de músculo liso, calponina, vimentina y p63 (Fig. 6) (Hellmén *et al.*, 1989b; Destexhe *et al.*, 1993; Espinosa de los Monteros *et al.*, 2002; Arai *et al.*, 2003; Gama *et al.*, 2003; Abd El-Rehim *et al.*, 2004; Polyak y Hu, 2005; Blanpain *et al.*, 2007). Debido a que las células mioepiteliales exhiben un doble fenotipo (epitelial y muscular) son denominadas también como células basales/mioepiteliales. Algunos investigadores han sugerido que existe una relación muy estrecha entre el compartimento de células

basales/mioepiteliales y las células madre/progenitoras de la glándula mamaria (Deugnier *et al.*, 2002; Polyak y Hu, 2005).

Conocer qué moléculas se expresan de manera normal en el tejido mamario es importante, ya que, durante la transformación celular y la tumorigénesis, la mayoría de los marcadores celulares parecen mantenerse, pudiendo ser utilizados como marcadores tumorales y facilitando el diagnóstico de aquellos casos en los que la técnica histoquímica de rutina hematoxilina y eosina son insuficientes (Chu *et al.*, 2000; Barak *et al.*, 2004, Ramos-Vara *et al.*, 2008; Webster *et al.*, 2011).

Cabe destacar que examinar la integridad de esta doble capa de células es fundamental durante el examen histológico de la glándula mamaria. (Collins y Schnitt, 2007).

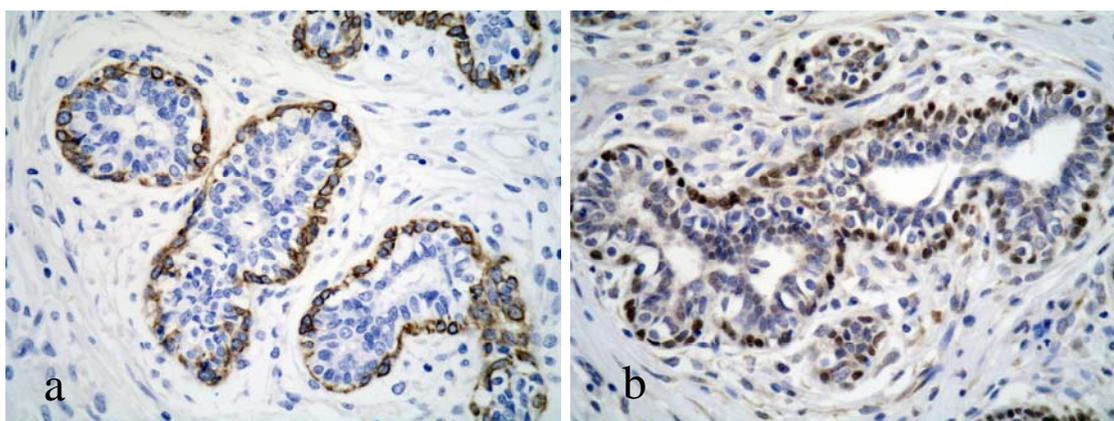


Figura 6. **Glándula mamaria normal canina.** a) La inmunotinción con CK14 evidencia el citoplasma de las células mioepiteliales que se presentan como una capa continua en torno a células epiteliales lobulares inmaduras. 20x. IHQ. b) La inmunotinción con p63 evidencia el núcleo de las células mioepiteliales que se presentan como una capa continua en torno a células epiteliales de este ducto interlobular. 20x. IHQ.

El **sistema de conductos** comienza con un conducto intralobulillar que drena en el conducto lobulillar. Éste drena en el conducto galactóforo lobular, que es el conducto excretor primario para cada lóbulo. El epitelio del conducto intralobulillar es simple cúbico y puede estar rodeado de células mioepiteliales. Los conductos lobulillares presentan al comienzo un epitelio simple cúbico y, distalmente, dos capas de células cúbicas. Conforme se fusionan para formar los conductos galactóforos, se rodean de fibras musculares lisas dispuestas longitudinalmente, desembocando en el pezón

por varios canales expuestos. La dermis del pezón presenta numerosos vasos sanguíneos que se dilatan durante la lactación. Los haces longitudinales de fibras musculares lisas entre el canal del pezón y la dermis se vuelven circulares, formando un esfínter en la superficie externa que evita el paso continuo de leche (Monteiro-Riviere, 2006).

Rehm *et al.* (2007) y Santos *et al.* (2010) han descrito la histología de la glándula mamaria canina durante el ciclo estral, conocimientos necesarios para una correcta evaluación de los cambios patológicos que se asientan en este órgano. En las perras prepúberes, durante la fase de proestro de su primer ciclo estral, sólo son detectables ductos alargados (ductos interlobulares) tapizados por una doble capa de células epiteliales y una única capa de células mioepiteliales, en el interior de un denso estroma de tejido conectivo interlobular. Proyectadas lateralmente desde la pared de estos ductos se observan estructuras lobulares rudimentarias formadas por células epiteliales con un núcleo eucromático, 1-2 nucléolos y bordes celulares poco definidos.

En perras adultas, durante la fase de proestro, la glándula se encuentra inactiva y consiste principalmente en ductos interlobulares y ocasionales lóbulos de pequeño tamaño rodeados por una variable cantidad de tejido conectivo inter e intralobular. En ocasiones, también pueden observarse estructuras alveolares del ciclo estral precedente, compuestas por células epiteliales vacuoladas de tipo cuboidal o aplanadas. Así mismo, pueden observarse macrófagos cargados de lipofuscina en la luz de los alveolos o en el tejido estromal intralobular.

La llegada del estro conlleva la proliferación del epitelio ductal intralobular, con la formación de múltiples ductos pequeños tapizados por un epitelio estratificado, similar al descrito previamente, dentro del tejido conectivo interlobular.

Durante el diestro temprano, cuando los niveles de progesterona se encuentran elevados, se produce un gran desarrollo de los ductos con formación de lóbulos. El epitelio que tapiza estos ductos es estratificado y las células presentan un núcleo redondeado a alargado, eucromático, con 1-2

nucléolos prominentes, observándose numerosas figuras mitóticas. Los fibroblastos en el tejido conectivo interlobular poseen núcleos más prominentes y pueden mostrar una actividad mitótica incrementada. Estos fibroblastos se localizan en una matriz mucinosa que contiene numerosos vasos sanguíneos congestionados (Fig. 7).

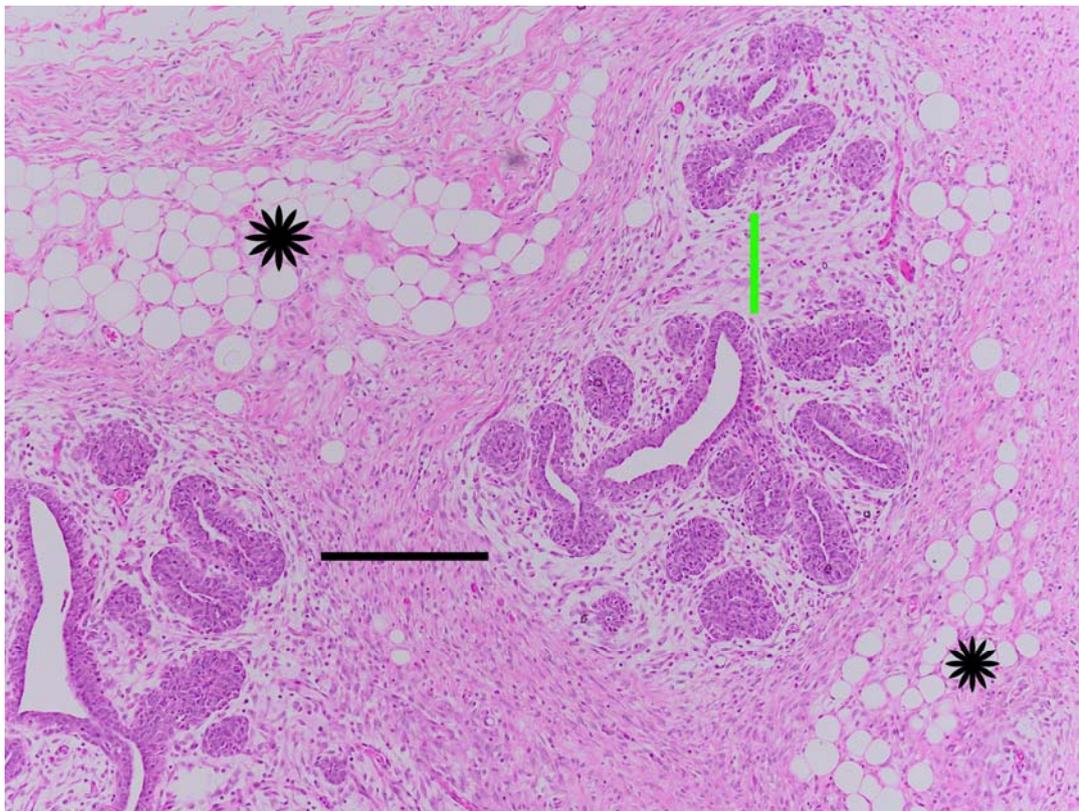


Figura 7. **Glándula mamaria canina. Diestro temprano.** Variable cantidad de tejido conectivo interlobular (barra negra) e intralobular (barra verde). También se observan áreas de tejido adiposo (asterisco). 10x. HE.

En diestro tardío, el desarrollo de la glándula mamaria canina ha culminado con la formación de alveolos secretores al final de los ductos intralobulares. Los alveolos presentan en su centro una secreción proteinácea eosinofílica y tapizados por células cuya morfología varía de cuboidal a más aplanada. Rodeando al epitelio alveolar, las células mioepiteliales se encuentran elongadas y forman una capa continua en torno a los alveolos menos desarrollados, y discontinua en torno a los alveolos completamente desarrollados y distendidos. Este último hallazgo se atribuye a la morfología estrellada de estas células mioepiteliales alveolares. Los ductos intralobulares

también tienen una moderada cantidad de secreción eosinofílica en la luz y se encuentran tapizados por un epitelio cuboidal y una capa de células mioepiteliales fusiformes junto a una mínima cantidad de estroma intralobular alrededor de los alveolos, mientras que el estroma interlobular está formado por bandas de colágeno y fibras de reticulina y rodea los ductos interlobulares.

La primera fase del anestro se caracteriza por la presencia de alveolos que contienen menor cantidad de secreción. Los alveolos están compuestos por células epiteliales vacuolizadas que yacen sobre una membrana basal más prominente. Algunos lóbulos muestran cambios asociados con la regresión de la glándula mamaria, con un aumento del estroma intralobular y por el infiltrado de linfocitos y células plasmáticas.

En el anestro tardío, los cambios asociados con la regresión de la glándula mamaria se vuelven más prominentes. La luz de los ductos disminuye en diámetro y los lóbulos disminuyen de tamaño. Con frecuencia se observan células con núcleos picnóticos tapizando los ductos y los alveolos y estructuras corpusculares eosinofílicas (*corpora amylacea*) en la luz de los ductos. El intersticio es más abundante, las fibras de colágeno aparecen más compactas y existe un infiltrado de linfocitos y células plasmáticas junto a macrófagos cargados de lipofuscina. El estroma interlobular aparece más abundante y compacto (Rehm *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2010).

2.2. NEOPLASIAS MAMARIAS EN LA ESPECIE CANINA

La presentación clásica de un paciente canino con tumor mamario se corresponde con una perra de edad avanzada, tanto de raza pura como mestiza, no esterilizada o esterilizada durante la edad adulta, con al menos una o más masas palpables en la cadena mamaria. Esta descripción clínica hace referencia a los dos factores de mayor riesgo para desarrollar esta patología: edad y exposición a hormonas. Otros factores asociados a un incremento del riesgo de desarrollar un tumor mamario son el sexo, la raza, dieta, obesidad y variables geográficas y medioambientales (Lana *et al.*, 2007; Sorenmo *et al.*, 2011).

2.2.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y PRONÓSTICO

2.2.1.1. Edad

Es uno de los factores de riesgo más importantes asociados al desarrollo de tumores de mama en la especie canina. En un estudio con una elevada cohorte de casos de una colonia de perras de raza Beagle, con tumores de mama espontáneos, se describió que el riesgo empezaba a ser estadísticamente significativo a partir de los 8 años de edad y se incrementaba linealmente con la edad a partir de este punto (Taylor *et al.*, 1976). Otro estudio basado en perras de diversas razas y de vida doméstica encontró un aumento progresivo de la incidencia de tumores de mama en edades avanzadas, con un pico de incidencia de casos entre los 9 y 11 años (Dorn *et al.*, 1968).

La edad de aparición, sin embargo, puede variar dependiendo de la esperanza de vida media de la raza, habiéndose reportado, en general, una edad media de 8-11 años, lo que indica que esta patología ocurre principalmente en perras de mediana y avanzada edad (Schneider, 1970; Priester *et al.*, 1971; Brodey *et al.*, 1983; Shofer *et al.*, 1989; Hellmén *et al.*, 1993). Las perras jóvenes tienen tendencia a desarrollar tumores benignos (Taylor *et al.*, 1976; Moulton *et al.*, 1986; Misdorp, 1988; Goldschmidt *et al.*, 2001) y, por otra parte, un estudio reciente ha descrito una diferencia

significativa entre edades y carácter de las neoplasias, encontrando una media de 8,5 años para neoplasias benignas frente a 9,5 años para tumores malignos (Sorenmo *et al.*, 2009). Los tumores mamarios son raros en perras menores de 5 años de edad, a no ser que hayan sido tratadas con hormonas exógenas (Schneider *et al.*, 1970; Taylor *et al.*, 1976).

2.2.1.2. Sexo

Los tumores que se desarrollan a partir del tejido mamario ocurren, casi exclusivamente, en las hembras. No obstante, también se han descrito tumores de mama espontáneos en los machos de la especie canina, indicando que las hembras tienen 62 veces más riesgo que los machos de desarrollar un tumor mamario (Brodey *et al.*, 1983; Madewell y Theilen, 1987; Saba *et al.*, 2007; Bearss *et al.*, 2011). Al contrario que los tumores de mama en las hembras, los tumores de mama en los machos son casi siempre benignos, expresan altos niveles de hormonas (estrógenos y progesterona) y tras la escisión quirúrgica tienen un comportamiento biológico benigno en la mayoría de los casos (Saba *et al.*, 2007; Bearss *et al.*, 2011).

2.2.1.3. Razas

Los tumores de mama pueden ocurrir en cualquier hembra canina de cualquier raza, pero ciertas tipos de perros y razas, tales como las razas toy (miniatura) suelen estar sobre-representadas en estudios epidemiológicos. Algunas de las razas gigantes presentan un mayor riesgo, no obstante estas descripciones varían de alguna manera según el lugar geográfico donde se realizó el estudio. Las razas puras más frecuentemente citadas son: English Springer Spaniel, Brittany, Cocker Spaniel, Setter Inglés, Pointer, Afgano y el Pastor Alemán, además de las razas de pequeño tamaño como Caniche, Maltés, Chihuahua, Beagle, Dachshund, West Highland White Terrier, Yorkshire Terrier y Bichón Frisé (Priester *et al.*, 1971; Cohen *et al.*, 1974; Mitchell *et al.*, 1974; Yamagami *et al.*, 1996a; Goldschmidt *et al.*, 2001; Moe, 2001; Richards *et al.*, 2001; Egenvall *et al.*, 2005; Bronden *et al.*, 2010). Estos estudios señalan que el riesgo de desarrollar un tumor mamario tiene algún tipo de asociación con la raza y, por lo tanto, un trasfondo genético.

El componente genético está además remarcado por el hecho de que algunos estudios han mostrado que ciertas líneas o familias dentro de una misma raza se encuentran en mayor riesgo que otras. Por ejemplo, la raza Bóxer aparenta tener un menor riesgo según algunos estudios realizados en Estados Unidos (Priester *et al.*, 1971; Brodey *et al.*, 1983; Goldschmidt *et al.*, 2001), mientras que en trabajos realizados en diferentes países europeos aparecen con mayor riesgo (Moe, 2001; Richards *et al.*, 2001; Brønden *et al.*, 2010). Un estudio realizado sobre una colonia de perros de raza Beagle mostró también una variación familiar dentro de la misma raza; mientras que una línea familiar tenía mayor riesgo otra tenía menor riesgo (Schafer *et al.*, 1998).

2.2.1.4. Variables geográficas y medioambientales

Al contrario de lo que ocurren en Medicina Humana, donde se observan incidencias cinco veces más altas en Estados Unidos y Europa que en los países asiáticos (Stricker y Kumar, 2010), en Medicina Veterinaria no se han observado diferencias en la incidencia de tumores mamarios, en perras no esterilizadas, entre las distintas áreas geográficas (Dorn *et al.*, 1968; Schneider, 1970; Dorn y Schneider 1976; Merlo *et al.*, 2008; Brønden *et al.*, 2010).

A diferencia de otros tumores, la influencia de la exposición a radiaciones es escasa, ya que no aumenta la incidencia de tumores mamarios, benignos o malignos, ni afecta la tasa de mortalidad en animales con carcinomas de mama, pero sí influye en la aparición a edades más tempranas del primer tumor mamario, benigno o maligno (Andersen y Rosenblatt, 1969; Moulton *et al.*, 1970; Moulton *et al.*, 1986; Benjamin *et al.*, 1999).

2.2.1.5. Hormonas

El influjo de hormonas ováricas endógenas, de manera temprana, en la vida de la perra es un factor crucial y determinante para el desarrollo de tumores de mama en perras. La publicación de referencia de Schneider *et al.*, en 1969, describe como el riesgo de una perra de desarrollar un tumor mamario se incrementa de manera drástica durante el primer ciclo estral, conclusión deducida por el hecho de que la realización de la

ovariohisterectomía antes del primer celo reduce este riesgo al 0,5%. El riesgo aumenta a un 8% y a un 26% si se realiza después del primer y el segundo celo, mientras que si se esteriliza a la perra después del tercer celo, la cirugía no ejerce efecto protector (Schneider *et al.*, 1969). Sin embargo, estudios posteriores han mostrado que una ovariohisterectomía tardía puede proporcionar alguna protección.

Los resultados publicados por Taylor *et al.* (1976) concluyeron que realizar la ovariohisterectomía después de los 4 años no confiere protección alguna frente al desarrollo de tumores mamarios. Hallazgos similares fueron descritos por Sonnenschein *et al.*, en 1991, en los que se describe efecto protector estadísticamente significativo en ovariohisterectomías realizadas antes del cuarto celo y efecto protector entre el cuarto y el sexto celo, pero sin significancia estadística. Un estudio realizado en los Países Bajos aportó evidencias de un posible efecto protector asociado incluso con ovariohisterectomía tardías (Misdorp *et al.*, 1988).

Otras variables reproductivas, tales como la irregularidad de los ciclos estrales, pseudogestaciones y gestaciones, que pueden resultar en cambios fisiológicos en los niveles endógenos de hormonas no han sido asociadas significativamente a la aparición de tumores mamarios en la perra (Brodey *et al.*, 1966; Schneider *et al.*, 1969; Taylor *et al.*, 1976).

La exposición a dosis farmacológicas de hormonas exógenas, progesterona y estrógenos, ha sido asociada, sin embargo, con un incremento del riesgo de desarrollo de tumores mamarios. Estos hallazgos están basados en un número importante de trabajos de investigación realizados sobre colonias de perras tratadas durante largos periodos de tiempo con varias dosis y combinaciones de progestágenos y estrógenos sintéticos y evaluadas periódicamente para el desarrollo de tumores mamarios (Geil *et al.*, 1977; Giles *et al.*, 1978; Kwapien *et al.*, 1980; Concannon *et al.*, 1981; Selman *et al.*, 1995). La mayoría de estos estudios encontraron de manera más temprana y frecuente el desarrollo de tumores que, significativamente, eran mayoritariamente benignos que malignos en perras tratadas con progestágenos, mientras que se describe un aumento del número de casos malignos cuando se combinan progestágenos con estrógenos (Geil *et al.*, 1977;

Giles *et al.*, 1978; Kwapien *et al.*, 1980; Concannon *et al.*, 1981; Selman *et al.*, 1995). La administración de progestágenos en perras domésticas con el objeto de retrasar o suprimir el celo también incrementa el riesgo del desarrollo de tumores (Misdorp, 1988).

2.2.1.6. Dietas y Obesidad

Un estudio de casos control que analizó la asociación entre la dieta, el estado de conformación corporal y el riesgo de desarrollar tumores mamarios demostró un menor riesgo, estadísticamente significativo, en perras que estaban delgadas entre los 9 y 12 meses de edad comparadas con el grupo control (Sonnenschein *et al.*, 1991). Sin embargo, las perras de este estudio que estaban obesas un año antes del diagnóstico de tumor de mama o tenía una dieta con alto contenido en grasas no demostraron tener un mayor riesgo, para desarrollar tumores mamarios (Sonnenschein *et al.*, 1991). En un estudio posterior se encontró una asociación entre la dieta y el desarrollo de cáncer de mama: las perras alimentadas con una dieta rica en grasas y carnes rojas y aquellas que eran obesas al primer año de edad presentaban un mayor riesgo estadísticamente significativo, a desarrollar tumores mamarios y displasias (Pérez Alenza *et al.*, 1998). Estos dos estudios muestran como el efecto de la obesidad en el riesgo del tumor de mama es especialmente significativo en etapas tempranas de la vida de la perra. El incremento del peso corporal en momentos cercanos al diagnóstico de un tumor parece no tener significancia estadística en ambos estudios. Estos hallazgos concuerdan con aquellos que demuestran que el efecto sobre el riesgo mediado por la exposición a las hormonas ováricas es clave durante épocas tempranas de la vida de perra. Se piensa que la obesidad aumenta el riesgo de tumor de mama en mujeres postmenopáusicas, incrementando los niveles circulantes de estrógenos y la producción local de estrógenos por las enzimas aromatasas (Hankinson *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1999; Tymchuk *et al.*, 2001; Cleary *et al.*, 2009). Es posible que la obesidad incremente el riesgo de las perras a desarrollar tumores mamarios mediante los mismos mecanismos, por lo tanto, el efecto es mayor en los momentos tempranos de la vida cuando el efecto de las hormonas sobre el parénquima mamario es más dañino (Sorenmo *et al.*, 2011).

De igual manera, experimentos en roedores y estudios epidemiológicos en humanos han demostrado que una dieta alta en grasa y la obesidad incrementan el riesgo de desarrollar cáncer mamario (Hursting *et al.*, 2007; Nunez *et al.*, 2008; Khalid *et al.*, 2010).

2.2.1.7. Presentación clínica

Las perras con tumores mamarios normalmente presentan más de una lesión. Un reciente estudio prospectivo de tumores de mama caninos, basado en perras de vida doméstica, describió como cerca del 70% de las perras tenían más de un tumor (Sorenmo *et al.*, 2009). Otros muchos autores, incluyendo aquellos responsables de los trabajos observacionales realizados sobre grandes colonias de Beagles, han reportado lesiones neoplásicas mamarias múltiples (Moulton *et al.*, 1976; Bender *et al.*, 1984; Taylor *et al.*, 1986; Benjamin *et al.*, 1999). Las mamas inguinales suelen ser las más frecuentemente afectadas y las axilares no suelen verse afectadas en un primer lugar (Moulton *et al.*, 1976; Bender *et al.*, 1984; Benjamin *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 1986; Goldschmidt *et al.*, 2001).

Los tumores de mama son relativamente fáciles de detectar durante la realización de un examen clínico y típicamente aparecen como uno o más nódulos en las diferentes glándulas. Los signos clínicos específicos dependen del comportamiento biológico del tumor y en qué estadio de la enfermedad se encuentra cuando son inspeccionados por el veterinario. Los tumores pueden ser pequeños o grandes, estar fijados al tejido subcutáneo o presentar movilidad, ulcerados y ser únicos o múltiples. Los ganglios linfáticos pueden encontrarse clínicamente normales o aumentados de tamaño, pero los signos clínicos debidos a enfermedad metastásica son raros para aquellos pacientes que habitualmente acuden a revisiones veterinarias periódicas (Sorenmo *et al.*, 2011).

La excepción a esta presentación clínica la constituye el **carcinoma inflamatorio**, un tipo extremadamente agresivo y no muy común de tumor de mama. Histológicamente, se caracteriza por una invasión generalizada de vasos linfáticos dermales asociada a una severa reacción inflamatoria local, lo que, clínicamente, puede ser difícil de distinguir de una mastitis aguda severa

(Pérez Alenza *et al.*, 2001; Marconato *et al.*, 2009). Las perras con este tipo de presentación clínica tienen amplia afectación de las mamas, inflamación, edema y dolor y muestran además signos sistémicos de enfermedad como anorexia, pérdida de peso y debilidad. La mayoría de estos pacientes no son candidatos a cirugía debido al carácter infiltrativo de la neoplasia y a la alta incidencia de metástasis en el momento del diagnóstico. La supervivencia es pobre a pesar de realizar tratamiento (Pérez Alenza *et al.*, 2001; Marconato *et al.*, 2009).

Como ya se ha comentado anteriormente, la mayoría de las perras tienen más de un tumor cuando son examinadas por primera vez, pudiendo detectarse otras masas de menor tamaño cuando se realiza un examen minucioso durante esta primera consulta. Estas lesiones presentan frecuentemente diferentes tamaños y diferentes características histopatológicas. Los tumores de pequeño tamaño tienden a ser lesiones benignas, mientras que el riesgo de malignidad aumenta junto con el incremento del tamaño (Sorenmo *et al.*, 2009). Se ha descrito recientemente una progresión histológica hacia la malignidad asociada a un incremento de tamaño de la masa tumoral en perros que presentaron múltiples tumores (Sorenmo *et al.*, 2009). Estos hallazgos han reforzado la teoría de que los tumores de mama caninos sufren transformación desde estadios de benignidad hacia formas malignas, siendo el carcinoma la forma final de este proceso de transformación (Sorenmo *et al.*, 2010).

Otros investigadores han sugerido esta transformación e hipotetizado que debería de existir alguna relación entre tumores benignos y malignos de histología semejante. Así, Moulton *et al.* (1986) reportaron como perras con tumores malignos presentaban simultáneamente tumores benignos del mismo tipo histológico. Bender *et al.* (1984) describieron que aquellas perras con tumores de mama benignos tenía un mayor riesgo de desarrollar tumores malignos más tarde. Sorenmo *et al.* (2009) han reportado que perras con carcinoma *in situ* y tumores malignos estaban más predispuestas a desarrollar *de novo* carcinomas en otras glándulas mamarias que aquellas perras que presentaban tumores benignos. Por último, y en este mismo sentido, Gilbertson *et al.* (1983) encontraron que perras con tumores malignos presentaban mayor predisposición a desarrollar nuevos tumores malignos en

otras mamas, resaltando además que un gran número de carcinomas *in situ* aparecían adyacentes a carcinomas invasivos. Benjamin *et al.* (1999) reportaron una progresión histológica desde las formas menos agresivas de carcinoma hacia la forma de carcinoma anaplásico.

La asociación entre lesiones intraepiteliales sin atipia y carcinoma *in situ* y carcinomas invasivos ha sido descrita por Antuofermo *et al.* (2007) y, más recientemente, por Ferreira *et al.* (2010, 2011) y Mouser *et al.* (2010).

Todas estas investigaciones apoyan la teoría propuesta de que los tumores de mama caninos se desarrollan como estructuras histológicas dinámicas donde los tumores malignos se desarrollan desde tumores benignos (Sorenmo *et al.*, 2011). Clínicamente, pueden parecer entidades diferenciadas, ya que se presentan como lesiones separadas y de histologías dispares, pero etiológica y patogénicamente están relacionadas y asociadas (Sorenmo *et al.*, 2011).

2.2.1.8. Diagnóstico y estadiaje

Una completa historia y un examen clínico minucioso, junto a una cuidadosa palpación de cada glándula mamaria, deben de ser realizados en pacientes con tumores de mama. Estos perros suelen ser hembras de mediana-avanzada edad con otros problemas médicos concurrentes que requieren tratamiento. Sin embargo, en general, la mayoría de los perros con tumor de mama están sanos sistémicamente, excepto aquellos que se encuentran en estadios avanzados de la enfermedad o aquellos que presentan carcinoma inflamatorio. Estos últimos suelen presentar signos sistémicos de enfermedad, alteraciones en los valores hematológicos, así como coagulopatías, cambios consistentes con enfermedad sistémica y metastásica (Gilbertson *et al.*, 1983; Stockhaus *et al.*, 1999; Marconato *et al.*, 2009).

Aquellos pacientes que presenten múltiples lesiones mamarias deben de ser sometidos a cirugía, donde cada una de las masas sea eliminada, haciendo constar la localización de las mismas así como su tamaño. Dichas lesiones deben ser remitidas a un laboratorio de Anatomía Patológica para realizar el diagnóstico histopatológico de las mismas, análisis que continúa siendo la

“técnica de oro” para el diagnóstico y clasificación de los tumores de mama (Lana *et al.*, 2007; Sorenmo *et al.*, 2011).

No existe consenso sobre si la citología representa una buena técnica diagnóstica para esta patología. Normalmente, la citología por punción-aspiración con aguja fina de un tumor mamario canino no es útil para diferenciar si se trata de un tumor benigno o de un tumor maligno, de manera que no se debe practicar, con la única excepción del carcinoma inflamatorio, en el cual sí es útil para identificar las células neoplásicas que infiltran la piel (Allen *et al.*, 1986; Madewell y Theilen 1987; Hellmén y Lingren 1989a; Lana *et al.*, 2007). No obstante, recientemente se ha publicado un trabajo en el que la citología fue un método altamente sensible y específico para discernir entre tumores benignos y malignos y fue útil como factor pronóstico (Simon *et al.*, 2009).

Los tumores de mama se estadifican de acuerdo al sistema Tumor, Linfonodo, Metástasis (TNM). Por lo tanto, para estadificar a un paciente canino con tumor de mama se requiere información referente al tamaño de la lesión, la afectación ganglionar y la presencia o no de metástasis. El diámetro mayor del tumor se usa para clasificar la lesión respecto a este sistema. En el caso de que en un paciente concurren diferentes masas, se usará el diámetro mayor de la lesión de mayor tamaño (Sorenmo *et al.*, 2011).

Los ganglios linfáticos deben ser identificados y, en el caso de que sean palpables y/o clínicamente estén aumentados de tamaño, se debe realizar una punción-aspiración con aguja fina. El examen citológico de los ganglios linfáticos regionales ha demostrado ser un método altamente sensible para la detección de metástasis ganglionar en pacientes con tumores sólidos (Langenbach *et al.*, 2001). Si el estudio citológico es negativo para enfermedad metastásica, la toma de biopsia ganglionar no sería necesaria a no ser que el ganglio linfático se encuentre incluido en la pieza de resección quirúrgica. Esto último suele ocurrir en los casos que el tumor se desarrolla en las mamas 4ª y 5ª (Sorenmo *et al.*, 2011).

Por otra parte, aquellos pacientes diagnosticados con un tumor maligno deberían de ser evaluados en búsqueda de una posible enfermedad metastásica. La realización de radiografías en tres proyecciones continúa siendo la técnica de diagnóstico principal para la evaluación de metástasis en la cavidad torácica-parénquima pulmonar en Medicina Veterinaria. Los pulmones son los órganos más frecuentemente afectados por la enfermedad metastásica en los tumores de mama caninos (Fidler y Brodey, 1967a; 1967b), pero otras pruebas diagnósticas, tales como ecografía abdominal, radiografía del esqueleto apendicular u otras modalidades de diagnóstico por imagen, como tomografía computerizada o resonancia magnética, pueden estar indicadas si existe sospecha clínica de metástasis en otras localizaciones (Negrin *et al.*, 2009).

En función de los datos descritos anteriormente, el paciente canino debe de ser estadificado clínicamente. Hasta la fecha se han propuesto y publicado dos sistemas de estadificación. El primero elaborado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Owens, 1980) y el segundo, más reciente, resulta una modificación del primero (Rutteman *et al.*, 2001). La Tabla 2 es una comparación de estos dos sistemas. En dicha tabla puede observarse que existen importantes diferencias entre estos dos sistemas. De acuerdo con la clasificación modificada (Rutteman *et al.*, 2001), los estadios I a III clasifican a los pacientes de acuerdo con el tamaño tumoral, el estadio IV representa pacientes caninos con metástasis ganglionar y el estadio V representa a pacientes con metástasis a distancia.

En contraposición, el sistema de estadificación original (Owens, 1980) asignó el mismo estadio de enfermedad, específicamente el estadio II, a un perro con un tumor de pequeño y afectación del linfonodo regional (N1+), así como designa a un perro con un tumor de mayor tamaño (T2, 3-5 cm) sin tener en cuenta el estatus del linfonodo (N0 o N1), sugiriendo que el tamaño tumoral tenía la misma significación pronóstica que la positividad de afección ganglionar. Además, de acuerdo con el sistema de estadiaje original de la OMS un perro con un tumor mayor (T3) podría ser designado como Estadio III sin tener en cuenta el estatus de los linfonodos (cualquier N) sugiriendo nuevamente que el tamaño del tumor es más importante que la afectación del linfonodo regional (Tabla 2) (Sorenmo *et al.*, 2011).

Tabla 2. Sistema de estadiaje para los tumores de mama caninos.

SISTEMA OMS ORIGINAL (Owens, 1980)				SISTEMA OMS MODIFICADO (Rutteman <i>et al.</i> , 2001)			
Estadio I	T _{1a,b,c}	N ₀	M ₀	Estadio I	T ₁	N ₀	M ₀
Estadio II	T ₀	N ₁	M ₀	Estadio II	T ₂	N ₀	M ₀
	T _{1 a,b,c} T _{2 a,b,c}	N ₁ N ₀ ó N _{1a}	M ₀ M ₀				
Estadio III	T _{3 a,b,c} Cualquier T	N Cualquier N _b	M M ₀	Estadio III	T ₃	N ₀	M ₀
Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M ₁	Estadio IV	Cualquier T	N ₁	M ₀
No existe Estadio V				Estadio V	Cualquier T	Cualquier N	M ₁
T: Tumor primario (a, no fijado; b, fijado a la piel; c, fijado a músculo) T ₀ : no evidencia de tumor T ₁ : < 3 cm (a,b,c) T ₂ : 3-5 cm (a,b,c) T ₃ : > 5 cm (a,b,c) T ₄ : cualquier T, carcinoma inflamatorio N: Estado del linfonodo regional N ₀ : No metástasis N ₁ : Metástasis ipsilateral (a,b) N ₂ : Metástasis bilateral (a,b) M: Metástasis a distancia M ₀ : No metástasis a distancia M ₁ : Metástasis a distancia				T: Tumor primario T ₁ : < 3 cm T ₂ : 3-5 cm T ₃ : >5 cm N: Estado del linfonodo regional N ₀ : No metástasis N ₁ : Metástasis M: Metástasis a distancia M ₀ : No metástasis a distancia M ₁ : Metástasis a distancia			

Los sistemas de estadiaje facilitan la estandarización de los datos de un paciente de manera que los clínicos pueden comunicarse datos de una manera concisa y consistente. Estos sistemas permiten la comparación de pacientes con similares características tumorales, lo que es importante en la evaluación de nuevos tratamientos. Es más, el estadiaje puede tener significancia pronóstica (Lana *et al.*, 2007). En los sistemas de estadiaje más útiles clínicamente, el estadio se relaciona directamente con la progresión de la enfermedad y, por lo tanto, está implicado en el tratamiento: un estadio avanzado confiere un peor pronóstico y un pronóstico pobre típicamente requiere una terapia escalonada. De cualquier manera ninguno de los sistemas de estadiaje mencionados, ha sido validado por su significancia pronóstica en estudios controlados (Sorenmo *et al.*, 2011). Aunque la mayoría de los estudios sobre factores pronósticos en los tumores de mama caninos no se ajustan a los estándares, recientemente publicados por el Subcomité Oncológico del Colegio Americano de Patólogos Veterinarios (Webster *et al.*,

2011), los resultados de muchos de los mayores estudios retrospectivos que identifican el tamaño del tumor, el estatus ganglionar y el estadio según la OMS como factores pronóstico son relativamente consistentes y biológicamente plausibles: los tumores más agresivos crecen más rápido y, por lo tanto, serán de mayor tamaño y tendrán más predisposición a desarrollar subclones con poder metastásico y aquellos tumores que han metastatizado a linfonodo regional han probado de esa manera su poder de metástasis (Sorenmo *et al.*, 2009). Así, los sistemas de estadiaje basados en el tamaño tumoral y el estatus ganglionar confieren relativa significancia pronóstica y proveen a los cirujanos y oncólogos veterinarios datos para tomar decisiones en cuanto al tratamiento se refiere (Lana *et al.*, 2007; Sorenmo *et al.*, 2011).

2.2.1.9. Factores pronósticos clínicos

Se han publicado numerosos estudios retrospectivos sobre factores pronósticos en los tumores de mama caninos. Los factores que se han encontrado estar más consistentemente asociados con el pronóstico, de acuerdo con los estudios mejor controlados y con mayor número de animales, incluyen el tamaño tumoral, el estatus del linfonodo y el estadio clínico (Lana *et al.*, 2007; Sorenmo *et al.*, 2011).

Tamaño tumoral

Se describen tres diferentes categorías en referencia al tamaño: T1: <3 cm, T2: 3-5 cm y T3: > 5 cm (Owens, 1980; Rutteman *et al.*, 2001). La mayoría de los trabajos más recientes utilizan esta categoría de tamaños cuando se evalúa el valor pronóstico del mismo. Incluso cuando parece existir un acuerdo general en cuanto a que el tamaño tumoral confiere una significancia pronóstica, existen contradicciones a cerca de en qué categoría cambia el pronóstico de una manera significativa hacia uno más grave. Kurzman y Gilbertson (1986) encontraron un cambio significativo en el riesgo de recurrencia en aquellas perras con tumores de mama mayores de 3 cm. De acuerdo con su estudio, los pacientes con tumores T1 tuvieron mejor pronóstico que los T2 y T3, no existiendo diferencias significativas entre estos últimos. Philibert *et al.* (2003) también encontraron diferencias significativas en la supervivencia de perras con tumores menores de 3 cm (T1) y mayores de

3 cm (T2 y T3). Yamagami *et al.* (1996b), sin embargo, reportaron un pronóstico similar para los T1 y T2 siendo significativamente peor para los T3. Chang *et al.* (2005) describieron que aquellos pacientes con tumores mayores de 5 cm tuvieron una supervivencia significativamente más corta que aquellos con tumores menores de 5 cm.

Algunos de los estudios, con mayores tamaños muestrales, sobre factores pronósticos en tumores de mama caninos no clasificaron las lesiones según las categorías de tamaño mencionadas. A pesar de unas categorías de tamaño muy diferentes (<5, 5-10, 11-15, >15), Misdorp y Hart (1976) documentaron que el tamaño sólo resultó un factor pronóstico en aquellos casos de carcinomas complejos cuando se corrigieron los datos para otras variables. Shofer *et al.* (1989) y Hellmén *et al.* (1993) no confirmaron que el tamaño tumoral fuera un valor pronóstico aunque su clasificación no se basó en aquellas (I-III) de la OMS. Incluso, aunque existen discrepancias de acuerdo a la importancia del tamaño como un factor pronóstico y a qué estadio-T se produce un cambio de pronóstico, la mayoría de los estudios apoyan el uso de un sistema de clasificación en el que el estadio del tumor debe de clasificarse de acuerdo al tamaño tumoral, dado que el tamaño tumoral aparenta tener una significancia pronóstica (Sorenmo, 2003; Sorenmo *et al.*, 2011).

Según lo anterior, parece que el pronóstico cambia gradualmente en función del incremento del tamaño tumoral, pero el sistema modificado parece capturar cambios cruciales en el pronóstico basado únicamente en el tamaño tumoral. Muchos de los estudios citados anteriormente, sin embargo, son estudios de análisis univariante y no tuvieron en cuenta posibles asociaciones entre el tamaño tumoral y el estatus del linfonodo (Sorenmo *et al.*, 2011).

Estatus ganglionar

De acuerdo con el sistema de estadiaje modificado, el estatus ganglionar se clasifica en N0 (no metástasis) o N1 (metástasis) basado en el estudio mediante citología o histopatología (Rutteman *et al.*, 2001). Un ganglio positivo (N1) concuerda con un estadio IV de la enfermedad en el sistema de estadiaje modificado. En el sistema original de la OMS, el estatus ganglionar está

determinado por el examen clínico o histopatológico y además especifica si el linfonodo metastásico es ipsilateral/bilateral y si se encuentra fijado o no a tejidos subyacentes. Esta información adicional influye en si el paciente es clasificado en un estadio II o III de la enfermedad (Owens, 1980). Se ha demostrado que el estatus ganglionar es un factor pronóstico en los tumores de mama caninos (Misdorp *et al.*, 1999). Sin embargo, estos mismos autores, en estudios previos, habían indicado que dicho estatus no tenía valor pronóstico (Misdorp *et al.*, 1976). Esto puede ser atribuido, en parte, al hecho de que estos estudios eran de naturaleza retrospectiva: el estadiaje y los procedimientos quirúrgicos no estaban estandarizados y podrían haber sido incompletos en términos de la evaluación patológica del linfonodo regional, provocando un fallo en la detección de la metástasis y, por lo tanto, subestimando el estadiaje. Adicionalmente, la mayoría de estos estudios no estaban jerarquizados en función del tipo tumoral; los sarcomas primarios de glándula mamaria son tumores de alto grado de malignidad generalmente asociados con peor pronóstico, pero como sarcomas, metastatizan típicamente por vía hematogena y no afectan al ganglio linfático. Estos casos tienen un pronóstico pobre a pesar de tener un estatus ganglionar negativo (N₀) (Hellmén *et al.*, 1993).

La elección de los puntos de evaluación también es variable. Idealmente, los puntos de evaluación que se usan para determinar la importancia de un valor pronóstico variable deberían de ser tumor-específico, así como los valores de remisión, tiempo de progresión o la supervivencia tumor-específica (Webster *et al.*, 2011).

Muchas perras con tumores de mama son viejas y mueren por otros motivos; el hecho de no eliminar estos casos puede provocar un error en la identificación de factores de pronóstico verdaderos, lo que sería, factores asociados a un comportamiento biológico agresivo (Lana *et al.*, 2007).

La metástasis ganglionar demostró ser un factor pronóstico significativo en un amplio estudio retrospectivo que usó como valor de evaluación la recurrencia del tumor y que incluía sólo perras con carcinomas en cuya cirugía de mastectomía se había incluido el ganglio linfático regional (Kurzman y Gilbertson, 1986). El estatus ganglionar también ha sido asociado con el

pronóstico en otros muchos estudios que han usado análisis multivariante (Hellmén *et al.*, 1993; Yamagami *et al.*, 1996b; Nieto *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2005).

Por otra parte, en Patología Humana es una práctica común la realización de análisis inmunohistoquímico usando anticuerpos anti-CKs para detectar micrometástasis ocultas en linfonodos regionales negativos o dudosos en el examen histológico rutinario. Mediante el empleo de estos análisis, diversos investigadores han sido capaces de identificar pacientes con un menor intervalo libre de enfermedad y un menor periodo de supervivencia total. Esto último es especialmente importante en casos de carcinomas de mama lobulares caracterizados por la proliferación neoplásica de células epiteliales no cohesivas y de morfología similar a la de los linfocitos (Cserni *et al.*, 2006; de Boer *et al.*, 2010). En Medicina Veterinaria sólo existe una referencia en la que se utiliza un anticuerpo frente a diferentes isotipos de CKs en linfonodos regionales en casos de tumor de mama. En este trabajo, se analizaron 119 ganglios linfáticos y se identificaron micrometástasis ocultas en un 9,2% de los casos, no obstante la relevancia clínica de estos resultados requiere mayor discusión (Matos *et al.*, 2006).

Estadio tumoral

La información recogida acerca del tamaño tumoral y el estatus ganglionar se incluyen en ambos sistemas de estadiaje y proporcionan la información necesaria para designar en qué estadio se encuentra el tumor. Diversos estudios han valorado la significancia pronóstica del estadio tumoral de acuerdo con ambas clasificaciones de la OMS. Yamagami *et al.* (1996b) usaron el sistema de estadiaje original y encontraron diferencias significativas entre los estadios I, III y IV, no pudiendo ser analizadas las diferencias respecto al estadio II debido a una baja n en este grupo.

El sistema de estadiaje modificado ha sido usado en dos estudios más recientes; Chang *et al.* (2005) encontraron diferencias significativas entre perras con estadios I, II o III y aquellas en estadio IV o V, sin embargo no se realizaron comparaciones detalladas entre cada uno de los estadios. Philibert *et al.* (2003) también describieron que el estadio tumoral tenía valor pronóstico

teniendo los pacientes en estadio I una vida significativamente mayor que aquellos en estadio más avanzado. Los estudios sobre estadiaje y pronóstico adolecen normalmente de las mismas limitaciones, como son la falta de estandarización de los métodos de estadiaje, de los procedimientos quirúrgicos y de los estudios de seguimiento. Estas limitaciones referidas a la recolección de datos y las variaciones en el tratamiento de los pacientes pueden resultar en una sobre-estimación o sub-estimación del estadiaje y, por tanto, provocar análisis sesgados (Webster *et al.*, 2011).

2.2.2. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS

Los tumores mamarios caninos se caracterizan por su complejidad estructural, variabilidad histomorfológica y por las diferentes orígenes supuestos para diferentes tipos tumorales.

2.2.2.1. Clasificación

Los criterios que se utilizan para clasificar las neoplasias de la mama canina son similares a los utilizados en todos los tipos de neoplasias: comportamiento biológico y morfología, pudiendo ser esta última descriptiva o histogenética, y la clasificación ideal es aquella que aúna ambos criterios. Desde hace algo más de 10 años se utilizan para la mayoría de los estudios las clasificaciones de Misdorp que han demostrado poseer cierto valor pronóstico. (Misdorp *et al.*, 1999; Misdorp, 2002).

Las clasificaciones histológicas más recientes de las neoplasias de la glándula mamaria de la perra son: la nueva clasificación de los "Tumores de la Glándula Mamaria en el Perro y el Gato" de la OMS (Misdorp *et al.*, 1999), que se basa en criterios de valor pronóstico más que en criterios morfológicos; la clasificación de Benjamin *et al.* (1999), de tipo morfológico-histogenético, y la clasificación de la última edición del libro de D.J. Meuten "Tumors in Domestic Animals", que ha sido elaborada por el mismo autor que la clasificación de la OMS (Misdorp, 2002) y que es idéntica, salvo una excepción aislada, a la clasificación de la OMS (Misdorp *et al.*, 1999). Estas clasificaciones habrán de demostrar en el futuro su utilidad, ya que el

verdadero valor de una clasificación de cualquier tipo de neoplasia debe juzgarse por su capacidad para predecir el comportamiento biológico post-quirúrgico de la enfermedad.

La clasificación más frecuentemente usada por los patólogos veterinarios para clasificar histológicamente los tumores de mama caninos es la de Misdorp *et al.* (1999).

Recientemente, Goldschmidt *et al.* (2011) han publicado una nueva clasificación histológica para los tumores de mama que difiere sustancialmente de la de 1999. En esta nueva propuesta de clasificación se han añadido nuevos tipos histológicos no descritos previamente, se han simplificado/eliminado algunos tipos histológicos y se han reagrupado otros. Sin embargo, esta nueva propuesta de clasificación no ha sido utilizada aún en ningún estudio.

2.2.2.2. Factores pronósticos histológicos

Según Lana *et al.*, en la última edición del libro "Small Animal Clinical Oncology" de Stephen J. Withrow y E. Gregory MacEwen (2007), las características histológicas de los carcinomas de mama caninos que tienen valor pronóstico probado son ocho: 1) el grado histológico de malignidad; 2) el grado de diferenciación nuclear; 3) el tipo histológico de tumor; 4) la presencia de un infiltrado linfocitario en la vecindad del tumor; 5) el crecimiento infiltrante en los tejidos vecinos; 6) la presencia de émbolos de células neoplásicas; 7) la tasa de proliferación de la neoplasia; y 8) el contenido en receptores de hormonas esteroideas. Para Misdorp (2002), en la última edición del libro "Tumors in Domestic Animals" de D.J. Meuten, sin embargo, el grado de diferenciación nuclear y el infiltrado linfocitario no son factores pronósticos claros.

1. Grado histológico de malignidad

El grado histológico de malignidad evalúa, básicamente, el grado de diferenciación de la neoplasia, y en la perra se analiza mediante sistemas de gradación histológica y nuclear que son modificaciones del sistema propuesto

por Bloom y Richardson, en 1957, para evaluar el grado de malignidad en el carcinoma de mama humano. Los sistemas de gradación clásicos son el de Gilbertson *et al.* (1983) y el de Lagadic y Estrada (1990), y los propuestos más recientemente se basan en los mismos criterios (Misdorp, 2002).

Gilbertson *et al.* (1983) desarrollaron un sistema de gradación histológica para carcinomas de mama de perra y observaron que los carcinomas que tenían un grado histológico 0 (carcinoma in situ o no infiltrante) tenían una probabilidad de recidivar o metastatizar en los 2 años siguientes a la extirpación quirúrgica del 19%; los de grado I (invasión estromal) de un 60% y los de grado III (con invasión de vasos linfáticos y sanguíneos) de un 97%. Lagadic y Estrada (1990) elaboraron un sistema de gradación basado en el de Bloom y Richardson (1957) con el que evaluaron los tumores malignos de más de 9000 perras. Al realizar un estudio de correlación entre el grado histológico de malignidad y el tiempo de supervivencia después de la cirugía (el periodo de seguimiento fue de 2 años), observaron que las tasas de supervivencia fueron del 86% en las perras con tumores de grado I, del 43% en las perras con tumores de grado II y del 17% en las perras con tumores de grado III. Otros autores han utilizado combinaciones de distintos sistemas de gradación histológica, tanto humanos como caninos, como Peña *et al.* (1998), que llegaron a la conclusión de que la combinación de los sistemas de gradación humanos de Scarff y Torloni (1968) y Bloom y Richardson (1957), junto con el criterio de invasión vascular de Gilbertson *et al.* (1983), podían ser de valor pronóstico en el perro porque el grado histológico de malignidad y el grado de pleomorfismo nuclear se relacionaban con un menor tiempo de supervivencia total. Todos los sistemas de gradación histológica consisten, básicamente, en valorar tres criterios: 1) el grado de diferenciación histológica (formación de túbulos); 2) el grado de anaplasia (anisocariosis) y 3) el número de mitosis (número de mitosis en 10 campos de 400 aumentos). A cada criterio se le asigna una puntuación que varía con los sistemas propuestos.

2. Grado de diferenciación nuclear

El grado de diferenciación nuclear evalúa, básicamente, el grado de pleomorfismo nuclear o de anisocariosis. Aunque este criterio está incluido en

la evaluación del grado histológico de malignidad, algunos autores han realizado estudios de valor pronóstico basados en este único criterio. Gilbertson *et al.* (1983) establecieron tres grados de diferenciación nuclear: Grado nuclear 1 o grado más pobre de diferenciación (pleomorfismo alto, cromatina densa, nucléolos grandes y múltiples, numerosas figuras de mitosis, anaplasia); Grado nuclear 2 o grado de diferenciación moderada (pleomorfismo medio, cromatina irregular, nucléolos prominentes) y Grado nuclear 3 o grado de diferenciación alta (pleomorfismo bajo, cromatina fina y nucléolo poco evidente). Estos autores comprobaron que el grado de diferenciación nuclear guardaba relación con el periodo libre de enfermedad. En un primer estudio encontraron que había diferencias entre los tumores de grado nuclear 1 y los de grados nucleares 2 y 3 en cuanto a la tasa de recidivas en los 24 meses siguientes a la cirugía, que fueron del 98% y del 55%, respectivamente (Gilbertson *et al.*, 1983). Posteriormente comprobaron esta misma relación en los tres grupos de animales, siendo las tasas de recidiva o metástasis de los tumores de grados nucleares 1, 2 y 3 del 90%, 68% y 24%, respectivamente (Kurzman y Gilbertson, 1986). Sin embargo, Misdorp (2002) considera que la determinación independiente del grado de anaplasia, de la actividad mitótica y del pleomorfismo nuclear no son factores pronósticos en el carcinoma de mama de perra. Así, algunos autores no han encontrado relación entre la supervivencia y el grado nuclear (Benazzi *et al.*, 1995).

3. Tipo histológico: Clasificación histológica de los tumores mamarios caninos

El tipo histológico de carcinoma de mama tiene valor pronóstico en la perra, al igual que sucede en la mujer (Rosai, 1996; Robbins *et al.*, 1999; Ellis *et al.*, 2007). Según la última clasificación de las neoplasias de la glándula mamaria de la perra propuesta por la Organización Mundial de la Salud (Misdorp *et al.*, 1999), los carcinomas de mama caninos se clasifican en siete grandes grupos: 1) carcinoma no infiltrante o "in situ" (una neoplasia epitelial con características histológicas de malignidad que no ha invadido la membrana basal); 2) carcinoma complejo (un carcinoma constituido por células similares a células epiteliales luminales y a células mioepiteliales); 3) carcinoma simple (un carcinoma constituido por un solo tipo celular que es similar o bien a las células epiteliales luminales o bien a las células

mioepiteliales); 4) tipos especiales de carcinoma (de células fusiformes, de células escamosas, mucinoso y rico en lípidos); 5) sarcomas (fibrosarcoma, osteosarcoma, otros sarcomas); 6) carcinosarcoma (un tumor constituido por células que morfológicamente se parecen a componentes epiteliales malignos, luminales y/o mioepiteliales, y por células que, morfológicamente, se parecen a elementos malignos del tejido conjuntivo); y 7) carcinoma o sarcoma en tumor benigno (tumores benignos, bien sea adenomas complejos o bien tumores mixtos benignos, que presentan focos de células de apariencia histológica maligna o nódulos independientes constituidos por dichas células).

Según esta clasificación, los datos de estudios previos indican que la relación entre el tipo histológico y la agresividad biológica de la neoplasia aumenta de acuerdo con el siguiente esquema: Carcinoma complejo < (menos agresivo que) Carcinoma simple túbulo-papilar < Carcinoma simple sólido < Carcinoma anaplásico (Else y Hannant, 1979; Misdorp y Hart, 1976; Parodi *et al.*, 1983; Misdorp *et al.*, 1999). Dentro de los tumores de tipo histológico especial, los de peor pronóstico son los carcinomas de células escamosas, seguidos de los sarcomas (fibrosarcoma, osteosarcoma) y del carcinosarcoma. Los carcinomas de células fusiformes, los carcinomas mucinosos y el carcinoma rico en lípidos (Espinosa de los Monteros *et al.*, 2003; Pérez-Martínez *et al.*, 2005) son poco frecuentes y el Carcinoma o Sarcoma en tumor benigno se da con mayor frecuencia pero hay poca información sobre su pronóstico.

El valor pronóstico del tipo histológico de carcinoma de mama en la perra había sido analizado previamente en numerosos estudios con resultados similares a los expuestos en la nueva clasificación de la OMS (Bostock 1975; Misdorp y Hart 1976; Monlux *et al.*, 1977; Misdorp y Hart 1979a; Brodey *et al.*, 1983; Gilbertson *et al.*, 1983; Bostock, 1986; Kurzman y Gilbertson, 1986; Hellmen *et al.*, 1993; Misdorp *et al.*, 1999). En algunos estudios se comprobó, además, que el tipo histológico era un factor pronóstico independiente (Misdorp y Hart 1976; Shofer *et al.*, 1989; Hellmén *et al.*, 1993; Yamagami *et al.*, 1996b; Pérez Alenza *et al.*, 2000; Philibert *et al.*, 2003). Sin embargo, las clasificaciones utilizadas por los distintos autores no han sido siempre estrictamente comparables, lo que condiciona que la evaluación de los

resultados obtenidos haya de realizarse siempre teniendo en cuenta la clasificación que se ha utilizado (Ordás, 2009).

La considerable variación morfológica y la complejidad de los tumores de mama de la perra son las causas fundamentales de la existencia de numerosas clasificaciones. Sirva como ejemplo la simultánea aparición de otra clasificación (Benjamín *et al.*, 1999) que no coincidía plenamente con la de la OMS (Misdorp *et al.*, 1999) y que también contenía información pronóstica. Esta clasificación incluía conceptos de las dos clasificaciones más utilizadas hasta el momento de su publicación, la primera clasificación de los tumores de la glándula mamaria de los animales domésticos publicada por la OMS (Hampe y Misdorp, 1974) y la de Moulton de 1990, y aunque contienen elementos comunes con la nueva de la OMS (Misdorp *et al.*, 1999) como, por ejemplo, el "Carcinoma o Sarcoma en tumor benigno", tenía también algunas diferencias. Así, se introdujo el concepto y el término de "carcinoma ductal" para referirse a las neoplasias que se originan en los conductos intralobulillares o interlobulillares y que, según ellos, tenía una tasa de metástasis mayor que el otro tipo de carcinomas que distinguen, el "adenocarcinoma". El "carcinoma ductal" correspondería al "carcinoma sólido" de la primera clasificación de la OMS (Hampe y Misdorp, 1974) y al "carcinoma lobulillar" en la clasificación de Moulton (1990), mientras que el "adenocarcinoma" correspondería al "adenocarcinoma tubular, papilar y papilar quístico" (Hampe y Misdorp, 1974) y al "adenocarcinoma lobulillar y papilar" de Moulton (1990).

4. *Infiltrado inflamatorio linfocitario*

La presencia de un infiltrado de linfocitos en la vecindad de un tumor puede indicar la existencia de una respuesta inmune frente al tumor y se ha observado que guarda relación con el periodo libre de enfermedad tras la cirugía (Gilbertson *et al.*, 1983). Así, las perras con carcinomas sin infiltrado linfocitario tenían un mayor riesgo de desarrollar recidivas en los dos años siguientes a la cirugía del tumor primario en comparación con los animales cuyos tumores sí presentaban el infiltrado. Por otro lado, estos mismos autores observaron que los carcinomas de grado histológico de malignidad I con reacción linfocitaria tenían una probabilidad de recidivar en los dos años

siguientes a la cirugía del 45%, frente al 83 % de las perras con tumores del mismo grado histológico pero sin reacción inflamatoria. Sin embargo, este factor no es unánimemente aceptado como pronóstico por todos los autores (Misdorp, 2002).

En contraposición a los datos anteriores, recientemente, Kim *et al.* (2010) han demostrado el predominio de linfocitos T en los infiltrados linfocitarios asociados a tumores de mama, siendo mayor la población de células T que infiltran los tumores metastásicos que los no metastásicos. En el mismo estudio también se asoció la expresión de las interleuquinas IL-1, IL-6 y del TNF- α a características histológicas de malignidad. Estrela-Lima *et al.*, también en 2010, han reportado similares resultados asociando la expresión de linfocitos T-CD4 y T-CD8 a fenómenos de metástasis y menor tiempo de supervivencia total.

5. El crecimiento infiltrante en los tejidos vecinos (*Invasión estromal*)

El carcinoma de mama canino con crecimiento infiltrante en los tejidos adyacentes tiene peor pronóstico que el carcinoma de mama canino con crecimiento expansivo. El valor pronóstico de esta característica histológica del carcinoma de mama canino se ha comprobado tanto en estudios de correlación con el tiempo de supervivencia como con el periodo libre de enfermedad (Bostock, 1986; Madewell y Theilen, 1987; Hellmén *et al.*, 1993; Lana *et al.*, 2007). En general, la tasa de mortalidad en los dos años siguientes a la cirugía entre las perras con carcinoma de mama infiltrante es del 80% mientras que la de las perras con carcinoma de mama no infiltrante es del 40% (Misdorp y Hart, 1979a; Bostock, 1986; Yamagami *et al.*, 1996b). En los estudios que utilizan como variable de referencia el tiempo libre de enfermedad se ha observado una relación similar. Bostock (1975) encontró que el 65% de las perras con carcinoma infiltrante presentaron recidivas después de la extirpación quirúrgica completa (comprobado histológicamente) del tumor. Gilbertson *et al.* (1983) encontraron una correlación directa entre la extensión de la enfermedad maligna en el momento de la cirugía y el riesgo de desarrollar tumores secundarios o recidivas del carcinoma invasor. Así, el 72 % de los tumores que invadían estructuras adyacentes, sin invasión de los

vasos linfáticos o sanguíneos, recidivaban o desarrollaban tumores *de novo* en menos de 2 años.

Por otra parte, los resultados de un reciente estudio han puesto de manifiesto, mediante el análisis de expresión de la calponina, que al menos un tercio de los tumores de mama diagnosticados como carcinomas infiltrativos de grado I presentaban una barrera de células mioepiteliales/membrana basal completa y, por lo tanto, satisfaciendo los criterios de un mejor pronóstico (Sanchez-Céspedes *et al.*, 2011).

6. La presencia de émbolos de células neoplásicas (*Invasión vascular*)

La presencia de émbolos de células neoplásicas, observados en el examen histopatológico del tumor primario, es un factor pronóstico controvertido. Para algunos autores, influye de manera desfavorable en el pronóstico del carcinoma de mama canino (Misdorp, 2002; Lana *et al.*, 2007), porque este hecho se ha comprobado tanto en estudios de correlación con el tiempo de supervivencia (Parodi *et al.*, 1983; Estrada *et al.*, 1984; Yamagami *et al.*, 1996b), como con el periodo libre de enfermedad (Gilbertson *et al.*, 1983; Kurzman y Gilbertson, 1986; Lagadic y Estrada, 1990). Sin embargo, Misdorp y Hart (1976) y Hellmén *et al.* (1993) no encontraron relación entre la presencia de invasión vascular y el tiempo de supervivencia.

7. La tasa de proliferación de la neoplasia

El valor pronóstico de la tasa de proliferación del carcinoma de mama canino ha sido analizado por distintos métodos, como la citometría de flujo para determinar la fracción de células que se encuentran en la fase S del ciclo celular y el contenido en ADN (Scanziani *et al.*, 1991; Hellmén *et al.*, 1993; 1995; Pérez Alenza *et al.*, 1995; 2000), las técnicas inmunohistoquímicas para evaluar la presencia de antígenos que se expresan durante el ciclo celular, como el Ki67 y el PCNA (Löhr *et al.*, 1997; Peña *et al.*, 1998; Queiroga *et al.*, 2001) y la técnica del AgNOR para determinar el número de regiones organizadoras del nucléolo (Bostock *et al.*, 1992; Destexhe *et al.*, 1995; Löhr *et al.*, 1997). En general, estos métodos han aportado datos indicativos de valor pronóstico desfavorable, analizado en tiempo de supervivencia, para los

niveles altos de proliferación. Además, se ha reportado una correlación inversa entre el aumento de expresión de los marcadores de proliferación celular (Ki67 y el PCNA) y los receptores de estrógenos (Kumaraguruparan *et al.*, 2006; Morris *et al.*, 2009) y la continuidad de la barrera de células mioepiteliales (Sanchez-Céspedes *et al.*, 2011).

8. Receptores hormonales

En la mujer, la presencia de receptores de estrógenos y/o de progesterona es uno de los factores pronósticos absolutos del carcinoma de mama (Rosai, 1996). Los carcinomas de mama hormono-dependientes tienen mejor pronóstico que los que no lo son. Así, el periodo libre de enfermedad y el tiempo de supervivencia post-quirúrgicos son mayores (Mauriac *et al.*, 1989; Rosai, 1996; Allred *et al.*, 1998; Masood, 2005; Knoop *et al.*, 2007). Además, las pacientes con carcinoma de mama hormono-dependiente (que tiene receptores hormonales) responden a manipulaciones endocrinas postquirúrgicas de manera favorable, es decir, que el tratamiento endocrino adyuvante a la cirugía se asocia a mayor supervivencia global y mejor calidad de vida que las no tratadas. El 70%, aproximadamente, se beneficiarán clínicamente del tratamiento endocrino adyuvante a la cirugía (Mauriac *et al.*, 1989; Rosai, 1996; Allred *et al.*, 1998; Masood, 2005; Knoop *et al.*, 2007).

En la perra se conocen menos datos que en la mujer sobre este tema pero sí se ha comprobado, primero, que algunos carcinomas de mama tienen receptores hormonales (MacEwen *et al.*, 1982; Elling, 1983; Martín *et al.*, 1984; Parodi *et al.*, 1984; Rutteman *et al.*, 1988b; Donnay *et al.*, 1989; Rutteman, 1990; Sartin *et al.*, 1992; Donnay *et al.*, 1993), y segundo, que la presencia de receptores hormonales se asocia a una mejor evolución clínica, es decir, que es un factor pronóstico favorable en el carcinoma de mama canino (Mialot *et al.*, 1982b; Parodi *et al.*, 1984; Martín *et al.*, 1984; Donnay *et al.*, 1989; Rutteman, 1990; Sartin *et al.*, 1992). Ahora bien, todos estos trabajos citados se llevaron a cabo utilizando métodos bioquímicos de detección de los receptores hormonales. Los métodos inmunohistoquímicos se empezaron a emplear hace casi dos décadas (Manzel *et al.*, 1995; Geraldés *et al.*, 2000; Nieto *et al.*, 2000; Martín de las Mulas *et al.*, 2005) y, sin embargo, son escasas las referencias en las que se ha analizado el valor pronóstico de la

presencia de receptores de estrógenos (Nieto *et al.*, 2000) y estrógenos y progesterona (Martín de las Mulas *et al.*, 2005; Millanta *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2009) en el carcinoma de mama canino, con resultados comparables a los obtenidos en estudios previos de las especies humana y canina. Otros estudios también señalan que la pérdida de expresión de receptores hormonales se asocia a factores clinicopatológicos desfavorables (Kumaraguruparan *et al.*, 2006; Morris *et al.*, 2009).

9. Factores pronósticos auxiliares

Aún teniendo en cuenta los criterios anteriores, es complicado determinar el curso de la enfermedad incluso en pacientes sin evidencia de metástasis en ganglios axilares. En la especie humana, el tumor recidivará en aproximadamente el 30% de las mujeres sin metástasis en linfonodo, y algunos autores han propuesto que todas las pacientes, incluso aquellas que no tienen metástasis en linfonodo, reciban terapia adyuvante sistémica. Sin embargo, ya que esta terapia no está desprovista de riesgos (Kinne *et al.*, 1981), se ha convertido en un objetivo importante en la investigación del cáncer de mama la identificación de biomarcadores que puedan separar a las pacientes con buen pronóstico de aquellas que necesiten terapia adicional, ya que lo más probable es que desarrollen recidivas y metástasis y, por tanto, sean quienes más probablemente se beneficien de la terapia adyuvante.

Existe la esperanza de que diferentes marcadores celulares analizados inmunohistoquímicamente y usados como marcadores pronóstico puedan ser empleados rutinariamente en el estudio de los tumores de mama caninos y, así, dar una mayor y más detallada información diagnóstica al clínico que le ayude en la elección del tratamiento. Sin embargo, a pesar de la amplia cantidad de estudios inmunohistoquímicos existentes en la literatura, no se han adoptado para su uso rutinario tales marcadores para la Medicina Veterinaria (Morris, 2010).

Este hecho no es sorprendente, cuando se hace una comparación con Medicina Humana, donde sólo tres marcadores se usan de manera rutinaria para el análisis de los tumores de mama, como son los receptores de estrógeno

y progesterona y la proteína HER-2, a pesar de la gran cantidad de estudios inmunohistoquímicos que existen en medicina humana (Geyer *et al.*, 2009).

En la actualidad, no hay ningún biomarcador que sea único para el carcinoma de mama canino. Sin embargo, hay varios marcadores que han mostrado ser esperanzadores como factores pronósticos, como el homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) o la proteína HER-2 (Martín de las Mulas *et al.*, 2003; Ressel *et al.*, 2009; Klopffleisch *et al.*, 2011). La aplicación de una variedad de anticuerpos monoclonales junto con otros parámetros establecidos constituye una ayuda en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del carcinoma de mama canino (Zaidan-Dagli *et al.*, 2008).

2.2.3. TRATAMIENTO

Hasta la fecha, los tumores de mama representan una patología eminentemente quirúrgica. Las técnicas de abordaje varían en función del tamaño, la localización y el número de tumores presentes en el momento de la consulta e incluyen desde la tumorectomía hasta la mastectomía radical unilateral o bilateral con distintas pautas de resección de los ganglios linfáticos regionales (axilar e inguinales superficiales) (Ferguson, 1985; Sautet *et al.*, 1992; Lana *et al.*, 2007). Recientemente se ha recomendado realizar mastectomías más amplias debido a que en un 60% de los casos se producen nuevos tumores en el parénquima mamario no extirpado en cirugías previas (Stratmann *et al.*, 2008). Esta comunicación debería hacer reflexionar a los clínicos a la hora de planificar las cirugías, sobre todo en pacientes con alguna otra patología crónica que aumente el riesgo de someter al paciente a una segunda anestesia general para extirpar un tumor recidivante.

Los posibles tratamientos adyuvantes a la cirugía son la quimioterapia, la inmunoterapia y la terapia hormonal, pero en Medicina Veterinaria se utilizan poco. Así, no hay todavía ningún protocolo de quimioterapia que haya demostrado ser efectivo en las perras con carcinoma de mama, aunque se ha observado actividad anti-tumoral de la doxorrubicina en estudios *in vitro* (Sartin *et al.*, 1993). No obstante, se sigue trabajando en la búsqueda de nuevos agentes quimioterápicos que, *in vitro*, han demostrado poseer actividad

antitumoral en líneas celulares de tumores de mama caninos (Yamada *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2009).

Por otra parte, también recientemente, se ha empleado un análogo sintético de la vasopresina, la desmopresina, que *in vivo* ha demostrado aumentar significativamente el periodo libre de enfermedad y el tiempo de supervivencia total en perras con cáncer mamario (Hermo *et al.*, 2011).

El uso de protocolos de inmunoterapia adyuvante a la cirugía con moduladores inespecíficos de la respuesta inmune, como el levamisol, el *Corynebacterium parvum* con Bacillus Calmette-Guérin (BCG) (Parodi *et al.*, 1983; MacEwen *et al.*, 1985) y el "liposome-encapsulated muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine (L-MTP-PE)" (Teske *et al.*, 1998) no parece ser tampoco más efectivo que la cirugía exclusiva, aunque algunos autores indican efectos favorables *in vitro* del interferón-gamma (Whitley *et al.*, 1995). Por otra parte, se han realizado ensayos en la fabricación de vacunas ologénicas que tendrían un cierto poder antitumoral (Bird *et al.*, 2008).

El tratamiento endocrino presenta sustanciales diferencias entre la especie humana y la canina. En la mujer, el uso de tratamiento endocrino de tipo adyuvante a la cirugía en el carcinoma de mama es rutinario y sus resultados son los siguientes: un 70%, aproximadamente, de las pacientes con tumores que presentan receptores hormonales y un 10% a 30% de las pacientes cuyos tumores no presentan receptores hormonales responden a distintos tipos de manipulaciones endocrinas con alivio de la sintomatología (disminuyen las lesiones clínicamente detectables debidas a metástasis y se retrasa la aparición de recidivas) y el consiguiente aumento de la supervivencia (Mauriac *et al.*, 1989; Allred *et al.*, 1998). El tratamiento endocrino que se utiliza en la mujer es de tipo aditivo (drogas con actividad "anti-hormona"), aunque en la década de los 70, que es cuando se empezó a utilizar este tipo de tratamiento de forma rutinaria, se practicaban tratamientos ablativos (ovariectomía, fundamentalmente) (Baulieu y Mester, 1989).

En la perra se han ensayado dos tipos de tratamientos endocrinos: el ablativo (quirúrgico o médico) y el aditivo (drogas con actividad anti-

estrógenos, particularmente el tamoxifeno). Entre los tratamiento ablativos, el más usado es la ovariectomía simultánea a la cirugía mamaria en perras enteras, habiéndose ensayado el bloqueo farmacológico del eje hipotálamo-hipófisis-ovario en perras enteras con tumores de mama utilizando un análogo de la LHRH (Goserelin) (Lombardi *et al.*, 1999). El uso de tamoxifeno, una droga anti-estrogénica usada ampliamente en casos de cáncer de mama en mujeres (Cuzick *et al.*, 2011), se ha empleado en casos de tumores de mama en perra. Sin embargo, la tendencia generalizada es desaconsejar su uso por la ineficacia anti-tumoral y/o los efectos secundarios del tratamiento con anti-estrógenos (Morris *et al.*, 1993; Lana *et al.*, 2007). Sin embargo, recientemente se ha reportado su uso con resultados esperanzadores (Tavares *et al.*, 2010). Por otra parte, también muy recientemente, se ha reportado como un antagonista de los receptores de progesterona, la aglepristona, tiene efectos antiproliferativos *in vivo* en perras con tumores de mama (Guil-Luna *et al.*, 2011).

El posible efecto protector de la ovariectomía practicada en el momento de la cirugía de los tumores de mama malignos en la perra es muy controvertido. Aunque muchos veterinarios la practican de forma sistemática, hay muy pocos estudios prospectivos y con datos estadísticos. Dos estudios, con estas garantías, indican que la ovariectomía practicada en el momento de la cirugía no ejerce ningún control sobre desarrollo de metástasis del tumor extirpado ni tampoco tiene efecto protector sobre el desarrollo de nuevos tumores (Yamagami *et al.*, 1996a; Morris *et al.*, 1998; Philibert *et al.*, 2003), pero ya había estudios previos en el mismo sentido (Brodey *et al.*, 1966; Brodey *et al.*, 1983). Sin embargo, otros autores sí han encontrado un efecto significativo en el tiempo de supervivencia tras la cirugía relacionado con la ovariectomía peri-quirúrgica (Sorenmo *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2005).

Actualmente, no hay información disponible sobre la utilidad de la radioterapia como tratamiento alternativo-paliativo a la cirugía que debería utilizarse cuando el tumor es inaccesible al tratamiento quirúrgico por su tamaño o extensión local (Lana *et al.*, 2007). En el carcinoma inflamatorio sí se ha utilizado y proporciona remisiones a corto plazo (Madewell y Theilen 1987; Lana *et al.*, 2007). El uso de quimioterápicos tampoco está extendido (Lana *et*

al., 2007), pero se trabaja en búsqueda de nuevas alternativas en este grupo de fármacos (Thamm *et al.*, 2011).

Por último, y para la forma clínica de los carcinomas inflamatorios, se ha reportado que el uso de inhibidores de la enzima COX-2 aumenta significativamente el periodo de supervivencia en estos casos, siendo de 7 y 185 días las medias del periodo de supervivencia total en los grupos que no recibieron y que recibieron, respectivamente, tratamiento con anti-inflamatorios no esteroideos COX-2 selectivos (Souza *et al.*, 2009).

2.2.4. ETIOPATOGENIA: CARCINOGENESIS

La evidencia de que el cáncer tiene un origen genético es ya irrefutable (Vogelstein *et al.*, 2000; Ponder, 2001; Vogelstein y Kinzler, 2004). La unificación de los distintos hallazgos en el ámbito de la patología, la biología de la radiación, la estructura del ADN, la microbiología, la epidemiología y la citogenética en los años 50, 60 y 70 facilitaron la identificación de una gran cantidad de genes relacionados con distintos tipos de cáncer. A pesar de que el concepto, universalmente aceptado, de que el cáncer se origina merced a alteraciones en determinados genes, las dianas principales de la lesión genética son tres clases de genes reguladores normales: **los protooncogenes** que estimulan el crecimiento, **los genes supresores del cáncer** que inhiben el crecimiento (antioncogenes) y **los genes que regulan la muerte celular programada o apoptosis**.

Los alelos mutantes de los protooncogenes se denominan oncogenes. Se consideran dominantes porque transforman las células a pesar de la existencia de su contrapartida normal. Por otra parte, para que se produzca la transformación, la lesión debe afectar a los dos alelos normales de los genes supresores del tumor. Los genes que regulan la apoptosis pueden ser dominantes, como sucede con los protooncogenes, o comportarse como genes supresores del cáncer.

La transformación de una célula normal en tumoral es un proceso con múltiples pasos en el que adquiere la capacidad de proliferar de manera

autónoma, de evadirse de la vigilancia del sistema inmune, así como de los procesos de apoptosis y de desarrollar habilidades de invasión y metástasis. De este modo, en muchos tipos de cáncer se requiere de la acumulación de múltiples aberraciones celulares para que se cree una célula maligna con la capacidad de formar metástasis más allá del tumor primario (Franks y Teich, 1997).

El modelo de "**Iniciación, Promoción y Progresión**" (IPP) o de "**Carcinogénesis Escalonada**" (Moolgavkar *et al.*, 1980a, 1980b) es un punto de partida útil para definir las bases genéticas del cáncer. A diferencia de las enfermedades producidas por defectos en un solo gen, el cáncer es una enfermedad compleja y multigénica, y este modelo explica su desarrollo a partir de una progresión secuencial de mutaciones.

En el modelo **IPP**, una mutación genética (hereditaria, espontánea, biológica, química o física) dota a una célula somática con un ilimitado potencial replicativo o con otras ventajas a nivel de supervivencia o crecimiento, con respecto a otras células de su medio ambiente (**Fase de Iniciación**). Por sí sola, esta mutación no es suficiente para dar lugar a un tumor, ya que la célula sigue estando limitada por factores ambientales.

Una segunda mutación (o una serie de mutaciones) en la progenie de la *célula iniciada* mediante la acción de distintos *agentes promotores* aumentaría más la capacidad de la célula para competir con las vecinas en su entorno, llevando este potencial de expansión a una masa tumoral reconocible (**Fase de Promoción**).

Por último, una tercera serie de mutaciones sobre las *células iniciadas*, o bien sobre células *hiperplásicas, displásicas o neoplásicas benignas*, conduce a un mayor grado de error en las sucesivas divisiones celulares lo que refuerza el potencial de las células malignas (**Fase de Progresión**).

A diferencia de la especie humana, existen pocos datos sobre los mecanismos y las moléculas que contribuyen al desarrollo del cáncer de mama canino. La deficiencia de datos se ve incrementada por la falta de especificidad o inexistencia total de herramientas de estudio molecular en la

especie canina, por tamaños muestrales bajos y por la carencia de estudios con seguimiento clínico, aspecto este último esencial para establecer una significancia clínica a los datos sobre el estudio de una molécula dada (Klopfleisch *et al.*, 2011).

Debido a que el cáncer de mama espontáneo canino ha sido propuesto como modelo de estudio para la especie humana, las similitudes y las diferencias en sus alteraciones moleculares se han tornado de gran interés para la comunidad científica (Vail y MacEwen, 2000; Klopfleisch *et al.*, 2011; Mouser *et al.*, 2010; Rivera y von Euler, 2011). A continuación se resumen los conocimientos actuales en cuanto a las principales moléculas que pudieran ayudar a comprender mejor la etiopatogenia así como implementar métodos de diagnóstico, pronóstico y tratamientos más eficaces.

2.2.4.1. Oncogenes

La proliferación celular en los tejidos no neoplásicos está regulada por varias vías, incluyendo los reguladores del ciclo celular. Los tumores se caracterizan por poseer unos niveles de proliferación celular aumentada cuando se comparan con el tejido normal del que provienen. Por tanto los tumores de mama debieran de poseer mayores niveles de expresión de proteínas favorecedoras del crecimiento y proliferación celular (Stricker y Kumar, 2010; Klopfleisch *et al.*, 2011).

Los oncogenes están directamente implicados en progresión del ciclo celular, como miembros de los puntos de control del ciclo celular (ciclinas y ciclinas dependientes de quinasas (CDK)) o como miembros de otras vías que indirectamente inducen el ciclo celular, como son los factores de crecimiento. De la vasta familia de proteínas involucradas directamente en el ciclo celular (Fig. 8) sólo las ciclinas A y D1 han sido estudiadas en los tumores de mama caninos, estando sobre-expresadas en los tumores de mama malignos (Murakami *et al.*, 2000; Sfacteria *et al.*, 2003). Sin embargo, la significancia pronóstica de la expresión de esta proteína no está del todo clara, debido a que las lesiones mamarias displásicas (precancerosas) también sobre-expresan la ciclina D1 (Sfacteria *et al.*, 2003).

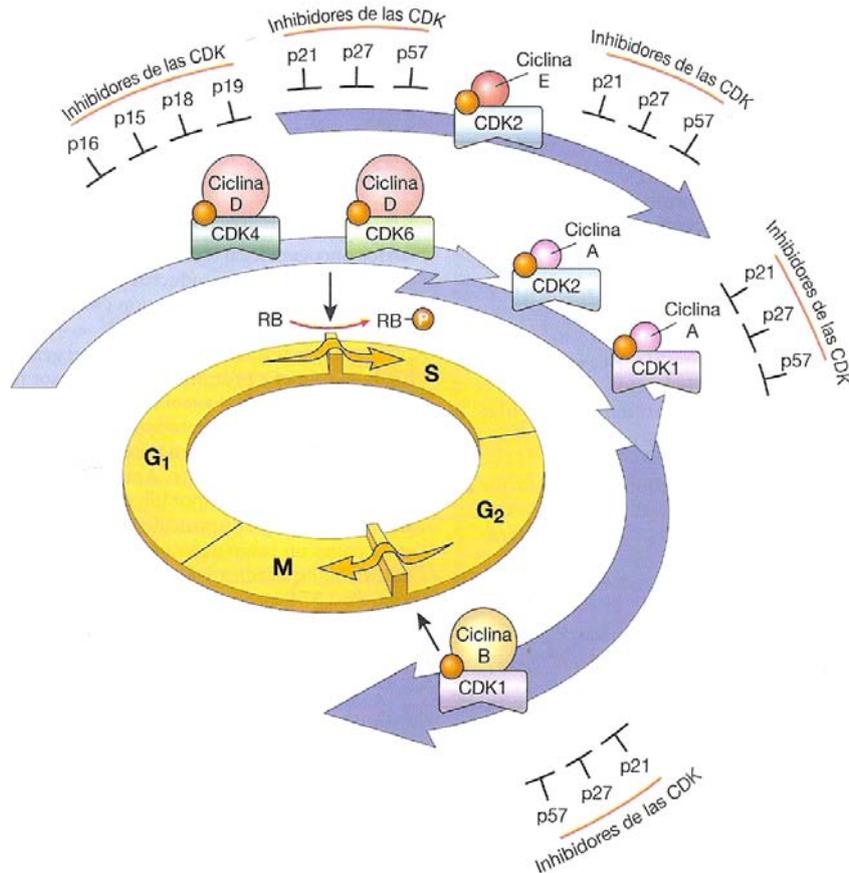


Figura 8. **Ciclo celular.** Esquema de acción de las ciclinas, ciclinas dependientes de quinasas (CDK) e inhibitoras de las CDK en la regulación del ciclo celular. Las flechas sombreadas de color azul, representan las fases del ciclo celular durante las que se activan complejos ciclina/CDK específicos y sobre las que actúan diferentes proteínas inhibitoras de las CDK (Stricker y Kumar, 2010).

La proteína SATB1 es un factor de transcripción y un organizador global de la cromatina, propuesto como un factor clave en la integración de la arquitectura de la cromatina por medio de regulación de la expresión génica y que se encuentra asociada a la promoción del crecimiento y a la metástasis de las células del cáncer de mama humano, y cuya sobre-expresión se encuentra relacionada con un mal pronóstico (Pavan *et al.*, 2006; Patani *et al.*, 2009). Sin embargo, para los tumores de mama caninos se han encontrado resultados opuestos. En un estudio, adenomas y metástasis de tumores de mama presentaban menores niveles de expresión de SATB1 cuando se compararon con tejido glandular mamario no neoplásico del mismo animal. A pesar de las numerosas similitudes de esta patología entre las especies humana y canina, esta proteína es un ejemplo de una de las diferencias en los mecanismos moleculares entre ambas especies (Klopfleisch *et al.*, 2011).

Debido a la relevancia para la especie humana se ha investigado, también, para los tumores de mama caninos el oncogén C-ERBB2 y la proteína HER-2. La proteína HER-2 se sobre-expresa en, aproximadamente, un 25% de los tumores de mama humanos, hecho además que se relaciona con un peor pronóstico (Ferretti *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos para los tumores de mama caninos han resultado contradictorios. Mientras que unos autores han encontrado una asociación entre la sobre-expresión de la proteína HER-2 y periodos libres de enfermedad más cortos así como con tumores de mayor grado histológico de malignidad (Ordás, 2009), otros autores han obtenido resultados totalmente opuestos (Hsu *et al.*, 2009).

Otro oncogén relacionado con la familia de los receptores de factor de crecimiento, la proteína receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR), también HER-1 o C-ERBB1, ha demostrado estar sobre-expresada en un 62% de los tumores de mama caninos estando dicha sobre-expresión asociada a pacientes con un menor periodo libre de enfermedad y menor tiempo de supervivencia total (Gama *et al.*, 2009).

2.2.4.2. Genes supresores de tumores

Uno de los supresores tumorales e inhibidores del crecimiento mejor establecidos es el gen *TP53*, y su proteína p53, denominado “el guardián del genoma”. La proteína p53 es activada por muy diferentes vías, incluyendo el estrés oxidativo y el daño al ADN entre las más importantes. Sus funciones son múltiples y se considera como un punto de control central que dirige a la célula hacia la dirección adecuada, es decir, hacia la detención del ciclo celular (hacia la senescencia) o hacia la apoptosis (Vogelstein *et al.*, 2000; Vousden y Prives, 2009). La proteína p53 regula, a su vez, a numerosas proteínas reguladoras de la proliferación celular, como la proteína p21, una proteína inhibidora de las CDKs, imprescindibles para la progresión del ciclo celular.

En Medicina Veterinaria, se ha estudiado la expresión de la proteína p53 en los tumores de mama caninos, sin embargo su relevancia pronóstica es todavía cuestionable (Kumaraguruparan *et al.*, 2006; Rodo y Malicka, 2008; Morris *et al.*, 2009).

También se ha estudiado, en los tumores de mama caninos, la expresión de la proteína p21. Ésta se encuentra sobre-expresada en tumores de mama metastásicos cuando se compara con adenomas y linfonodos con metástasis. Los autores de este estudio han hipotetizado que el incremento de la expresión de la proteína p21 en tumores de mama metastásicos pudiera ser el resultado del intento por parte de la proteína p53 de inducir la inhibición del ciclo celular (Klopfleisch y Gruber, 2009).

De manera similar, la expresión de la proteína p27, otra proteína inhibidora de las CDK, ha demostrado estar disminuida en los tumores de mama caninos metastásicos cuando se comparó con el tejido mamario sano (Klopfleisch y Gruber, 2009; Klopfleisch *et al.*, 2010c).

2.2.4.3. Apoptosis

En las células sanas cualquier alteración genética o desequilibrio metabólico que pudiera llevar consigo la transformación maligna de dichas células está prevenida por diferentes vías, algunas de las cuales llevan a la célula hacia una muerte programada o apoptosis. Bajo determinadas condiciones fisiológicas de estrés o daño celular se ponen en marcha mecanismos de activación de factores proapoptóticos o de supresión de los antiapoptóticos (Bristow y Hill, 2008; Zuckerman *et al.*, 2009).

De nuevo, la proteína p53 es uno de los reguladores más importantes de los mecanismos que inducen la apoptosis. De manera genérica, tras producirse un daño celular, se induce la producción de la proteína p53 que detiene momentáneamente el ciclo celular e induce la transcripción de genes reparadores del ADN. Si el daño es irreparable la proteína p53 activará a la proteína BAX que a su vez activará a un grupo de proteínas llamadas caspasas (caspasa 3, 8 y 9) que ejercen mecanismos de degradación celular (Gasco *et al.*, 2002c; Stricker y Kumar, 2010).

Algunas de estas proteínas han sido analizadas en los tumores de mama caninos y como era de esperar, proteínas antiapoptóticas (BCL2, BCLX, SFRP2) presentan una expresión no alterada o incrementada, mientras que proteínas proapoptóticas (BAX, caspasa 8, caspasa 9) presentan disminución

de expresión (Kumaraguruparan *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006b). Sin embargo, la falta de información sobre la funcionalidad de la sobre-expresión de estas proteínas y de la relevancia clínica y pronóstica de esos patrones de expresión limitan su uso como factores pronósticos (Klopfleisch *et al.*, 2011).

2.3. PROTEÍNAS p63

La proteína p63 es el producto de transcripción del gen *TP63*, localizado en el cromosoma 3q27-29 de la especie humana y en el cromosoma 34, locus NC_006616.2 en la especie canina, siendo homólogo del gen supresor tumoral *TP53*. La transcripción del gen *TP63* da lugar a seis isoformas que se clasifican en dos grupos de proteínas (TA y Δ N) en función de sus extremos nitrógeno (N) y carbono (C) terminales (Yang *et al.*, 1998; Yang y McKeon, 2000).

Tres de las isoformas (TAp63 α , TAp63 β y TAp63 γ) contienen un dominio N-terminal similar a la proteína p53. Se conoce que este grupo de isoformas tiene capacidad de transactivar (de ahí su abreviatura TA) genes *p53*-dependientes, hecho esencial para la inducción de la apoptosis o la detención del ciclo celular, mientras que las isoformas Δ N (Δ Np63 α , Δ Np63 β y Δ Np63 γ), que carecen del dominio N-terminal, tienen un efecto represivo sobre la transcripción de los genes *p53*-dependientes (Yang *et al.*, 1998; Yang y McKeon, 2000).

No se ha caracterizado por completo las funciones concretas de cada isoforma, sin embargo, sí se sabe que el grupo TAp63 es necesario para la activación de proteínas reguladoras del ciclo celular para el mantenimiento de la población de células de reserva en múltiples epitelios y para la diferenciación de los queratinocitos, entre otras funciones. Para la definición de sus funciones ha sido de utilidad la generación de ratones *knock out* p63 -/-, los cuales desarrollan defectos que incluyen la ausencia de extremidades y otros tejidos como los dientes, las glándulas salivales y las glándulas mamarias, que se desarrollan merced a interacciones entre el epitelio y el mesénquima (Mills *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999; Pellegrini *et al.*, 2001).

La expresión de la proteína p63 ocurre predominantemente en el núcleo de las células que conforman el estrato basal de múltiples epitelios escamosos y de epitelios de transición. Estas células basales actúan como las progenitoras de las células supra-basales que terminan diferenciándose y que, finalmente, mueren en epitelios regenerativos (Pellegrini *et al.*, 2001).

Se ha establecido que la proteína p63 es un marcador sensible y específico de células mioepiteliales, habiéndose usado en numerosos estudios inmunohistoquímicos en las especies humana, canina y felina (Gama *et al.*, 2003; Hungermann *et al.*, 2005; Kawahara *et al.*, 2005; Leibl *et al.*, 2005; Maruya *et al.*, 2005; Seethala *et al.*, 2005; de Moraes *et al.*, 2006; Rakha *et al.*, 2006; Ramalho *et al.*, 2006; Nicolas *et al.*, 2007; Tse *et al.*, 2007; de Moraes *et al.*, 2008; Saraiva *et al.*, 2008; Seixas, 2008; Bertagnolli *et al.*, 2009; Xavier *et al.*, 2009; Gama *et al.*, 2010). La detección inmunohistoquímica de la p63 ha permitido diagnosticar carcinomas metaplásicos de las glándulas salival y mamaria en la especie humana. También ha permitido discriminar carcinomas invasivos de carcinomas *in situ*, cuando las lesiones estudiadas presentaban bajo grado de malignidad histológica y configuración lobular, cuando estaban intensamente infiltradas por linfocitos o presentaban abundantes células estromales consecuencia de una reacción desmoplásica. También forma parte del grupo de marcadores celulares empleados en la detección inmunohistoquímica de los tumores de mama con fenotipo basal. Una de las ventajas de este marcador celular reside en que no produce marcaje en los miofibroblastos, lo que es de utilidad en aquellos casos en los que la neoplasia presenta abundante tejido conectivo reactivo (desmoplasia) y es difícil discernir mediante el diagnóstico histológico rutinario entre un carcinoma y un carcinoma metaplásico (Reis-Filho *et al.*, 2003; Koker y Kleer, 2004; Stefanou *et al.*, 2004; Leibl *et al.*, 2005; Nassar *et al.*, 2010).

En Medicina Veterinaria, Gama *et al.* en 2003 analizaron la expresión de la proteína p63 en tejidos mamarios caninos normales y neoplásicos. Dicho trabajo demostró una elevada sensibilidad y especificidad del anticuerpo anti-p63 (clon 4A4) como marcador de células mioepiteliales, ya que dicho anticuerpo no reaccionó con miofibroblastos estromales ni con las células musculares de la vasculatura intersticial, quedando limitada su expresión al núcleo de las células mioepiteliales.

2.4. PROTEÍNAS 14-3-3

El descubrimiento de las proteínas 14-3-3 se remonta al año 1967, cuando Moore y Pérez analizaron sistemáticamente las proteínas del cerebro. En este estudio se encontraron diferentes proteínas entre las que se encontraban la 14-3-2 y la 14-3-3. Años más tarde se caracterizó la proteína 14-3-2 como la proteína enolasa neuro-específica (NSE) (Marangos *et al.*, 1976) quedando sin resolver, durante 30 años desde su descubrimiento inicial, la verdadera naturaleza de la proteína 14-3-3.

Aunque en un principio la proteína 14-3-3 se describió como una única proteína, cuyo peculiar nombre se debe a sus características de migración en los geles de electroforesis (Moore y Pérez, 1967), finalmente se concluyó que las proteínas 14-3-3 era una familia de proteínas ácidas altamente conservadas, con un peso molecular de entre 25 y 30 kD, y que se expresaban en todas las células eucariotas. Se han descrito 7 isoformas en los mamíferos (Fig. 9) codificadas por 7 genes distintos [beta (β), gamma (γ), epsilon (ϵ), eta (η), sigma (σ), tau (τ) y zeta (ζ)], 13 en las plantas y 2 en las levaduras (Hermeking, 2003, Hermeking y Benzinger., 2006; Lodyging y Hermekin, 2006)

Las proteínas 14-3-3 actúan como “moléculas chaperonas” (moléculas que se unen a otras proteínas para ayudar en su plegamiento, ensamblaje y/o transporte celular), siendo capaces de moverse libremente desde el citoplasma al núcleo y viceversa, en función de los requerimientos de la homeostasis celular (Muslin *et al.*, 1996; Tzivion *et al.*, 2001). Sin embargo, son proteínas que normalmente se localizan en el citosol. Pueden formar homo o heterodímeros y se ha descrito *in vivo* que más de 200 proteínas se asocian a las proteínas 14-3-3. Entre ellas, encontramos proteínas involucradas en el ciclo celular (Cdc25 A, B, C, Wee1, Chk1), señalización intracelular, respuesta al estrés y apoptosis, regulación de la transcripción, metabolismo celular e integridad del citoesqueleto y proteínas involucradas en la propagación, movilidad y adhesión, como p130 Cas, las integrinas β 1 (CD29), β 2, β 3 y Ron. Las proteínas 14-3-3 se unen mediante la vía específica fosfo-serin/treonin contenida en dos motivos de unión denominados RSXpSXP y RXY/FXpSXP (donde pS denota fosfo-serina o fosfo-treonina) y que se encuentran en la mayoría de los ligandos de las proteínas 14-3-3 (Muslin *et al.*, 1996; Yaffe *et*

al., 1997; Tzivion y Avruch, 2002), pudiendo modificar la función de sus dianas de diferentes maneras, bien alterando su actividad catalítica, su localización celular, la incorporación en otros complejos proteínicos o modificando su susceptibilidad a las proteasas y fosfatasas (Hermekin, 2003; Wilker y Yaffe, 2004). Sin embargo, también se ha demostrado que un determinado número de ligandos pueden unirse a las proteínas 14-3-3 de una manera fosforo-independiente usando lugares de unión alternativos, como es el caso de la proteína BAX (Wang *et al.*, 1999; Tzivion *et al.*, 2001; Hermekin, 2003; Wilker y Yaffe 2004).

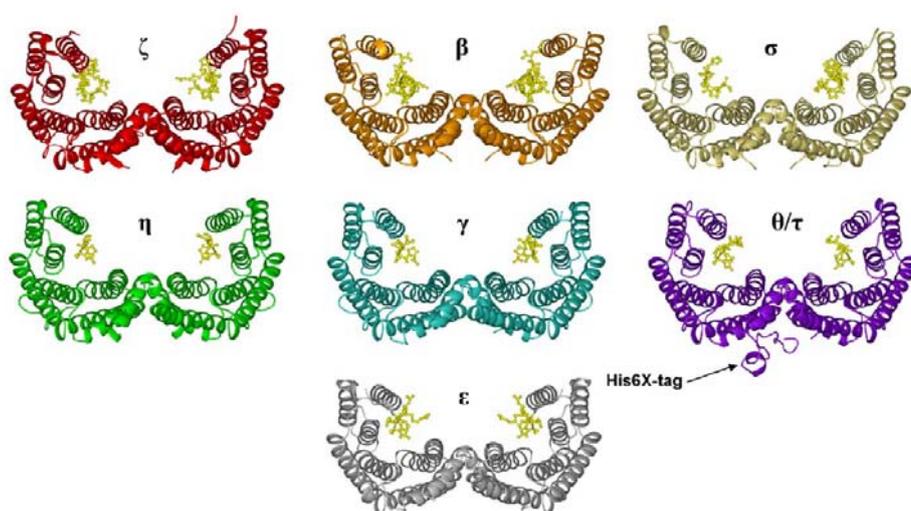


Figura 9. **Estructura cristalina de las siete isoformas de la familia 14-3-3** (Gardino *et al.*, 2006).

Se ha observado que las proteínas 14-3-3 se encuentran des-reguladas, sobre o infra-expresándose en diferentes patologías de la especie humana. Como ejemplos se pueden citar los siguientes: la isoforma ζ ha sido involucrada en diferentes desórdenes neurológicos (Zanusso *et al.*, 2005); la detección de la isoforma γ ha sido usada como marcador de la Enfermedad de Creutzfeld-Jacob (ECJ) (Peoc'h *et al.*, 2001; Van Everbroeck *et al.*, 2005); las isoformas β , ε y η se han detectado en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con la ECJ (Wiltfang *et al.*, 1999); las isoformas β , γ y τ se encuentran sobre-expresadas en tumores de pulmón con respecto a sus niveles de expresión en tejido pulmonar no neoplásico (Qi *et al.*, 2005). La isoforma τ ha demostrado ser un marcador específico para el cáncer de pulmón (Qi *et al.*, 2003) y la isoforma σ es necesaria para el correcto funcionamiento del punto de control G2/M del ciclo celular (Chan *et al.*, 1999).

En estudios con modelos animales, ratones deficientes de la isoforma ϵ tuvieron defectos en el desarrollo del cerebro y en la migración neuronal, (Toyo-oka *et al.*, 2003). Así mismo, esta isoforma se ha encontrado ausente en pacientes humanos con trastornos de migración neuronal como es el caso del síndrome de Miller-Dieker. Ratones *knock-out* para las isoformas ζ y η mostraron incremento de la mortalidad con cardiomiopatías y una masiva apoptosis de cardiomiocitos (Xing *et al.*, 2000; Steinacker *et al.*, 2005). Por otra parte, se ha demostrado que las proteínas 14-3-3 pueden alargar la vida de ciertos tipos de nematodos por promover un incremento de copias del gen sir-2.1 (Berdichevsky *et al.*, 2006).

Como característica general de sus funciones, las proteínas 14-3-3 regulan de manera positiva a proteínas con funciones promotoras del crecimiento y supervivencia y de manera negativa a proteínas que inducen la muerte celular o la senescencia, atribuyéndoles por tanto un potencial oncogénico. Sin embargo, varios autores también han mostrado que las proteínas 14-3-3 pueden regular de manera negativa las señales de varios receptores de factores de crecimiento y atenuar la progresión del ciclo celular, especialmente tras producirse un daño en el ADN (Hermeking, 2003, Wilker y Yaffe, 2004).

La habilidad de las proteínas 14-3-3 para unirse e interactuar con los productos de diferentes oncogenes, Raf, Bcr y Bcr-Abl entre otros, así como con los productos de los genes supresores de tumores, p53, TSC2, p27 y p21 entre otros, pone de manifiesto su importante papel en la carcinogénesis (Hermeking, 2003; Wilker y Yaffe, 2004). Sin embargo, debido a que las proteínas 14-3-3 no poseen una actividad catalítica definida, sus potenciales funciones se estudian a partir del efecto que ejercen sobre las proteínas con las que se unen. Es por ello por lo que se hace necesario estudiar el papel de las proteínas 14-3-3 en el desarrollo y progresión del cáncer a través de sus ligandos, muchos de los cuales se hayan implicados en el cáncer, y discutir el papel que las proteínas 14-3-3 ejercen en su regulación (Hermeking, 2003, Tzivion *et al.*, 2006).

Por otra parte, es importante comparar la expresión de estas proteínas en los distintos tipos de neoplasias, ya que se discute que las proteínas 14-3-3

pueden estar involucradas en el desarrollo de cáncer por poseer la capacidad de actuar tanto como oncogenes como genes supresores de tumores (Tzivion *et al.*, 2006).

De entre las siete isoformas descritas en la especie humana, la isoforma σ se ha relacionado de manera más intensa con diferentes tipos de tumores.

2.4.1. PROTEÍNA 14-3-3 σ

La proteína 14-3-3 σ , también llamada estratifina, “marcador específico epitelial mamario humano 1” (HME 1) o FTT σ , es una de las 7 isoformas de la familia 14-3-3 y es codificada por el gen *14-3-3 σ* situado en el cromosoma 1p35 de la especie humana (Hermeking *et al.*, 1997). Al igual que las otras isoformas, la proteína 14-3-3 σ forma dímeros y se une a otras proteínas a través de motivos de unión fosforilados en residuos de serina (Ser) o treonina (Thr) (Muslin *et al.*, 1996; Tzivion y Avruch, 2002).

La proteína 14-3-3 σ tiene un peso molecular de 30 kDa y fue caracterizada por primera vez en 1992 como un marcador específico de epitelio (Prasad *et al.*, 1992), dándosele el nombre de estratifina un año más tarde por haberse detectado su expresión en epitelios estratificados (Leffers *et al.*, 1993).

La proteína 14-3-3 σ , cuya estructura cristalina recuerda al casco de un caballo, existe como un dímero proteico compuesto por 9 α -hélices antiparalelas nombradas desde la α A hasta la α I. Los residuos situados en las hélices α A y α B de una de las subunidades interaccionan con otros residuos en las hélices α C y α D formando la estructura dimérica (Fig. 10). Esta disposición provoca un espacio tridimensional con un diámetro de 15Å y una profundidad de 10Å. A diferencia de los otros isotipos que forman homodímeros o heterodímeros con otras isoformas, la isoforma σ se encuentra frecuentemente como un homodímero. De manera única, la isoforma σ posee interacciones entre diferentes aminoácidos (Lys⁹, Glu⁸³, Phe²⁵, Tyr⁸⁴, Ser⁵, Glu²⁰, Glu⁸⁰) que provocan un plegamiento diferente y la preferencia a formar homodímeros. El hecho de que la isoforma σ se encuentre frecuentemente

como un homo-dímero ha sido barajado como uno de los requerimientos para que esta proteína lleve a cabo sus funciones (Li *et al.*, 2009).

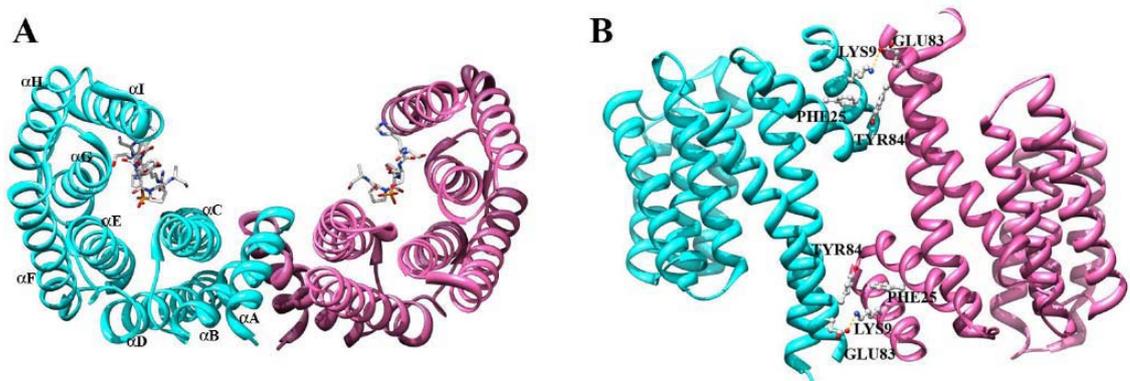


Figura 10. **Estructura cristalina de la proteína 14-3-3σ.** A) Se observan las regiones de interacción en las α hélices que contribuyen a su plegamiento. B) Se observan los aminoácidos que difieren del resto de isoformas y que favorecen la formación de homo-dímeros (Li *et al.*, 2009)

La proteína 14-3-3σ regula la función de sus ligandos mediante su secuestro en el citoplasma, enmascarando sus dominios, previniendo o acelerando su degradación, modulando su actividad enzimática o facilitando modificaciones estructurales (Taylor *et al.*, 2001, Hermeking, 2003).

2.4.1.1. Regulación del gen y la proteína 14-3-3σ en respuesta al daño genético

La expresión de la proteína 14-3-3σ viene regulada por diferentes mecanismos que cuando se alteran contribuyen directamente al desarrollo de tumores (Urano *et al.*, 2002; Hermekin, 2003; Lodygin *et al.*, 2003; Herron *et al.*, 2005).

El principal regulador de la expresión de la proteína 14-3-3σ es el gen supresor de tumores *p53*. Un estudio de expresión génica en líneas celulares de cáncer colorrectal humano que expresaban la forma no mutada (wild type) de la *p53* reveló acumulación de ARNm del 14-3-3σ después de aplicar radiación γ. En este estudio, se mostró que la *p53* activa directamente la transcripción del gen 14-3-3σ (Fig. 11 y 12) y que la expresión de la proteína 14-3-3σ induce el arresto de la fase G2/M del ciclo celular. Además, el gen 14-3-3σ es el único de la familia 14-3-3 cuya inducción puede producirse tras un daño en el ADN (Hermekin *et al.*, 1997; Samuel *et al.*, 2001).

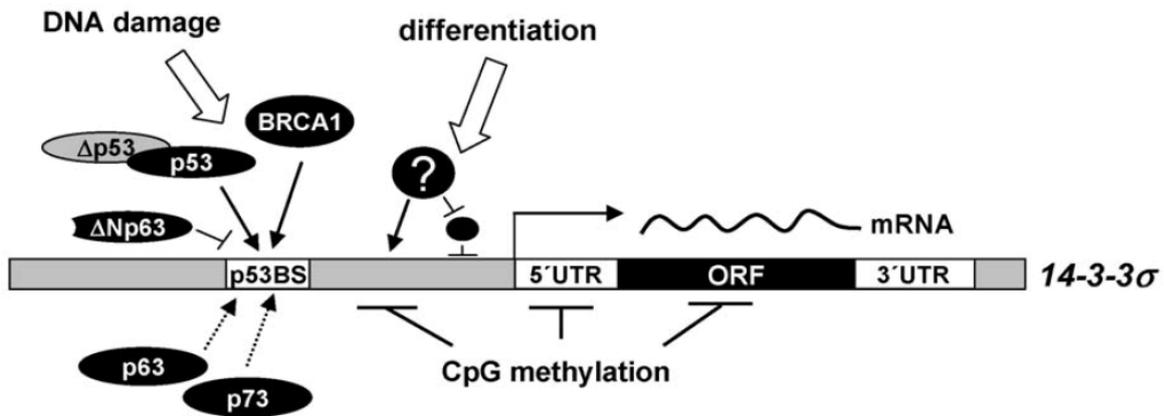


Figura 11. **Mecanismos de regulación de la transcripción del gen *14-3-3σ*** (Lodygin y Hermeking, 2006).

La inducción del gen *14-3-3σ* mediada por la proteína p53 es necesaria para el mantenimiento estable del arresto del ciclo celular en la fase G2/M (Chan *et al.*, 1999) (Fig. 11 y 12). Así, se presume que la proteína *14-3-3σ* se une al complejo kinasa dependiente de ciclina (CDK) CDC2/CiclinaB e impide su movilización hacia el núcleo celular, evento imprescindible para que el proceso de mitosis tenga lugar (Chan *et al.*, 1999). También se ha demostrado que la proteína *14-3-3σ* ejerce un efecto de feedback positivo sobre la transcripción del gen *p53*. Además, se ha demostrado que la proteína *14-3-3σ* también se une a diferentes CDKs específicas de la fase G1/S, hipotetizándose que podría estar involucrada en la detención del ciclo celular también en este punto de control (Laronga *et al.*, 2000). Por otra parte, se ha demostrado la interacción de la proteína *14-3-3σ* con la proteína AKT, inhibiendo su actividad kinasa y, por tanto, su capacidad de inhibición de la apoptosis, estabilizando así a la proteína inhibidora de las CDKs p27. En otras palabras, la inhibición de la inhibición de la apoptosis impide que una célula con ADN dañado sobreviva y continúe replicándose indefinidamente (Yang *et al.*, 2006a).

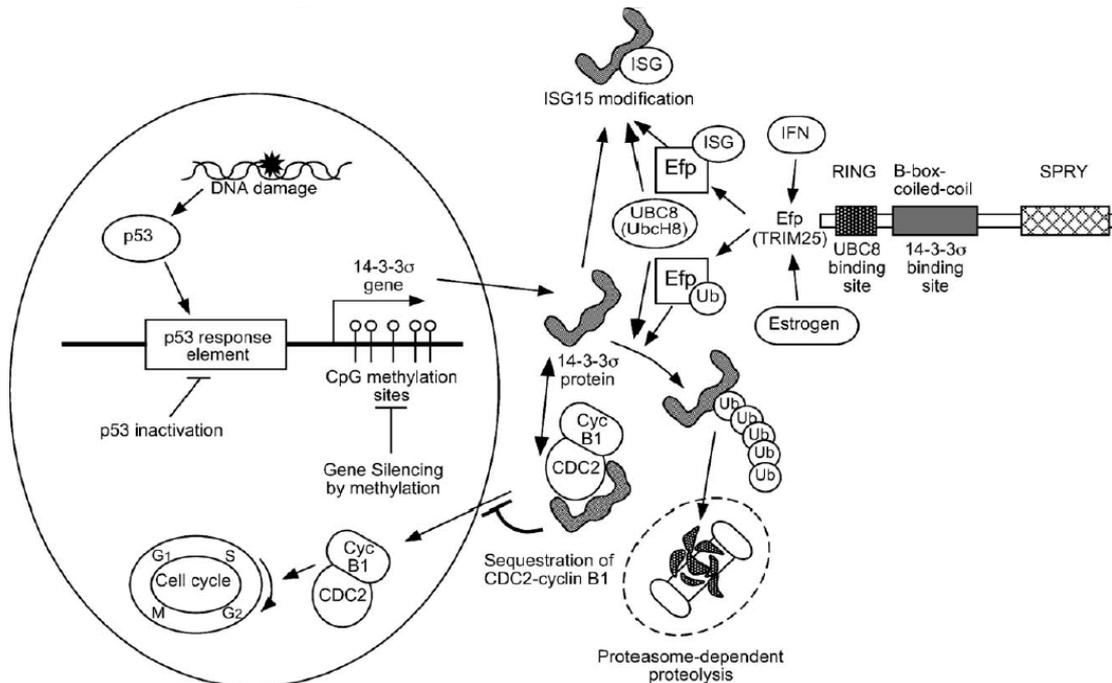


Figura 12. **Mecanismo de acción propuesto para la proteína 14-3-3σ en células tumorales** (Horie-Inoue e Inoue, 2006).

Otra manera descrita para activar la producción de la proteína 14-3-3σ, es a través de una variante de la proteína p53 (Δ p53) que carece de 66 residuos de aminoácidos y que se expresa específicamente durante la fase S del ciclo celular (Rohaly *et al.*, 2005). Sin embargo, esta isoforma de la p53 sólo induce la producción de las proteínas 14-3-3σ y p21, pero no la de otras como HDM2 (inhibidor de p53), HDM2 (proapoptosis) y PIG3 (prooxidativa/proapoptosis) (Lodygin y Hermeking, 2006).

La regulación de la expresión del gen *14-3-3σ* también se realiza a través de la mediación de otros homólogos de la p53. La proteína Δ Np63, una isoforma de la proteína p63, puede unirse a la región promotora de dicho gen y, a diferencia de la p53, impedir su transcripción (Westfall *et al.*, 2003).

También se ha demostrado que, en algunos tipos celulares, la isoforma TAp63 puede sustituir a la p53 en su función de activador de la transcripción del gen *14-3-3σ* (Petitjean *et al.*, 2005). De igual manera, también se ha demostrado que otra proteína homóloga a la p53 y a la p63, la TAp73, induce la expresión de la proteína 14-3-3σ en líneas celulares de cáncer de mama (Vayssade *et al.*, 2005), así como la proteína BRCA1 que, mediante su

interacción con la p53, puede inducir la transcripción del gen *14-3-3 σ* (Aprelikova *et al.*, 2001).

En estudios de células sometidas a radiación y e inactivadas para el gen *14-3-3 σ* se ha demostrado que no es posible la detención del ciclo celular en el punto de control G2/M, permitiendo la entrada en mitosis de una célula con ADN dañado (mitosis aberrantes) (Chan *et al.*, 1999, 2000).

Por último, otro de los mecanismos de regulación descubiertos es el de la vía de la proteína estrogen-responsive RING finger (EFP), que puede interaccionar con la proteína *14-3-3 σ* y marcarla para que se produzca su degradación (Urano *et al.*, 2002; Horie-Inoue e Inoue, 2006). La significación clínica de esta regulación ha podido demostrarse *in vivo* con modelos animales, en los que la sobre-expresión de proteína EFP indujo el desarrollo de ciertos tumores presumiblemente porque la degradación de la proteína *14-3-3 σ* produce inestabilidad genómica (Urano *et al.*, 2002).

El hecho de que la proteína *14-3-3 σ* detenga el ciclo celular merced a un daño genético previo, induce a pensar que pudiera actuar, al igual que la p53, como una proteína supresora de tumores (Vercoutter-Edouart *et al.*, 2001, Moreira *et al.*, 2004; Urano *et al.*, 2004; Wilker *et al.*, 2007).

2.4.1.2. Funciones de la proteína *14-3-3 σ* en los queratinocitos

Entre los diferentes tipos de epitelio, la epidermis se caracteriza por presentar altos niveles de expresión de proteína *14-3-3 σ* . Los queratinocitos que provienen de un compartimento de células progenitoras, de localización basal y que sufren diferenciación, muestran un incremento de la expresión de la proteína *14-3-3 σ* , lo que sugiere que esta proteína pudiera estar ligada a la diferenciación final de las células epiteliales (Pellegrini *et al.*, 2001). Además, un estudio *in vitro* implicó al gen *14-3-3 σ* en la senescencia de queratinocitos humanos. La inactivación experimental de dicho gen en queratinocitos permitió a los mismos evadir la senescencia y volverse inmortales sin necesidad de introducir ninguna alteración genética adicional (Dellambra *et al.*, 2000). No obstante, las causas por las que la pérdida de la proteína *14-3-3 σ* contribuye a la immortalización celular no son del todo conocidas (Hermeking, 2003).

Una función importante de la proteína 14-3-3 σ en los queratinocitos es la de estimular la expresión de metaloproteinasas (MMP) por parte de fibroblastos dermales (Ghahary *et al.*, 2004, 2005). Las metaloproteinasas son enzimas de degradación del colágeno, siendo éste el principal componente de la matriz extracelular producida en gran medida por los fibroblastos. La excesiva acumulación de matriz extracelular durante la cicatrización puede conllevar a fibrosis y a la formación de cicatrices hipertróficas. El retraso en la epitelialización, debido a infecciones o a severidad de la lesión, incrementa la frecuencia de desarrollo de condiciones fibróticas. Por ello, la proteína 14-3-3 σ es un factor que podría mediar la señalización entre los queratinocitos y los fibroblastos para pasar de la acumulación de colágeno a la maduración y remodelación durante el proceso de cicatrización. Más aún, el co-cultivo de queratinocitos con fibroblastos dérmicos parece demostrar la expresión de un mayor nivel de ARNm 14-3-3 σ , lo que sugiere también la existencia de un factor derivado del tejido estromal que regularía la expresión de la proteína 14-3-3 σ (Medina *et al.*, 2007).

2.4.1.3. Expresión de la proteína 14-3-3 σ en tejidos normales humanos

La localización y distribución de la proteína 14-3-3 σ en tejidos normales humanos fue estudiada de manera concreta por Nakajima *et al.* en 2003 (Tabla 3), utilizando la técnica inmunohistoquímica del ABC. Los resultados de este trabajo mostraron que la proteína 14-3-3 σ se expresa de manera fisiológica en el citoplasma de numerosos epitelios, especialmente en aquellos con diferenciación escamosa. Se obtuvo una fuerte inmunorreacción en el citoplasma de queratinocitos de la piel, en urotelio, en células periductales y periacinares de la próstata y en células epiteliales y mioepiteliales de la mama, no detectándose presencia de la proteína 14-3-3 σ en cerebro, cerebelo, médula espinal, tiroides, corazón, ganglio linfático, bazo, hígado, músculo esquelético, páncreas exocrino, glándulas endocrinas, testículo y ovario. En este trabajo la expresión de la proteína también se produjo ocasionalmente a nivel nuclear, demostrando que la proteína 14-3-3 σ puede moverse libremente del citoplasma al núcleo o viceversa en función del contexto celular.

Tabla 3. Distribución de la proteína 14-3-3 σ en tejidos normales humanos (Nakajima *et al.*, 2003).

TEJIDO	TIPO CELULAR
Piel, esófago, cérvix	Queratinocitos y células basales del epitelio escamoso
Timo	Corpúsculos de Hassal
Tráquea, bronquios, bronquiolos	Células basales del epitelio
Glándulas mamaria y salival, próstata y páncreas	Célula periductales y periacinares. Ocasionalmente células epiteliales glandulares o ductales
Estómago	Epitelio foveolar
Intestino delgado y grueso	Epitelio de las criptas
Vesícula biliar	Epitelio columnar
Vejiga urinaria	Epitelio de transición
Útero	Epitelio escamoso y epitelio de las glándulas endometriales
Epidídimo	Células periductales de los túbulos
Riñón	Epitelio tubular (esporádica)

2.4.1.4. Expresión de la proteína 14-3-3 σ en tejidos neoplásicos humanos

Inicialmente, la pérdida de expresión del gen 14-3-3 σ fue detectada por primera vez en líneas celulares de carcinomas mamarios al comparar el ARN de las células tumorales con el de células sanas (Prasad *et al.*, 1992). Más tarde, mediante análisis de expresión génica, se observaron similares resultados, sin embargo, no se encontró ningún tipo de alteración/mutación genética en el locus del gen que pudiera explicar la menor expresión en dichas neoplasias (Nacht *et al.*, 1999). En lugar de ello, se asoció un elevado grado de metilación (hipermetilación) del ADN a dicha pérdida de expresión (Nacht *et al.*, 1999). Este tipo de mecanismo de silenciamiento de genes es de tipo epigenético y es el mecanismo más frecuentemente asociado al gen 14-3-3 σ y a su producto de transcripción en las neoplasias humanas (Hermeking, 2003; Zurita *et al.*, 2010).

El término epigenético hace referencia a la información que se transmite del genoma parental a la siguiente generación de células y que no proviene de una secuencia de DNA primaria. Los mecanismos epigenéticos son esenciales para la regulación de la expresión e integridad del genoma en las células normales (Bird, 2002; Li, 2002; Jaenisch y Bird, 2003). La información epigenética se transfiere en muchos casos a través de la metilación del

carbono 5 en el aminoácido citocina localizado en dinucleótinos CpG o, en otras palabras, por metilación del DNA. Los dinucleótidos CpG están poco representados en el genoma en general, pero existen regiones de entre 500 y 4000 pares de bases donde abundan los enlaces CpG, donde p se refiere a un enlace mediante fosfato, denominadas islas CpG. Las islas CpG se encuentran en las regiones promotoras de aproximadamente el 60% de los genes en mamíferos y generalmente se encuentran no metiladas en las células sanas (Bird, 2002; Takai y Jones, 2002).

Los patrones de metilación del ADN y de la estructura de la cromatina están profundamente alterados en las neoplasias e incluyen pérdida de áreas del genoma así como un aumento de la metilación del ADN. Una hipometilación generalizada ha demostrado causar inestabilidad genómica y, consecuentemente, posteriores alteraciones genéticas (Eden *et al.*, 2003; Gaudet *et al.*, 2003), mientras que las hipermetilaciones puntuales en regiones promotoras se han asociado con el silenciamiento/inactivación de la transcripción de algunos genes, entre ellos, y muy especialmente, el gen *14-3-3 σ* (Ferguson *et al.*, 2000; Iwata *et al.*, 2000; Herman y Baylin, 2003; Luo *et al.*, 2009; Zurita *et al.*, 2010).

La inactivación epigenética de genes supresores de tumores contribuye de manera significativa al desarrollo tumoral (Jones y Baylin, 2002). Los genes que, de manera aberrante, se hayan metilados en el cáncer humano se encuentran dentro de diferentes categorías, todos ellos involucrados en procesos celulares relevantes para la carcinogénesis como son la reparación de DNA (MGMT, MLH1, BRCA1), control del ciclo celular (inhibidores de las CDK, p15, p16, p27), apoptosis (APAF1, CASP8), invasión (CDH1, TIMP3) y la angiogénesis (THBS1, VHL). También, aproximadamente el 50% de los genes que causan formas familiares de cáncer presentan metilación asociada a determinados tipos de tumores espontáneos (Jones y Baylin, 2002).

El estudio del gen *14-3-3 σ* en el cáncer se ha realizado, en la gran mayoría de los casos, utilizando la técnica PCR específica para detectar metilación (MSP), encontrado que dicho gen se encuentra hipermetilado en un gran número de tumores, especialmente aquellos que afectan a mama, próstata y ovario. No obstante, la detección de ARNm o de la proteína se ha

realizado en menor medida. En la Tabla 4 se resumen los estudios realizados sobre la expresión del gen y la proteína 14-3-3 σ en las neoplasias humanas, así como la metodología empleada.

Actualmente, las publicaciones existentes, en la especie humana, sobre el papel del gen 14-3-3 σ y de su producto de transcripción permiten discernir tres líneas de pensamiento:

1) El gen 14-3-3 σ es un gen que se activa tras producirse un daño en el ADN, activación mediada por el gen *p53*. La transcripción y la producción de la proteína 14-3-3 σ permiten detener el ciclo celular y permitir que los mecanismos de reparación del ADN entren en marcha. Este hecho, junto al hallazgo de que se produce pérdida de esta proteína en diferentes tipos de neoplasias humanas, le confiere un papel como gen/proteína supresora de tumores (Chan *et al.*, 1999; Ferguson *et al.*, 2000).

2) La proteína 14-3-3 σ , que no se expresa, o lo hace a niveles bajos, en diferentes tipos de tejidos normales humanos, se neo-expresa/sobre-expresa en las neoplasias que se originan de dichos tejidos. En consecuencia, la proteína 14-3-3 σ podría comportarse como un oncogén (Guweidhi *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008; Ravi *et al.*, 2011; Shiba-Ishii *et al.*, 2011).

3) El hallazgo de que el gen/proteína 14-3-3 σ se encuentre disminuida o sobre-expresada en diferentes tipos de neoplasias, hace pensar que su papel como supresor de tumores, o por el contrario, como oncogén fuera tumor-específico (Osada *et al.*, 2002; Zhaomin *et al.*, 2009; Okumura *et al.*, 2010).

Tabla 4. Análisis de la expresión del gen y de la proteína 14-3-3σ en neoplasias humanas.

Órgano	Metilación*	Expresión**		Referencia
		ARNm	Proteína	
Mama	ND	<	ND	Prasad <i>et al.</i> , 1992
	Si	<	ND	Nacht <i>et al.</i> , 1999
	Si	<	ND	Ferguson <i>et al.</i> , 2000
	Si	ND	ND	Umbricht <i>et al.</i> , 2001
	ND	ND	<	Vercoutter-Edouart <i>et al.</i> , 2001
	ND	ND	<	Simpson <i>et al.</i> , 2004
	ND	ND	<	Simooka <i>et al.</i> , 2004
	ND	ND	=	Moreira <i>et al.</i> , 2005
	Si	ND	<	Mhawech <i>et al.</i> , 2005
	Si	ND	ND	Martinez-Galán <i>et al.</i> , 2008
	Si	ND	ND	Jerónimo <i>et al.</i> , 2008
	Si	ND	ND	Jing <i>et al.</i> , 2008
	Si	ND	ND	Luo <i>et al.</i> , 2009
	Si	ND	ND	Zurita <i>et al.</i> , 2010
Vulva	ND	=	=	Wang <i>et al.</i> , 2008
Cérvix	ND	ND	>	Sano <i>et al.</i> , 2004
Endometrio	Si	ND	>	Mhawech <i>et al.</i> , 2005
	No	ND	>	Nakayama <i>et al.</i> , 2005
Ovario	Si	ND	<	Mhawech <i>et al.</i> , 2005
	ND	ND	>	Ravi <i>et al.</i> , 2011
Próstata	Si	ND	<	Lodygin <i>et al.</i> , 2004
	Si	ND	<	Urano <i>et al.</i> , 2004
	ND	ND	<	Cheng <i>et al.</i> , 2004
	Si	ND	<	Mhawech <i>et al.</i> , 2005
Pulmón	DTH	< ó > DTH	< ó > DTH	Osada <i>et al.</i> , 2002
	DTH	ND	< ó > DTH	Yatabe <i>et al.</i> , 2002
	ND	ND	>	Nakajima <i>et al.</i> , 2003
	ND	>	>	Qi <i>et al.</i> , 2005
	ND	ND	>	Li <i>et al.</i> , 2009
	ND	ND	>	Xiao <i>et al.</i> , 2009
	ND	>	>	Shiba-Ishii <i>et al.</i> , 2011
Estómago	ND	ND	>	Mühlmann <i>et al.</i> , 2010
Colon	ND	>	>	Perathoner <i>et al.</i> , 2005
Pancreas	ND	>	>	Guweidhi <i>et al.</i> , 2004
	ND	>	>	Neupane <i>et al.</i> , 2008
	ND	ND	>	Sitek <i>et al.</i> , 2009
Hígado	Si	ND	<	Iwata <i>et al.</i> , 2000
Piel	Si	ND	≤	Lodygin <i>et al.</i> , 2003
Cabeza y cuello	Si	<	<	Gasco <i>et al.</i> , 2002a
	ND	ND	>	Snizek <i>et al.</i> , 2002
	ND	ND	>	Bhawal <i>et al.</i> , 2008
Glándula salival	DTH	< ó > DTH	< ó > DTH	Uchida <i>et al.</i> , 2004
Vejiga urinaria	ND	ND	<	Moreira <i>et al.</i> , 2004
	Si	ND	≤	Kunze <i>et al.</i> , 2006
	Si	ND	ND	Kunze <i>et al.</i> , 2007
	ND	ND	<	Kunze <i>et al.</i> , 2008
Riñón	=	=	=	Liang <i>et al.</i> , 2008

* En comparación con el análisis de metilación del ADN en tejido normal. ** En comparación con la expresión de la proteína en tejidos normales. DTH. Dependiendo del tipo histológico. ND. No determinado.

3.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA PROTEÍNA 14-3-3 σ EN TEJIDOS DE LA ESPECIE CANINA

En el presente estudio, para la estandarización de la técnica de detección inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ , se han tenido en cuenta los puntos de control recomendados recientemente por la Asociación Americana de Diagnóstico Laboratorial Veterinario (AAVLD) (Ramos-Vara et al., 2008) (Figura 13).

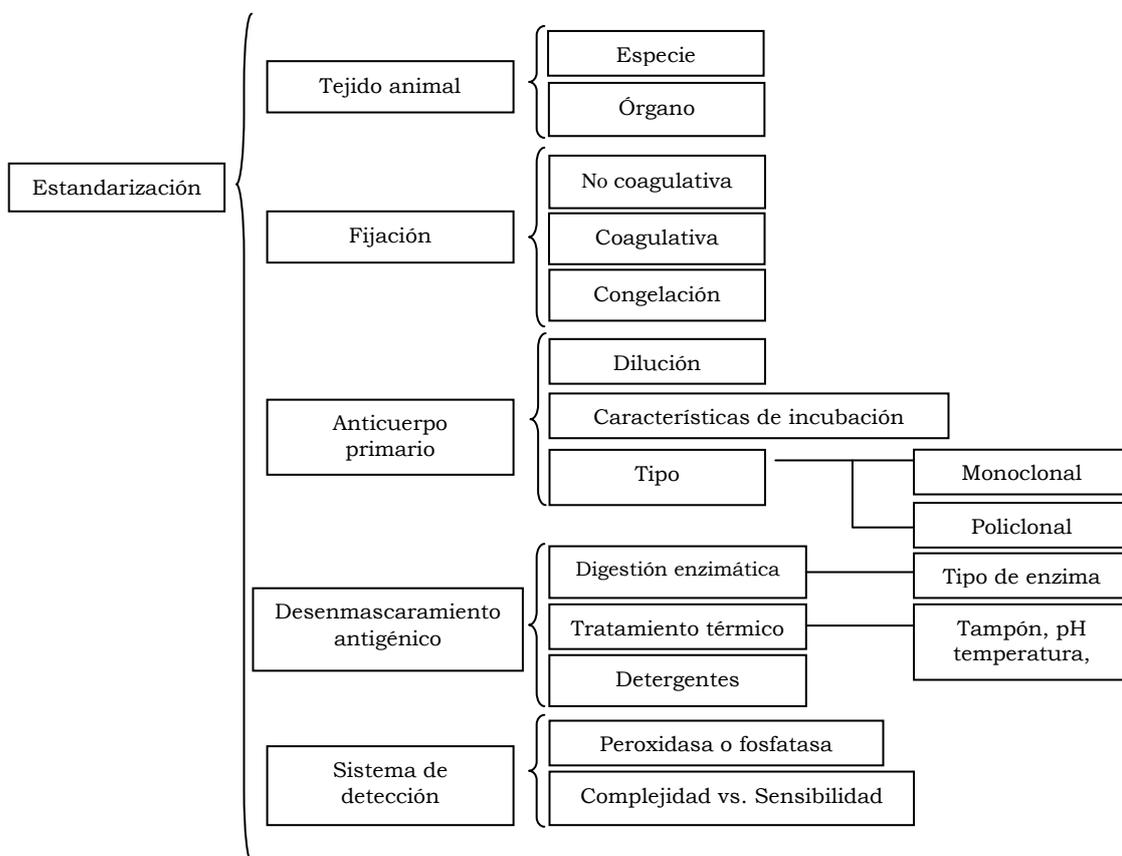


Figura 13. **Diagrama de estandarización de un nuevo test inmunohistoquímico** (Ramos-Vara et al., 2008).

3.1.1. ANTICUERPOS PRIMARIOS

Para la detección inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ en tejidos de la especie canina, se emplearon dos anticuerpos; un anticuerpo específico de tipo policlonal creado en cabra, dirigido frente a la porción N-terminal de la isoforma 14-3-3 σ (Clon N14; Santa Cruz Biotechnology inc., Santa Cruz,

EEUU) y un anticuerpo monoclonal específico creado en ratón (clon 5D7, Santa Cruz Biotechnology inc., Santa Cruz, EEUU). Ambos anticuerpos están diseñados para su uso en inmunohistoquímica, Western blot, inmunofluorescencia y ELISA. Se emplearon diferentes diluciones con el objeto de encontrar aquella que proporcionara la mejor intensidad de reacción.

3.1.2. PROCEDIMIENTO

Los pasos seguidos en la realización de la técnica se encuentran resumidos en la Tabla 5. Tras obtener cortes histológicos a 3 μ de grosor de cada una de las muestras, las secciones fueron recogidas con portaobjetos previamente impregnados con soluciones que favorecen la adherencia de los tejidos e impiden su desprendimiento durante la técnica IHQ. Las soluciones adherentes empleadas fueron Poli-L-Lisina (Sigma inc., St. Louis, EEUU), para muestras sometidas a digestión enzimática, y Vectabon (Vector inc., Burlingame, EEUU), para muestras sometidas a tratamiento térmico. Una vez adheridos los cortes a los portas, se dejaron secar en estufa durante 24 horas a 37°C para su completa adhesión antes de su tratamiento inmunohistoquímico.

Al estar incluidos en parafina, estas muestras requieren un proceso de desparafinado y posterior rehidratación, llevado a cabo mediante pases por xilol y alcoholes de diferente graduación. La inactivación de la peroxidasa endógena se llevó a cabo con una solución compuesta por peróxido de hidrógeno diluida en metanol al 3% durante 30 minutos. Dicha inactivación de la peroxidasa endógena se realizó entre los pases de alcohol absoluto. Los lavados entre los diferentes pasos se realizaron en agitación (Rotabit P Selecta), consiguiendo una limpieza más eficaz de los tejidos.

Para la detección de la proteína 14-3-3 σ mediante inmunohistoquímica se emplearon diferentes protocolos de desenmascaramiento antigénico con el objeto de identificar el que proporcionara una detección antigénica específica, sin artefactos y preservando correctamente el tejido en los cortes histológicos (Tablas 6). Las soluciones tampón empleadas y su preparación quedan reflejadas en las Tablas 7 a 12. En el presente estudio se utilizó suero normal

de conejo (Dako inc., Glostrup, Dinamarca) tanto para el anticuerpo monoclonal como para el policlonal. El suero normal, diluido al 10% en PBS, se aplicó a las muestras durante 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Tras la incubación con el suero normal se dispensaron los anticuerpos primarios (clon N14 y clon 5D7), diluidos a unas concentraciones de entre 1:50 y 1:100 y se incubaron durante 18 horas en nevera a 4°C. Tras este periodo, los cortes fueron retirados de la nevera y durante 1 hora se mantuvieron a temperatura ambiente para atemperar las muestras antes de dispensar el suero secundario. Los sueros secundarios empleados fueron un conejo anti-cabra (Vector inc., Burlingame, EEUU), a una dilución de 1:400, empleado para la incubación realizada con el clon N14, y conejo anti-ratón (Dako inc., Glostrup, Dinamarca), a una dilución de 1:20, empleado para la incubación realizada con el clon 5D7, diluidos en PBS con un 1% de suero normal de conejo. La preparación del reactivo terciario, complejo avidina-botina-peroxidasa (ABC) (Dako inc., Glostrup, Dinamarca), se realizó media hora antes de su uso y se aplicó en los cortes durante 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente. Antes del revelado, las muestras fueron bañadas por inmersión en una solución Tris Buffer Salino para establecer un correcto pH para el revelado.

Las preparaciones se sumergieron en una solución reveladora de diaminobencidina (Tabla 13) durante diferentes tiempos, desde 1 a 10 minutos, deteniendo la reacción de precipitado del cromógeno mediante la inmersión en agua corriente. Seguidamente las muestras se sometieron a 3 pases por agua corriente de 5 minutos para eliminar el exceso de revelado. A continuación, se contratiñeron con hematoxilina de Harris durante 1 minuto y se eliminó el exceso de hematoxilina sumergiendo las muestras en agua corriente durante 15 minutos. Finalmente, las preparaciones fueron deshidratadas y montadas con DPX (medio de montaje con Tolueno, Xileno y Di-n-Butilo Ftalato, Panreac, Química S.A., Barcelona, España).

Tabla 5. Procedimiento inmunohistoquímico llevado a cabo.

PROTOCOLO DE LA TÉCNICA IHQ PARA CORTES EN PARAFINA	
Día 1	
Tres pases por xilol de 10, 5 y 5 minutos.	
Un pase por alcohol de 100° de 5 minutos.	
Inhibición de la peroxidasa endógena.	
Un pase por alcohol de 100° de 5 minutos.	
Un pase por alcohol de 96° de 5 minutos.	
Un pase por alcohol de 70° de 5 minutos.	
Dos pases por agua destilada de 5 minutos.	
Un pase por PBS de 10 minutos.	
Desenmascaramiento antigénico.	
Tres lavados en PBS de 5 minutos.	
Aplicación del suero normal al 10% en PBS durante 30 minutos a T ^a ambiente.	
Aplicación del suero primario durante 18 horas a 4°C.	
Día 2:	
Tres lavados en PBS de 5 minutos.	
Aplicación del suero secundario durante 30 minutos a T ^a ambiente.	
Tres lavados en PBS de 5 minutos.	
Aplicación del complejo SBP durante 1 hora en oscuridad a T ^a ambiente.	
Tres lavados en PBS de 5 minutos.	
Un lavado en TRIS de 10 minutos.	
Revelado.	
Lavado y montaje.	

Tabla 6. Tipos de desenmascaramiento testados en el presente estudio.

DESENMASCARAMIENTO ANTIGÉNICO	
Tratamiento térmico	Digestión enzimática
Citrato, pH 6,2, 95°C, 5 minutos	Pronasa, RT, 5 minutos
Citrato, pH 6,2, 95°C, 10 minutos	Pronasa, RT, 10 minutos
Citrato, pH 6,2, 95°C, 15 minutos	Pronasa, 37°C, 5 minutos
Citrato, pH 6,2, 95°C, 25 minutos	Pronasa, 37°C, 10 minutos
Citrato, pH 6,2, 95°C (olla presión), 3 minutos	
EDTA, pH 8.00, 10 y 20 minutos	

Tabla 7. Solución para el desenmascaramiento mediante digestión enzimática.

PRONASA	
0,01 g en 10 ml de solución PBS	

TAMPÓN CITRATO PARA EL TRATAMIENTO TÉRMICO PH 6,2	
Solución A:	990 ml de H ₂ O destilada
Solución B	100 ml de H ₂ O destilada + 2,94 g de Citrato sódico
Solución C	50 ml de H ₂ O destilada+ 1,05 g de Ácido cítrico
De las disoluciones anteriores se toman	
Toda la solución A	
82 ml de la solución B	
18 ml de solución C	

Tabla 8. Solución para el desenmascaramiento mediante calor.

Tabla 9. Solución para el desenmascaramiento mediante calor.

TAMPÓN EDTA PARA EL TRATAMIENTO TÉRMICO PH 8	
0,74 g en dos litros de H ₂ O destilada	

Tabla 10. Solución tampón de lavado.

TAMPÓN FOSFATO SALINO PBS PH 7.3	
2.96 gr de Na ₂ HPO ₄ (Fosfato sódico dibásico anhidro)	
0.86 gr de KH ₂ PO ₄ (Fosfato potásico monobásico anhidro)	
14.4 gr de ClNa (Cloruro sódico)	
Añadir 2 litros de H ₂ O destilada	

Tabla 11. Solución tampón para la solución reveladora.

TRIS (SOLUCIÓN MADRE) pH (7.6)	
60,57 gr de Tris (Trizma BASE) en 500 ml de agua destilada	
Añadir 350-400 ml de HCl 1N hasta conseguir un pH de 7.6	

Tabla 12. Solución tampón para la solución reveladora.

SOLUCIÓN SALINA (0.85%) pH (7.6)	
1000 ml de Agua destilada	
8,5 gr de NaCl	

Tabla 13. Preparación de la solución reveladora de diaminobenzidina.

REVELADO CON 3,3' DIAMINOENZIDINA	
Solución A	
Para 200 ml de TRIS (180ml de solución salina + 20 ml de TRIS MADRE)	
0,07 g de Diaminobenzidina (DAB)	
Solución B	
Justo antes de introducir las preparaciones añadiremos 2 ml de la solución B en la solución A.	
Revelado 1 minuto.	
Agua corriente 10 minutos.	
Tinción y Deshidratación.	
Hematoxilina de Harris 30 segundos.	
Agua corriente 10 minutos.	
Deshidratar: 2 baños de alcohol de 96°, 2 de alcohol 100°, 3 de baños de xilol, 2 minutos cada uno.	

3.1.3. EVALUACIÓN DE LAS PREPARACIONES Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En nuestro estudio, se consideró positiva la presencia de inmunoprecipitados de color marrón distribuidos homogéneamente en el citoplasma y/o núcleo celular. Cuando la reacción fue citoplasmática, la intensidad de tinción se valoró como -, -/+, +, ++ y +++ (Tabla 14):

Tabla 14. Clasificación de la expresión de la proteína 14-3-3 σ en tejidos normales.

VALORACIÓN DE LA INMUNOTINCIÓN	
-	si no hubo reacción
-/+	reacción en células aisladas y de débil intensidad
+	si la intensidad de reacción fue débil
++	si la intensidad de reacción fue moderada
+++	si la intensidad de reacción fue fuerte

Cualquier tipo de inmunoprecipitado de color marrón a nivel nuclear se consideró como un resultado positivo (+), siendo considerada la ausencia de reacción como un resultado negativo (-).

La expresión de la proteína 14-3-3 σ en tejidos neoplásicos se valoró semicuantitativamente, mediante la estimación del porcentaje de células positivas en toda la preparación a 200 aumentos, puntuándose de la siguiente manera: 1 (<5%), 2 (5–25%), 3 (25–50%) y 4 (>50%). La intensidad de tinción se evaluó según la siguiente escala: 0 (negativo), + (débil=1), ++ (moderado=2), +++ (intenso=3). Finalmente se obtuvo un valor total para cada preparación, de 0 a 12, mediante la multiplicación de los parámetros anteriores.

Para analizar posibles diferencias y asociaciones estadísticamente significativas entre el número e intensidad de las células inmunomarcadas y con las características de las neoplasias estudiadas, se empleó el test no paramétrico de Mann–Whitney, considerándose que hubo significación estadística cuando $P \leq 0.05$. Los test estadísticos fueron llevados a cabo por el Departamento de Estadística de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Dr. Negrín de Las Palmas de Gran Canaria. El software estadístico utilizado fue el programa SPSS versión 12.0, SPSS Inc.

3.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE DETECCIÓN MEDIANTE WESTERN BLOT DE LA PROTEÍNA 14-3-3 σ EN TEJIDOS DE LA ESPECIE CANINA

Los Western blots realizados en el presente trabajo se llevaron a cabo en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria.

3.2.1. ANTICUERPOS PRIMARIOS

Para la detección de la proteína 14-3-3 σ en tejidos caninos mediante Western blot se emplearon los mismos anticuerpos que en los test inmunohistoquímicos.

3.2.2. EXTRACCIÓN TOTAL DE PROTEÍNA

Para la realización de la técnica, las muestras de tejido fueron descongeladas e, inmediatamente después, se homogeneizaron con un émbolo de teflón (Ultra Turrax®, Rose Scientific Ltd, Edmonton, Canadá) en tampón frío a pH 7.4, que contenía Tris-HCl 0.01 M, NaCl 0.02 M, EDTA 0.025 M y un cóctel de inhibidores de proteasas. A continuación, se sometieron a sonicación durante 10 segundos y se centrifugaron a una velocidad de 15.000 g durante 15 minutos a 4°C (Fig. 14). Las proteínas de los sobrenadantes correspondientes a los extractos totales se cuantificaron y se mantuvieron a 4°C para la realización de la electroforesis de proteínas (Fig. 14). El material no utilizado se almacenó a -20°C para la realización de estudios posteriores.

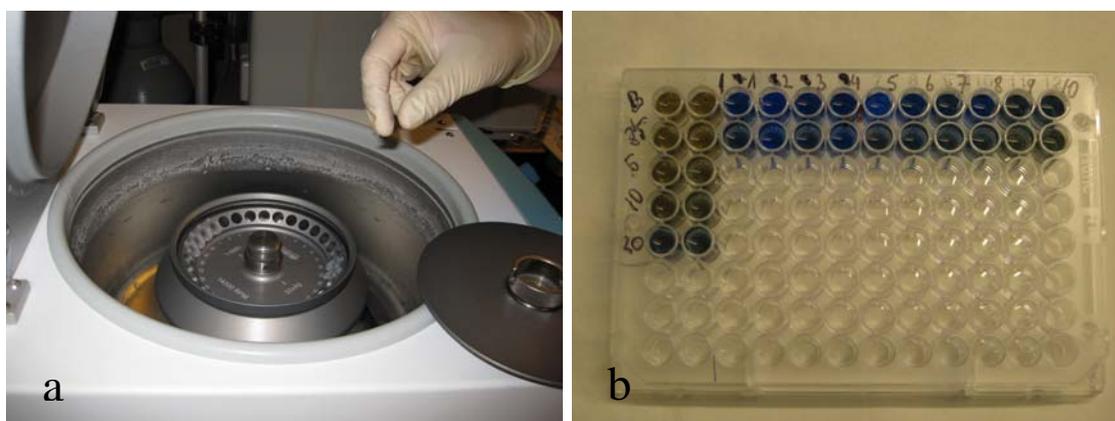


Figura 14. **Metodología para la realización del Western blot.** a) Centrifugación a 15000 g a 4° C para la obtención de los sobrenadantes proteicos. b) Cuantificación de las proteínas obtenidas de los sobrenadantes.

3.2.3. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE) Y WESTERN BLOT

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia del detergente SDS es el sistema más común para separar proteínas en función del peso molecular (Laemmli, 1970). Los extractos proteicos obtenidos, según lo expuesto anteriormente, se resolvieron electroforéticamente en geles de poliacrilamida y en presencia de SDS con un rango de porcentaje de reticulación entre un 10% y un 12.5% (proporción acrilamida: bisacrilamida 30:1).

Para realizar estas electroforesis se utilizó el sistema Miniprotean III (Bio-Rad Laboratorios, Reino Unido), a un potencial constante de 150V (Fig. 15). Tras la electroforesis, se visualizaron las proteínas tiñendo los geles con azul de Coomassie, que reacciona con ciertos aminoácidos polares. Esta tinción permitió comprobar el rendimiento proteico y la resolución electroforética cuando fue requerido para determinar los análisis experimentales.

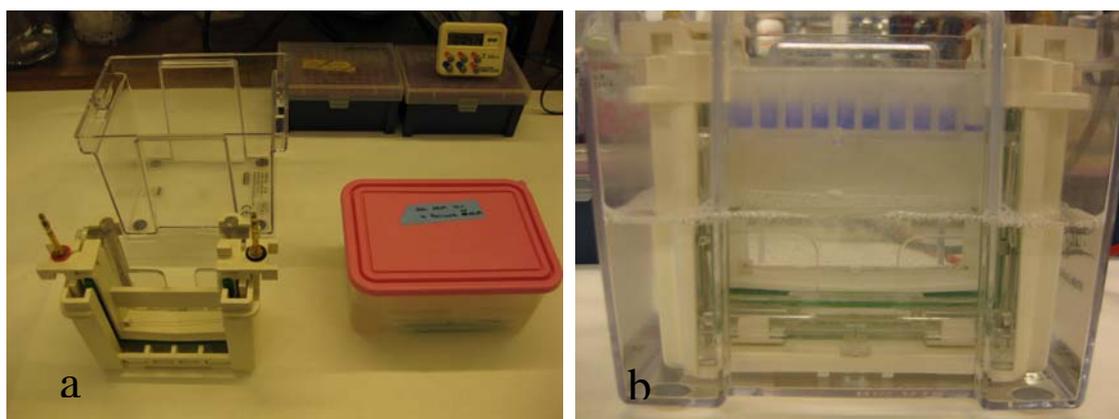


Figura 15. **Metodología para la realización del Western blot.** a. Cubeta de electroforesis y geles de poliacrilamida necesarios para la electroforesis de proteínas. b. Los extractos de proteína se desplazan merced a su carga eléctrica.

La técnica de *Western blot* permite detectar una proteína concreta en una mezcla proteica (Harlow & Lane, 1998). Para realizar esta técnica, las proteínas separadas electroforéticamente se transfirieron a membranas de polivinilo (PVDF) (Hybond-P, Amersham Biosciences, Reino Unido) utilizando el sistema Mini-Trans Blot (Bio-Rad Laboratorios, Reino Unido), a un voltaje que osciló de 200 a 250 mA durante 90 minutos a 4°C (Fig. 16).

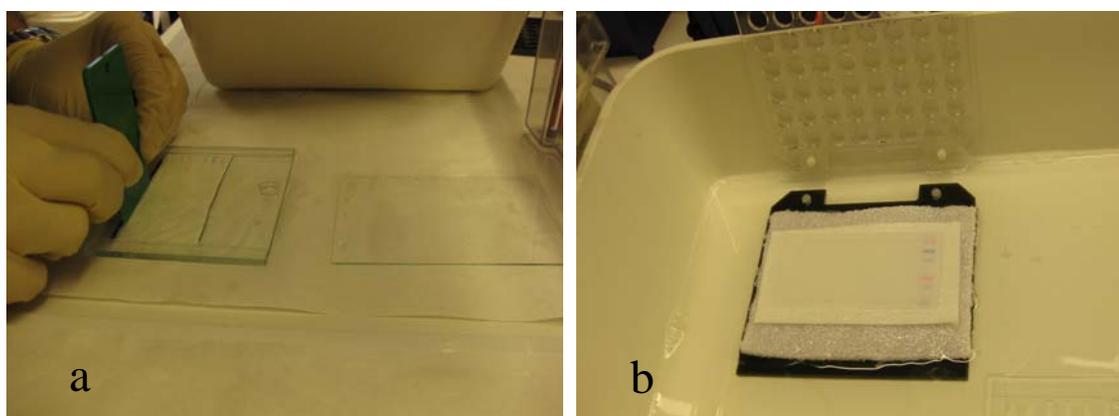


Figura 16. **Metodología para la realización del Western blot.** a) Sección del gel de poliacrilamida. b) Gel de poliacrilamida en contacto con la membrana de polivinilo para proceder a la transferencia

Para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos, las membranas de PVDF se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución que contiene 5% de leche desnatada disuelta en PBS (BLOTTO, *Bovine Lacto Transfer Technique Optimizer*) y, a continuación, se incubaron durante 18 horas a 4°C con los anticuerpos primarios (N14 y 5D7) en disolución 1:200 con PBS.

A continuación, se realizaron tres lavados de 5 minutos a temperatura ambiente en tampón de lavado que contenía PBS y 0.1% del detergente Tween-20 (Neolab inc. José de Amenábar, Argentina) (PBST), para eliminar el exceso de anticuerpo primario en la membrana. Para identificar las bandas específicas correspondientes a la unión del anticuerpo primario, las membranas se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario, anti-ratón (para el clon 5D7) o anti-cabra (para el clon N14), acoplados a peroxidasa de rábano, diluidos a 1:10000 en BLOTTO. Posteriormente, se realizaron tres lavados de las membranas de 5 minutos a temperatura ambiente en PBST.

Las bandas inmunorreactivas se visualizaron mediante la quimioluminiscencia obtenida por la reacción enzimática de la peroxidasa con el luminol, un compuesto que emite luz al oxidarse (ImmunoStar™Western™, Biorad inc., Amersham, Reino Unido) (Fig. 17). Las señales específicas correspondientes a las proteínas reconocidas por los anticuerpos se revelaron por la exposición de una película fotosensible en contacto con la membrana quimioluminiscente. Dicha quimioluminiscencia fue captada y fotografiada con un luminómetro (Biorad inc., Amersham, Reino Unido) (Fig. 17).



Figura 17. **Metodología para la realización del Western blot.** a) Reactivo terciario para provocar quimioluminiscencia. b) Detector de quimioluminiscencia.

3.3. TÉCNICA DE DOBLE INMUNOTINCIÓN PARA LA DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS 14-3-3 σ y p63 EN TEJIDOS DE LA ESPECIE CANINA

Para estudiar la co-expresión de las proteínas 14-3-3 σ y p63 se empleó un kit de visualización EnVision™ de segunda generación (Dako inc., Glostrup, Dinamarca). El kit EnVision™ G|2 Doublestain System es útil para la detección simultánea de dos antígenos presentes en concentraciones bajas en una sola muestra de tejido. La visualización está basada en la peroxidasa (HRP) empleando diaminobencidina (DAB) como cromógeno y en la fosfatasa alcalina (AP) con Permanent Red como cromógeno. Este sistema no utiliza la biotina, por lo que se reduce significativamente la tinción inespecífica derivada de la actividad endógena de la avidina-biotina.

3.3.1. PROTOCOLO DE TINCIÓN

Las preparaciones fueron desparafinadas e hidratadas previamente a la realización del tratamiento de desenmascaramiento antigénico que consistió en sumergir las preparaciones en un baño de citrato a pH 6, durante 20 minutos. A continuación, se atemperaron las preparaciones como paso previo a dispensar los diferentes reactivos del kit de doble inmunotinción. Los pasos de este kit se relacionan y explican a continuación:

Paso 1: Bloqueo enzimático endógeno doble

Se eliminó el exceso de PBS y se limpiaron los bordes de cada preparación para, a continuación, dispensar entre 100 y 150 μ l de solución de bloqueo enzimático endógeno doble. El tiempo de incubación fue de 5 minutos. Seguidamente se realizaron 3 pases de PBS de 5 minutos.

Paso 2: Incubación del anticuerpo primario n° 1

El anticuerpo primario que se incubó en primer lugar fue el anti-proteína 14-3-3 σ (clon 5D7, 1:50). Se eliminó el exceso de PBS y se dispensó una cantidad adecuada de anticuerpo para la extensión de cada tejido. El tiempo de incubación fue de 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Paso 3: Polímero/HRP

Tras realizar 3 pases de PBS de 5 minutos cada uno, se eliminó el exceso de tampón de lavado y se limpiaron los bordes de las muestras, para dispensar entre 100 y 150 μ l de polímero/HRP. El tiempo de incubación fue de 10 (\pm 1) minutos. Tras la incubación se lavaron las muestras en 3 pases de PBS de 5 minutos.

Paso 4: Preparación de la DAB+ Solución de trabajo

Para preparar la DAB+ Working Solution (primer cromógeno) se mezclaron 1 ml de DAB+ Substrate Buffer con 1 gota (25-30 μ l aprox.) de DAB+ Chromogen. Una alícuota de 1 ml fue suficiente para cubrir adecuadamente el tejido de 10 muestras. Aunque la solución DAB+ Working Solution es estable durante aproximadamente 5 días si se almacena a una temperatura de 2–8 °C, en todos los ensayos de este estudio se utilizó DAB+ Working Solution recién preparada.

Paso 5: DAB+ Solución de trabajo

Tras eliminar el exceso de PBS de los portaobjetos se dispensó entre 100 y 150 μ l de DAB+ solución de trabajo por preparación y se reveló durante 10 (\pm 1) minutos. Los restos de cromógeno se recogieron en un recipiente adecuado para su posterior tratamiento como residuo. A continuación, las muestras se lavaron en 3 pases de PBS de 5 minutos.

Paso 6: Solución inhibidora

Una vez eliminado el exceso de PBS y limpiados los bordes, se aplicó entre 100 y 150 μ l de la solución inhibidora a cada muestra y se incubó durante 3 (\pm 1) minutos. Seguidamente las muestras se lavaron en 3 pases de PBS de 5 minutos.

Paso 7: Anticuerpo primario n° 2

El segundo anticuerpo primario, el anti-proteína p63 (clon 4A4, 1:50), se dispensó de igual manera que en el paso 2, con un tiempo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Tras la incubación las muestras se lavaron en 3 pases de PBS de 5 minutos.

Paso 8: Conejo/ratón (LINK)

Eliminado el exceso de tampón y limpiados los portaobjetos, se aplicó entre 100 y 150 μ l de Rabbit/Mouse (LINK). El tiempo de incubación fue de 10 (\pm 1) minutos. Seguidamente las muestras se lavaron en 3 pases de PBS de 5 minutos.

Paso 9: Polímero/AP

Como en el paso anterior, se eliminó el exceso de tampón de lavado y se limpiaron los portaobjetos, aplicando seguidamente entre 100 y 150 μ l de Polymer/AP. El tiempo de incubación fue de 10 (\pm 1) minutos, seguidos de 3 lavados de PBS de 5 minutos.

Paso 10: Preparación de la solución de trabajo rojo permanente

El segundo cromógeno se preparó mezclando 100 partes de Permanent Red Substrate Buffer con 1 parte de Permanent Red Chromogen. Esta solución se degrada con rapidez y debe de ser utilizada en los 30 minutos siguientes a su preparación.

Paso 11: Solución de trabajo rojo permanente

Una vez eliminado el exceso de PBS, se dispensó el segundo cromógeno y se dejó actuar durante 15 minutos. Los restos de cromógeno se recogieron en un recipiente adecuado para su posterior tratamiento como residuo. A continuación, las muestras se lavaron en 3 lavados de agua destilada de 5 minutos.

Paso 12: Contratinción

Se sumergieron los portaobjetos en un baño de hematoxilina de Mayer (Dako inc., Glostrup, Dinamarca) durante 5 minutos. Para obtener un color azul de mayor calidad, las muestras se sumergieron en un baño de 37 mmol/l de agua amoniacal en 10 pases, enjuagándolos inmediatamente en agua destilada durante 8 minutos. El agua amoniacal (37 mmol/l) se preparó mezclando 2,5 ml de 15 mol/l de hidróxido de amonio (concentrado) con 1 litro de agua destilada.

Paso 13: Montaje

Las preparaciones se montaron usando un medio acuoso (Dako Glycergel™ Mounting Medium, Dako inc., Glostrup, Dinamarca).

3.3.2. EVALUACIÓN DE LAS PREPARACIONES

Las preparaciones se valoraron de manera positiva cuando se observaron a nivel celular inmunoprecipitados de color marrón en el citoplasma (14-3-3 σ) o de color rojo en el núcleo (p63).

3.4. TEJIDOS EMPLEADOS EN EL ESTUDIO

3.4.1. TEJIDOS CONTROL

Para estandarizar la técnica inmunohistoquímica de detección de la proteína 14-3-3 σ en tejidos caninos se utilizaron muestras de tejido humano fijadas durante 24-48 horas en formol tamponado al 10% e incluidas en parafina.

Controles positivos.- Los cortes de tejido de piel humana, glándula mamaria humana y carcinoma de células escamosas broncogénico humano, cedidos por los Servicios de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Insular de Las Palmas de Gran Canaria, Hospital Materno Infantil de Gran Canaria y del Hospital Universitario Insular de Tenerife, respectivamente, se incubaron con los anticuerpos anti-proteína 14-3-3 σ . Los parámetros evaluados fueron los siguientes:

a) El funcionamiento de las técnicas desarrolladas en las muestras de piel, glándula mamaria y carcinoma de células escamosas broncogénico ya que estas muestras contienen los antígenos frente a los que se desarrollaron los anticuerpos a ensayar (control positivo técnico) (Osada et al., 2002, Nakajima et al., 2003; Qi et al., 2005; Shiba-Ishii et al., 2011).

b) La dilución óptima de los anticuerpos utilizados en las muestras de piel canina.

c) El tratamiento de desenmascaramiento antigénico idóneo en las muestras de piel canina.

Controles negativos.- Los cortes de tejido de piel humana, glándula mamaria humana y carcinoma de células escamosas broncogénico humana no se incubaron con los anticuerpos específicos sino con suero normal de conejo y tampón fosfato (PBS) 0'01 M a pH 7'2. Los parámetros evaluados fueron los siguientes:

a) La presencia o ausencia de reacción del suero normal de conejo con los tejidos objeto de estudio.

b) La presencia o ausencia de reacciones no deseadas de los productos utilizados para colorear la reacción antígeno-anticuerpo con los tejidos objeto de estudio (en los cortes incubados con PBS).

3.4.2. TEJIDOS NORMALES CANINOS

Los tejidos caninos normales usados en la detección inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ se obtuvieron del archivo de necropsias del Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico Veterinario del Departamento de Morfología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Se seleccionaron 4 casos (2 machos y 2 hembras) de animales fallecidos por causas no oncológicas y que habían sido remitidos a dicho servicio para la realización de su necropsia y posterior estudio histopatológico.

Las muestras incluidas en el estudio inmunohistoquímico fueron: piel, lengua, cavidad oral, tonsilas, glándula salival, tráquea, pulmón, esófago, estómago, duodeno, yeyuno, íleon, colon, recto, páncreas, hígado, vesícula biliar, riñón, uréter, vejiga urinaria, uretra, glándula adrenal, hipófisis, tiroides, paratiroides, testículo, epidídimo, próstata, ovario, útero, vagina,

glándula mamaria, bazo, nódulo linfático, cerebro, cerebelo, médula espinal y músculos estriados esquelético y cardíaco.

Para la realización de la técnica de Western blot se obtuvieron muestras frescas de tejidos de un perro macho sacrificado por motivos humanitarios en el Albergue Insular de Animales de Bañaderos y que fueron inmediatamente conservadas a -80°C . Las muestras incluidas fueron: piel, glándula salival, esófago, hígado, riñón, vejiga urinaria, glándula mamaria, nódulo linfático y cerebro.

3.4.3. TEJIDOS NEOPLÁSICOS MAMARIOS CANINOS

Para analizar inmunohistoquímicamente la localización y distribución de la proteína 14-3-3 σ en tejido mamarios caninos normales, displásicos y neoplásicos, se seleccionaron 82 muestras de tejidos mamarios caninos del archivo de biopsias del Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico Veterinario del Departamento de Morfología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria que incluían 4 mamas normales, 16 neoplasias benignas y 62 neoplasias malignas que habían sido extirpadas quirúrgicamente al mismo número de perras. Además, adyacente a las lesiones neoplásicas se encontraron áreas de tejido mamario sano y displásico en 49 y 23 de las muestras, respectivamente. En 19 de los casos se incluía el linfonodo regional para su evaluación y, por último, en un caso se pudo analizar el bazo con metástasis.

Las neoplasias mamarias incluidas en el presente estudio fueron evaluadas por tres observadores siguiendo la “Clasificación Histológica de los Tumores de Mama de la Perra y la Gata” de la Organización Mundial de la Salud (Misdorp et al., 1999) y se distribuyeron según se refleja en la Tabla 15.

Tabla 15. Clasificación de las lesiones mamarias de la perra en donde se señala el número y tipo histológico de los casos incluidos en el presente estudio (Misdorp, 1999).

1. NEOPLASIAS MALIGNAS	2. NEOPLASIAS BENIGNAS
1.1. Carcinoma no infiltrante ("in situ") (n=2)	2.1. Adenoma 2.1.1. Adenoma simple (n=6) 2.1.2. Adenoma complejo (n=6) 2.1.3. Adenoma basaloide (n=0)
1.2. Carcinoma complejo (n=15)	2.2. Fibroadenoma (n=4)
1.3. Carcinoma simple 1.3.1. Carcinoma túbulo-papilar (n=18) 1.3.2. Carcinoma sólido (n=15) 1.3.3. Carcinoma anaplásico (n=1)	2.3. Tumor mixto benigno (n=0)
1.4. Carcinoma de tipos especiales 1.4.1. Carcinoma de células fusiformes (n=0) 1.4.2. Carcinoma de células escamosas (n=0) 1.4.3. Carcinoma mucinoso (n=0) 1.4.4. Carcinoma rico en lípidos (n=3)	2.4. Papiloma ductal (n=0)
1.5. Sarcomas. 1.5.1. Fibrosarcoma (n=0) 1.5.2. Osteosarcoma (n=0) 1.5.3. Otros sarcomas (n=0)	
1.6. Carcinosarcomas (n=2)	
1.7. Carcinoma o sarcoma en tumor benigno (n=8)	
3. TUMORES NO CLASIFICADOS	
4. HIPERPLASIA MAMARIA/DISPLASIAS	
4.1. Hiperplasia ductal (n=0)	
4.2. Hiperplasia lobular 4.2.1. Hiperplasia epitelial (n=4) 4.2.2. Adenosis (n=19)	
4.3. Quística (n=0)	
4.4. Ectasia ductal (n=1)	
4.5. Fibrosis focal (fibroesclerosis) (n=0)	

Además de las muestras para el diagnóstico histopatológico e inmunohistoquímico, en 12 casos se obtuvo tejido fresco tanto tumoral como del nódulo linfático regional que se conservó a -80°C inmediatamente tras la cirugía, para su análisis mediante Western blot (Fig. 18).

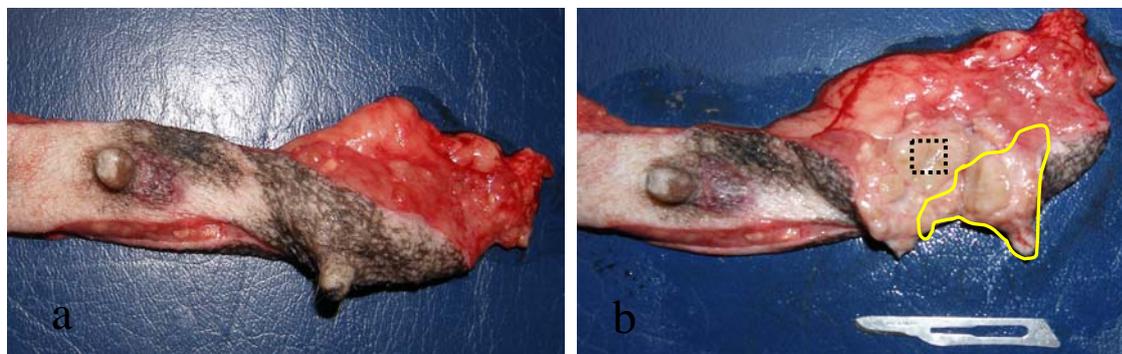


Figura 18. **Imágenes representativas de la toma de muestra para western blot.** a) Pieza de mastectomía regional recién escisionada b) En la imagen se observa una lesión nodular, seccionada sagitalmente, bien delimitada sobre la que se ha marcado (cuadro de puntos) la zona de obtención de la muestra para western blot. La sección contraria (figura amarilla) se empleó para el diagnóstico anatomopatológico y análisis inmunohistoquímico.

3.4.3.1. Características microscópicas analizadas de las neoplasias incluidas en el estudio

Las características microscópicas analizadas en las **neoplasias de tipo histológico maligno (n=82)** fueron las siguientes: 1) el grado histológico de malignidad; 2) la presencia de áreas de necrosis isquémica; 3) la presencia de infiltrado linfocitario; 4) la presencia de émbolos de células neoplásicas en vasos sanguíneos o linfáticos y 5) la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos regionales.

Estudio microscópico

El estudio microscópico se realizó en cortes de tejido de 3-4 micrómetros de grosor teñidos con la técnica histoquímica de la Hematoxilina-eosina. Los criterios utilizados para evaluar las distintas características microscópicas de los tumores fueron los propuestos por Misdorp (2002):

- a) Tipo histológico: se determinó siguiendo los criterios de la "Clasificación Histológica de los Tumores de Mama de la Perra y la Gata" de la

Organización Mundial de la Salud (Misdorp et al., 1999).

b) Grado histológico de malignidad: se determinó siguiendo los criterios de Lagadic y Estrada (1990), que distinguen tres grados histológicos de malignidad (creciente) (I, II, III), y cuya determinación se basa en tres criterios (Tabla 16):

1. Formación de túbulos con mayor o menor frecuencia.
2. Grado de atipia de las células epiteliales.
3. Número de mitosis

Tabla 16. Criterios para la determinación del grado histológico de malignidad de los tumores de la mama canina

FORMACIÓN DE TÚBULOS	ATIPIA	MITOSIS (N° EN 10 CAMPOS DE 40X)
Siempre: 1 punto	Ligera: 1 punto	0-4 puntos: 1 punto
Ocasional: 2 puntos	Moderada: 2 puntos	5-9 mitosis: 2 puntos
Raramente: 3 puntos	Intensa: 3 puntos	> 10 mitosis: 3 puntos

Sumando los puntos que corresponden a cada parámetro, se obtiene la gradación del tumor:

GRADO I: de 3 a 5 puntos.

GRADO II: 6 ó 7 puntos.

GRADO III: 8 ó 9 puntos.

c) Áreas de necrosis isquémica: áreas de material eosinófilo y homogéneo, con o sin imagen en sombra de alguna estructura identificable (túbulos, masas sólidas u otras), y con partículas basófilas de distintas formas y tamaños en su seno.

d) Infiltrado linfocitario: presencia de linfocitos en grupos alrededor y/o en el interior de los focos de crecimiento neoplásico.

e) Émbolos de células neoplásicas en vasos linfáticos y/o sanguíneos: células en grupos en la luz de estructuras con una capa de endotelio claramente identificable y localizadas en la periferia de los tumores (vasos linfáticos) o en la luz de estructuras con una capa de endotelio y una capa muscular lisa (continua o discontinua) claramente identificables y localizadas en la periferia y/o en el interior de los tumores (vasos sanguíneos arteriales o venosos).

f) Metástasis en ganglios linfáticos regionales y órganos a distancia: mediante la identificación de émbolos de células neoplásicas en los senos ganglionares y/o de focos de células neoplásicas en el espesor del ganglio.

4.1. LOCALIZACIÓN Y DISTRIBUCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA PROTEÍNA 14-3-3 σ EN TEJIDOS NORMALES DE LA ESPECIE CANINA

4.1.1. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA 14-3-3 σ EN TEJIDOS CONTROL

La incubación con los anticuerpos anti-proteína 14-3-3 σ , clon N14 (anticuerpo policlonal creado en cabra) y clon 5D7 (anticuerpo monoclonal creado en ratón), fueron capaces de producir inmunoprecipitado específico en los tejidos control y problema utilizados, cuando se sometieron a un proceso de desenmascaramiento antigénico consistente en el tratamiento térmico de las preparaciones histológicas mediante inmersión en una solución de citrato a pH 6, en olla sin presión durante 20 minutos. También se obtuvieron resultados positivos cuando se utilizó la inmersión en citrato a pH 6 durante 3 minutos en olla a presión. No obstante, este último tratamiento de desenmascaramiento antigénico, aunque produjo resultados valorables, provocó, en un mayor número de ocasiones, el desprendimiento de los tejidos. El resto de variaciones en el método de desenmascaramiento antigénico no produjo resultados satisfactorios en la técnica inmunohistoquímica.

Las secciones de piel, glándula mamaria y carcinoma de células escamosas broncogénico humanos, usadas como control positivo técnico, es decir, tejidos de los que se conoce que expresan la proteína 14-3-3 σ , mostraron un inmunoprecipitado en diferentes tipos celulares.

En la piel humana se observó intensa inmunotinción en las células epiteliales de la epidermis y del folículo piloso. A nivel de las glándulas sebáceas se observó intensa positividad a nivel de las células basales mientras que los sebocitos mostraron débil/moderada inmunotinción. Las glándulas sudoríparas apocrinas mostraron moderada positividad a nivel de las células epiteliales siendo las células mioepiteliales negativas (Fig. 19).

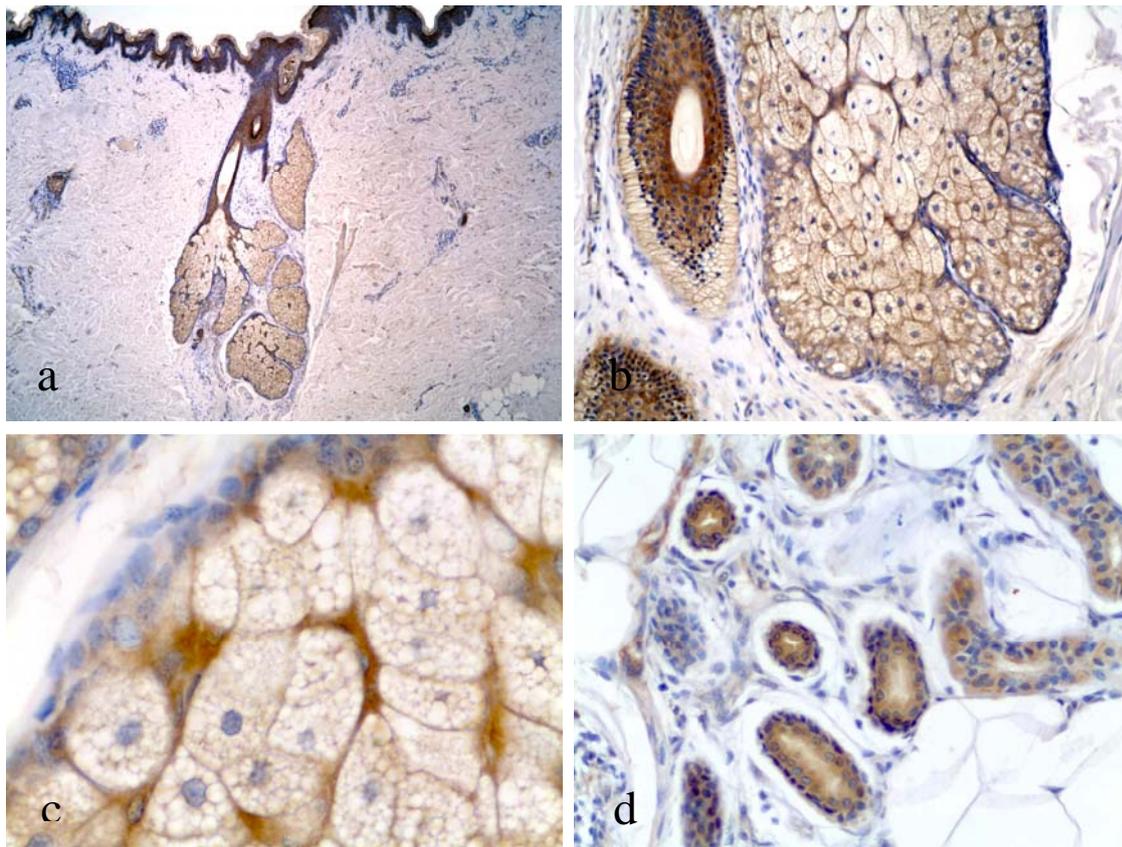


Figura 19. **Expresión inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ en piel humana.** a) Imagen a pocos aumentos en la que se observa intensa reacción a nivel de epidermis y complejo pilosebáceo. 4x. Clon N14. b) Intensa reacción a nivel de las vainas foliculares del pelo y moderada reacción de sebocitos. 10x. Clon N14. c) Intensa reacción a nivel de las células de reserva de la glándula sebácea. 40x. Clon N14. d) Moderada reacción a nivel de las células epiteliales luminales de las glándulas sudoríparas apocrinas. 40x. Clon N14. IHQ.

En la glándula mamaria humana se observó expresión de la proteína a nivel de las células mioepiteliales que rodeaban los acinos mamarios, mientras que las células epiteliales luminales fueron negativas (Fig. 20a).

Las secciones de carcinoma de células escamosas broncogénico humano presentaron intensa inmunotinción en las células epiteliales neoplásicas (Fig. 20b). No se observaron diferencias de inmunotinción entre los anticuerpos N14 y 5D7 en los controles utilizados.

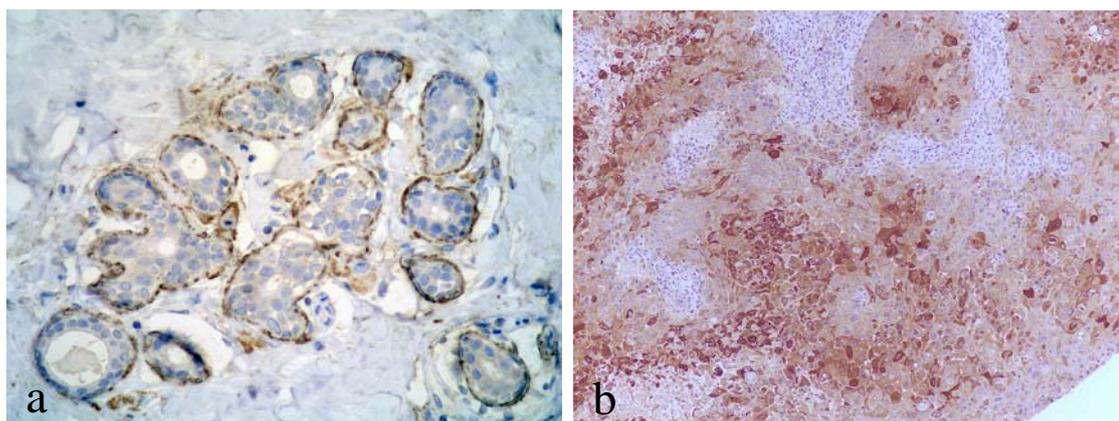


Figura 20. **Expresión inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ en tejidos normal y neoplásico humanos.** a) Mama normal humana. Se observa inmunotinción a nivel de las células mioepiteliales que rodean las estructuras acinares. Las células epiteliales luminales son negativas. 20x. Clon N14. b) Carcinoma de células escamosas broncogénico humano. Intensa expresión de la proteína 14-3-3 σ en las células epiteliales neoplásicas. 10x. Clon N14. IHQ.

4.1.2. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA 14-3-3 σ EN TEJIDOS NORMALES CANINOS

No se encontraron, en general, diferencias en la distribución y en los patrones de intensidad de inmunotinción entre las muestras de los 4 animales control ni entre los dos anticuerpos utilizados. Ambos anticuerpos, policlonal (N14) y monoclonal (5D7), permitieron detectar la presencia de la proteína 14-3-3 σ en diferentes tipos de tejido canino y mostraron tres patrones de inmunotinción: intracitoplasmático, nuclear y de membrana. Este patrón de inmunotinción varió en función del tejido analizado. Mayoritariamente, los anticuerpos no mostraron importantes diferencias de inmunotinción, si bien, se observaron tipos celulares que resultaron positivos o negativos en función del anticuerpo utilizado. A continuación se describe el patrón de expresión de la proteína 14-3-3 σ en los tejidos caninos normales analizados (Tabla 17). Las diferencias de inmunotinción, en relación al anticuerpo utilizado, sólo son descritas cuando existieron.

Tabla 17. Expresión inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ en tejidos normales de la especie canina.

Tejido	Citoplasma	Núcleo
Piel		
Epidermis/folículo piloso	+++	+
Glándulas sebáceas	++	-
Glándulas apocrinas		
Acinos	++	-
Mioepitelio	++	-
Aparato digestivo		
Lengua	+++	-
Glándula salival		
Acinos	-	-
Mioepitelio	-	-
Ductos	-	-
Esófago		
Epitelio	+	+
Glándulas	+	-
Estómago		
Glándulas gástricas	+*/-	-
Criptas gástricas	-	-
Glándulas pilóricas	-	-
Intestino		
Epitelio de superficie	-	-
Criptas mucosas	-	-
Glándulas de Brunner	-	-
Hígado		
Hepatocitos	-	-
Ductos biliares	-	-
Vesícula biliar	+++	-
Páncreas		
Acinos	-	-
Ductos	-	-
Islotes	+++/-	-
Aparato respiratorio		
Tráquea y bronquios		
Epitelio cilíndrico	-	-
Células basales	+	-
Glándulas	-	-
Alveolos	-	-

Tejido	Citoplasma	Núcleo
Aparato urinario		
Riñón		
Glomérulos	-	-
Túbulos	-	-
Pelvis renal	+++	-
Vejiga Urinaria		
Células superficiales	+++	-
Células basales	+++	
Glándulas endocrinas		
Glándula pituitaria	-	-
Tiroides y paratiroides	-	-
Glándula adrenal		
Corteza	-	-
Médula	+++/-	-
Aparato reproductor del macho		
Parénquima testicular	-	-
Epididimo	-	-
Próstata		
Acinos	+/-**/-	-
Ductos	+++	
Aparato reproductor de la hembra		
Ovario		
Epitelio	-	-
Rete ovárica	-	-
Útero		
Epitelio	-	-
Glándulas	-	-
Vagina (epitelio)	+++	-
Glándula mamaria		
Acinos	+/-	-
Mioepitelio	+++	-
Ductos	+/-	-
Sistema Nervioso		
Cerebro	-	-
Cerebelo	-	-
Células ependimarias	-	-

ón observada con el Clon N14. ** Reacción observada con el Clon 5D7.

4.1.2.1. PIEL

Las secciones de piel analizadas mostraron una fuerte reacción localizada en todos los estratos de la epidermis. La intensidad de reacción en los queratinocitos siempre obtuvo una puntuación de ++ o +++. En ocasiones, se observó una tendencia a mostrar una mayor intensidad de tinción en los estratos medios y superiores. El estrato córneo siempre resultó negativo (Fig. 21a,b). En una de las pieles analizadas (perro hembra) se observó, además de la reacción citoplasmática, una reacción nuclear en los queratinocitos de diferentes estratos epidermales (Fig. 21b) (Tabla 17).

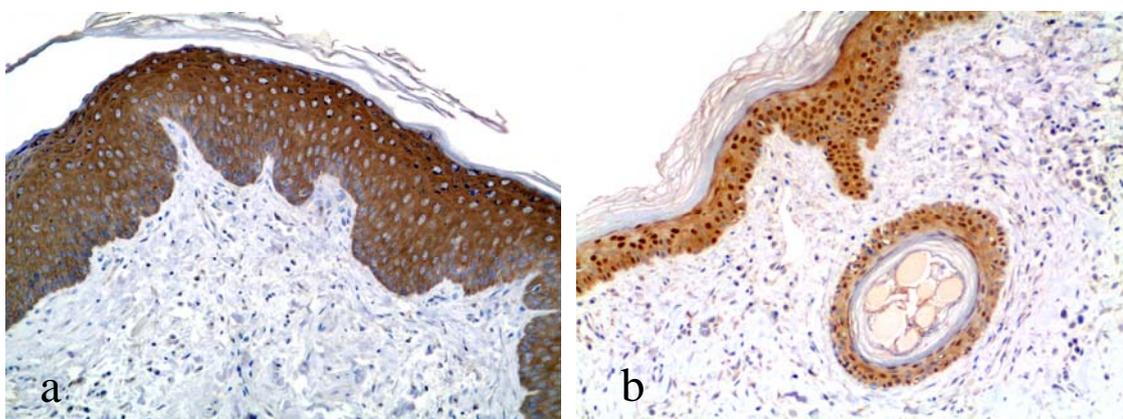


Figura 21. **Expresión inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ en piel canina.** a) Intensa (+++) reacción citoplasmática del anticuerpo 14-3-3 σ en todos los estratos de la epidermis de la piel de un pezón. Se observa mayor intensidad de reacción a nivel de los estratos medio y superior. El estrato córneo es negativo. Obsérvese reacción negativa de la queratina. 10x. Clon N14. b) Moderada (++) reacción citoplasmática del anticuerpo 14-3-3 σ asociada a reacción nuclear positiva de queratinocitos de la epidermis y del folículo piloso. Obsérvese diferentes grados de intensidad de tinción nuclear. 10x. Clon N14. IHQ.

El folículo piloso fue positivo a nivel de las células de la vaina folicular externa, del córtex y del bulbo, siempre con una intensidad de reacción elevada (+++) y de localización citoplasmática. En contraposición, las células de la papila y de la médula resultaron negativas (Fig. 22a, b y c). Ocasionalmente, se observó reacción nuclear en las células de la vaina folicular externa y del bulbo (Fig. 21b, 22c) (Tabla 17).

A nivel de complejos pilosebáceos se observó reacción en las glándulas sebáceas, donde las células basales (o de reserva) mostraron reacción positiva intensa (+++) de localización citoplasmática. Los sebocitos también resultaron positivos pero con una menor intensidad (+), reacción que se perdía a medida que las células se volvían más maduras (Fig. 22d) (Tabla 17).

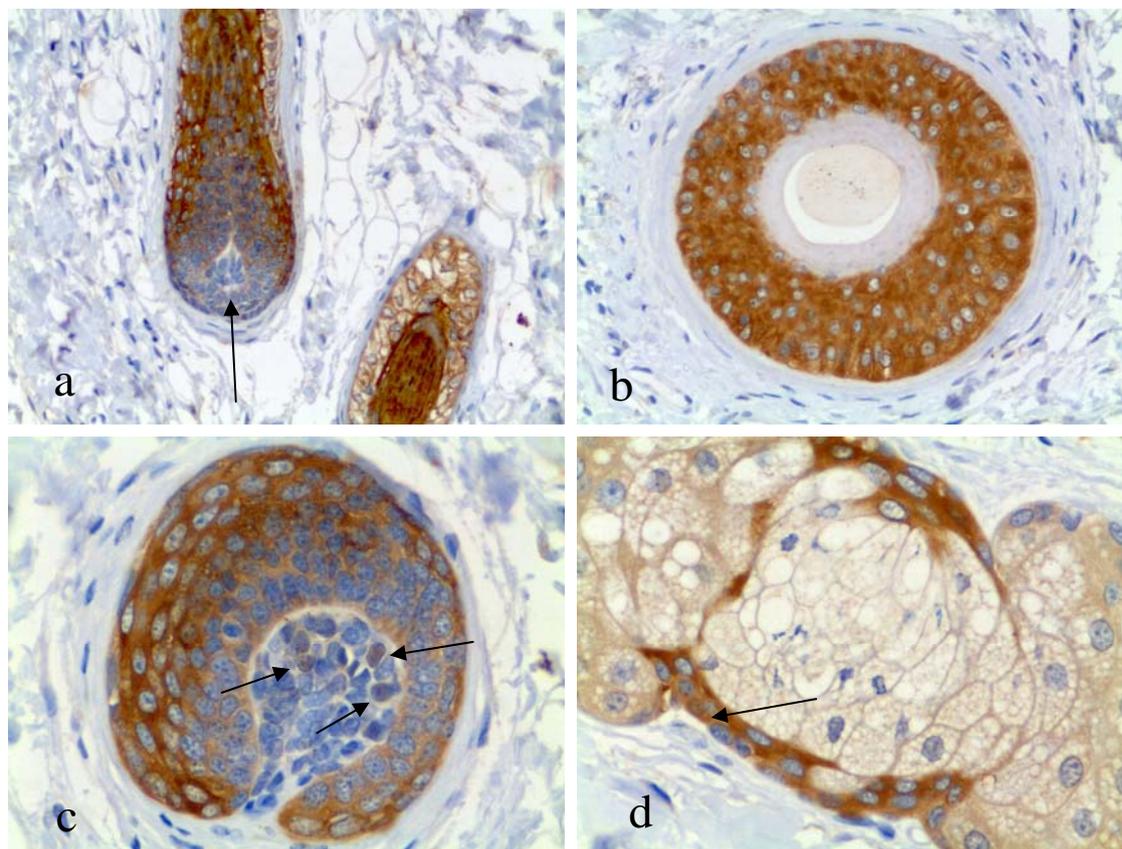


Figura 22. **Expresión inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ en complejos pilosebáceos.** a) Reacción intensa (+++) a nivel de la vaina folicular externa. El centro germinativo es negativo (flecha). 20x. Clon N14. b) La sección transversal del folículo piloso muestra intensa (+++) reacción de la vaina radicular externa y negatividad de la médula, corteza y cutícula del pelo. 20x. Clon N14. c) Algunas células del bulbo folicular presentan débil reacción nuclear (flechas). 40x. Clon N14. d) Las células basales de las glándulas sebáceas muestran intensa (+++) positividad. Obsérvese positividad a nivel nuclear (flecha). 40x. Clon N14. IHQ.

Las glándulas sudoríparas apocrinas mostraron un patrón heterogéneo de tinción. Mientras que algunos grupos de glándulas expresaron la proteína 14-3-3 σ , otros fueron negativos. Los grupos de glándulas apocrinas que resultaron positivas mostraron inmunotinción de intensidad media (++) en el citoplasma de las células mioepiteliales, apareciendo éstas como una membrana continua que abrazaba a las células epiteliales luminales.

Ocasionalmente, en las glándulas sudoríparas apocrinas que mostraron positividad a nivel de las células mioepiteliales, se observó positividad de débil intensidad (+) en las células epiteliales de manera aislada (Fig. 23) (Tabla 17).

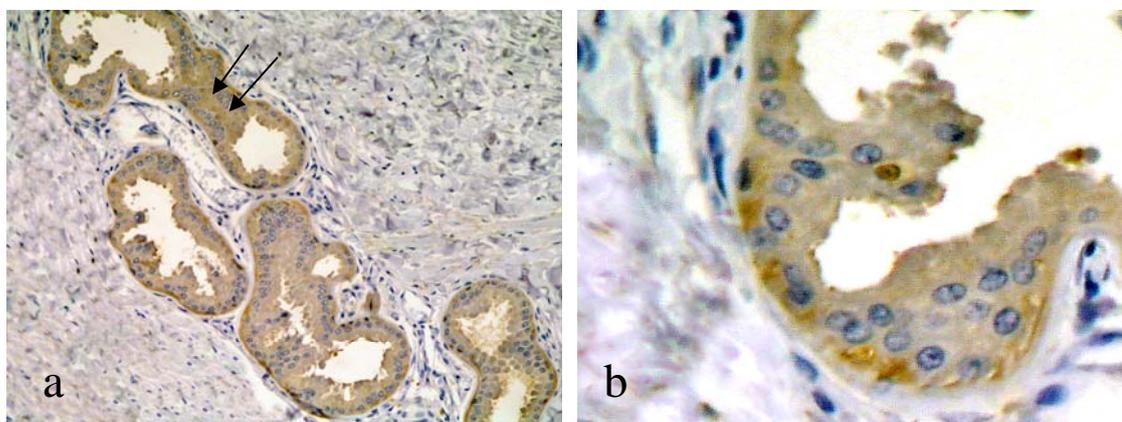


Figura 23. **Expresión inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ en glándulas sudoríparas.** a) La proteína 14-3-3 σ se expresó de manera moderada (++) en las células mioepiteliales de las glándulas sudoríparas apocrinas. Algunas células epiteliales muestran débil positividad citoplasmática (flechas). 20x. Clon N14. b) Imagen a mayores aumentos donde se observa la inmunorreacción citoplasmática a nivel de las células mioepiteliales. 40x. Clon N14. IHQ.

4.1.2.2. APARATO DIGESTIVO

Lengua

En los diferentes estratos del epitelio de revestimiento de este órgano se observó moderada a intensa (++)/ (+++) reacción con los anticuerpos anti-proteína 14-3-3 σ . A nivel de las papilas se observó tendencia a la pérdida de la expresión de la proteína en las células de los estratos superiores del epitelio (Fig. 24a). En una de las secciones estudiadas (perro hembra) se observó, además, reacción positiva del anticuerpo a nivel nuclear (Fig. 24b) (Tabla 17).

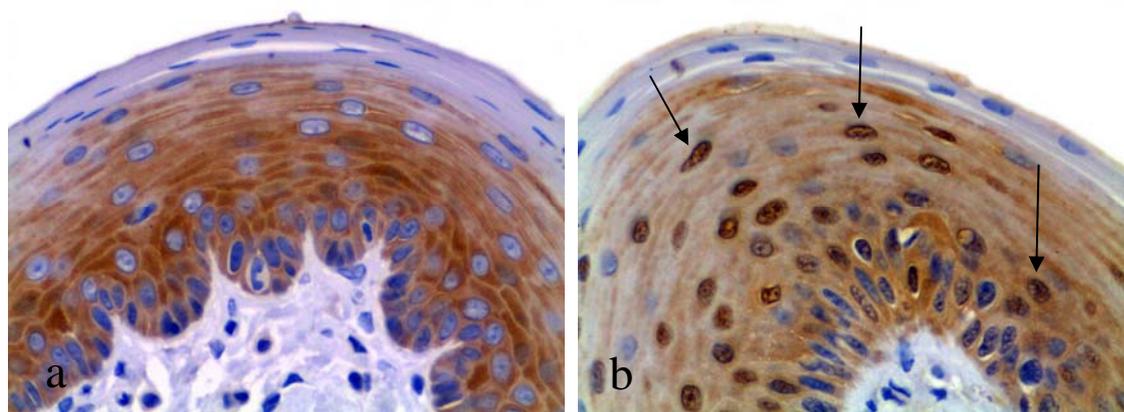


Figura 24. **Expresión inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ en lengua.** a) Inmunorreacción positiva intensa (+++) a nivel del estrato basal con pérdida de tinción hacia los estratos más superficiales. 40x. Clon N14. b) Inmunorreacción moderada (++) asociada a reacción positiva nuclear (flechas). 40x. Clon N14. IHQ.

Glándula salival

El estudio inmunohistoquímico de las glándulas salivales reveló una fuerte inmunorreacción (+++) de tipo intracitoplasmático en las células que conforman los conductos de excreción interlobulillares e intralobulillares e estriados. Además, de forma se observaron múltiples conductos cuyas células epiteliales, además de presentar expresión citoplasmática, presentaron expresión de la proteína 14-3-3 σ en el núcleo de las células. Esta expresión de localización nuclear, fue heterogénea observándose en el mismo conducto tanto células epiteliales con expresión citoplasmática y nuclear como células epiteliales que sólo presentaron positividad citoplasmática (Fig. 25) (Tabla 17).

Las células mioepiteliales que recubrían externamente a los acinos de la glándula mostraron un inmunoprecipitado que se dispuso en el fino citoplasma de estas células. La reacción de tinción de las células mioepiteliales fue intensa (+++). No se observó expresión en el núcleo de las células mioepiteliales. Finalmente, las células epiteliales que componen los acinos serosos de la glándula parótida resultaron negativas (Fig. 25) (Tabla 17).

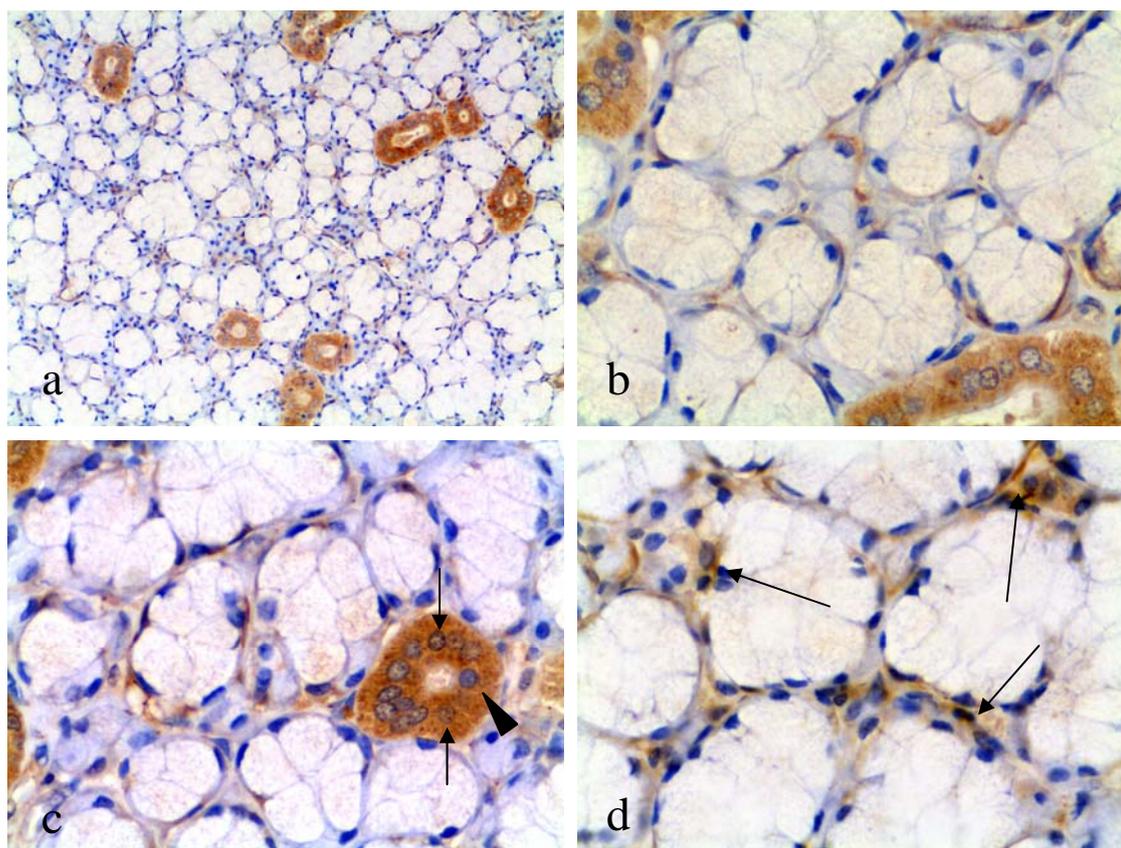


Figura 25. **Expresión inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ en glándula salival.** a) Imagen a pocos aumentos donde se observan varios grupos de conductos de excreción con intensa inmunotinción. 10x. Clon 5D7. b) Imagen a mayores aumentos donde se observa, con más detalle, la reacción tanto en las células epiteliales de los conductos como en células mioepiteliales. 40x. Clon 5D7. c) Algunos conductos muestran células epiteliales con positividad nuclear (flechas). Otras células del mismo conducto muestran núcleos negativos (cabeza de flecha). 40x. Clon 5D7. d) Imagen a grandes aumentos donde se observa una banda continua de células mioepiteliales positivas que abraza a las células secretoras negativas. 40x. Clon 5D7. IHQ.

Esófago

El esófago se caracterizó por presentar una intensidad de reacción débil (+) y difusa en las células del epitelio estratificado plano que constituyen la túnica mucosa de este órgano túbulo-membranoso. Además de esta reacción de distribución citoplasmática, encontramos un inmunoprecipitado en el interior de los núcleos de un número elevado de células, situadas tanto en los niveles basales como suprabasales. Las glándulas del esófago resultaron negativas (Fig. 26) (Tabla 17).

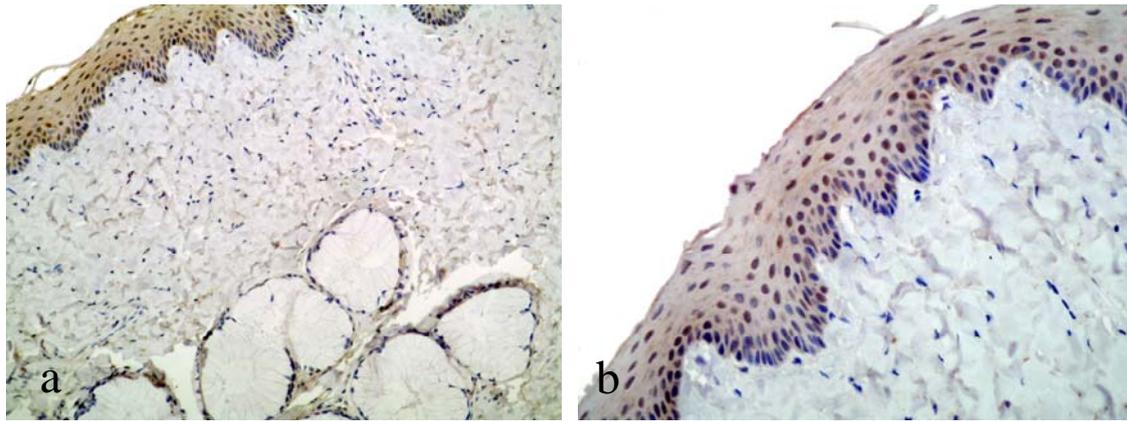


Figura 26. **Expresión inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ en esófago.** a) Imagen a pocos aumentos donde se aprecia débil inmunotinción (+) a nivel del epitelio de revestimiento de la mucosa del esófago, así como negatividad de las glándulas esofágicas. 4x. Clon N14. b) Imagen a mayores aumentos donde se observa débil positividad citoplasmática de las células epiteliales. Se observan numerosas células con positividad nuclear. 20x. Clon N14. IHQ.

Estómago

La inmunotinción con el anticuerpo anti-proteína 14-3-3 σ , clon N14, produjo a nivel del epitelio de revestimiento del estómago dos tipos de inmunoprecipitado. Por una parte, se observó, a nivel de las células del fundus un inmunoprecipitado de localización citoplasmática en una posición yuxtannuclear, que se puntuó con una intensidad de reacción media (++) . Además, se encontraron células aisladas, de morfología troncopiramidal, que mostraron una reacción de distribución citoplasmática e intensidad elevada intercaladas entre las células parietales y principales (+++). Debido a la localización de estas células, y a que en otros tejidos se obtuvo una reacción positiva similar en células de naturaleza neuroendocrina, estas células se consideraron de un más probable origen neuroendocrino (Fig. 27a-c).

Por otra parte, la inmunotinción con el anticuerpo anti-proteína 14-3-3 σ 5D7, no produjo ningún tipo de inmunoprecipitado en ninguna de las estructuras histológicas que componen el estómago (Fig. 27d) (Tabla 17).

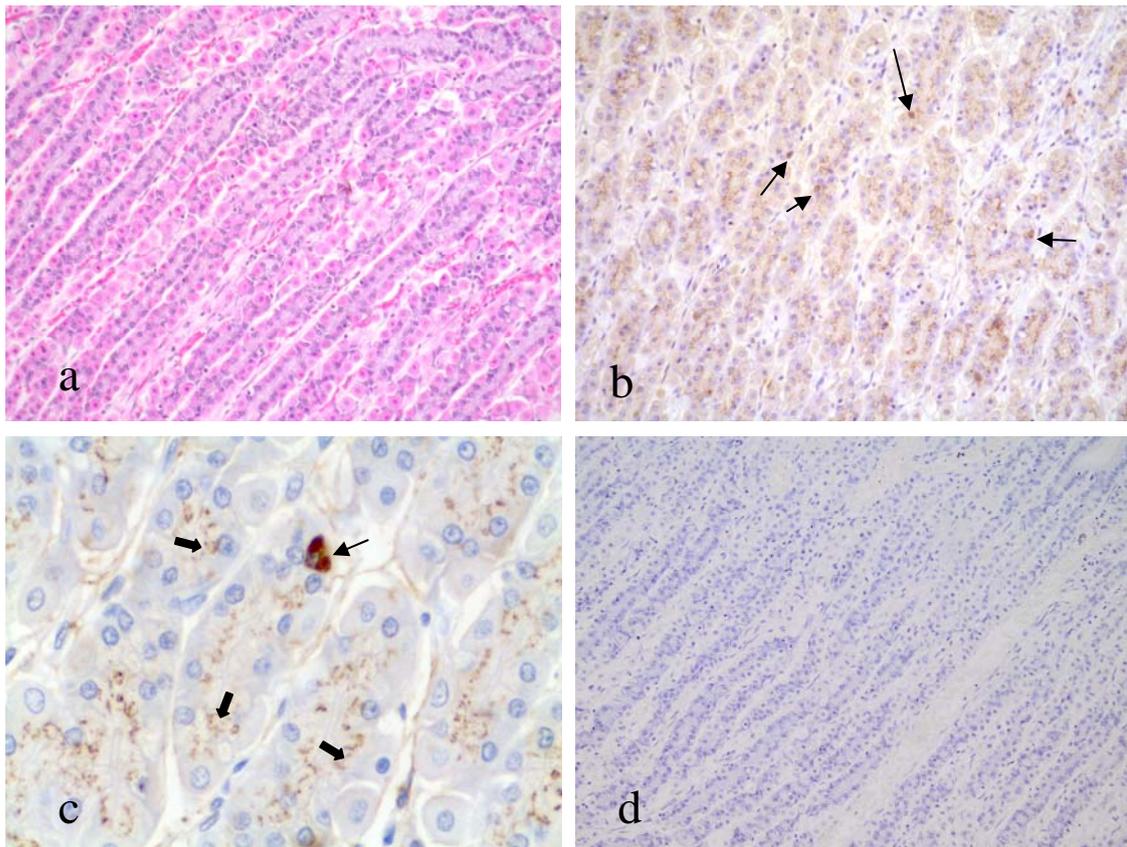


Figura 27. **Expresión inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ en estómago.** a) Sección histológica teñida con hematoxilina-eosina (HE) de la porción fúndica de las glándulas gástricas. 10x. HE. b) Inmunoprecipitado a nivel de las células principales. Se observa una población de células teñidas con mayor intensidad (flechas). 10x. Clon N14. c) Imagen a mayores aumentos donde se observa inmunoprecipitado a nivel yuxtannuclear y en regiones apicales de las células principales (flechas gruesas). Se observa una célula neuroendocrina teñida de manera intensa (flecha fina). 40x. Clon N14. d) Ausencia de reacción a la inmunotinción con el clon 5D7. 10x. Clon 5D7. IHQ.

Intestino delgado y grueso

La inmunotinción con el clon N14 produjo, a nivel de intestino delgado, inmunorreacción positiva débil en las células neuroendocrinas. No se observó tinción en otros tipos celulares (Fig. 28a). Por el contrario, la inmunotinción con el anticuerpo 5D7 no produjo reacción en ningún tipo celular (Fig. 28b) (Tabla 17). El intestino grueso no presentó inmunotinción con ninguno de los anticuerpos empleados.

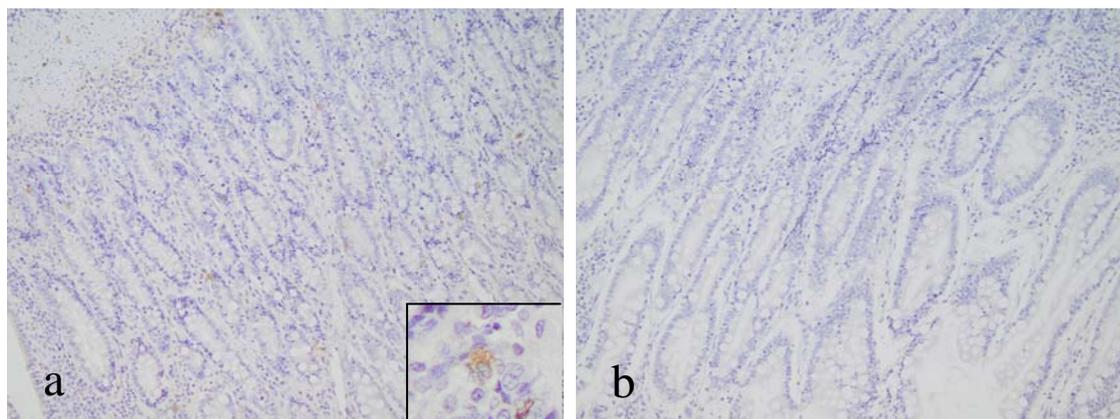


Figura 28. **Expresión inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ en intestino delgado.** a) La inmunotinción con el clon N14 produjo innotinción en células neuroendocrinas. *Inset:* Detalle de una de las células inmunopositivas. 10 y 40x, respectivamente. Clon N14. b) La inmunotinción con el clon 5D7 no produjo inmunorreacción en ningún tipo celular. 10x. Clon 5D7. IHQ.

Hígado y Vesícula biliar

El hígado no mostró inmunoprecipitados en ninguno tipo celular con ninguno de los anticuerpos anti-proteína 14-3-3 σ (Tabla 17). La vesícula biliar, a diferencia del hígado, sí mostró a nivel de la mucosa un inmunoprecipitado en el citoplasma de las células del epitelio simple cilíndrico. La intensidad de reacción en este caso fue débil/media (+/++) (Fig. 29) (Tabla 17).

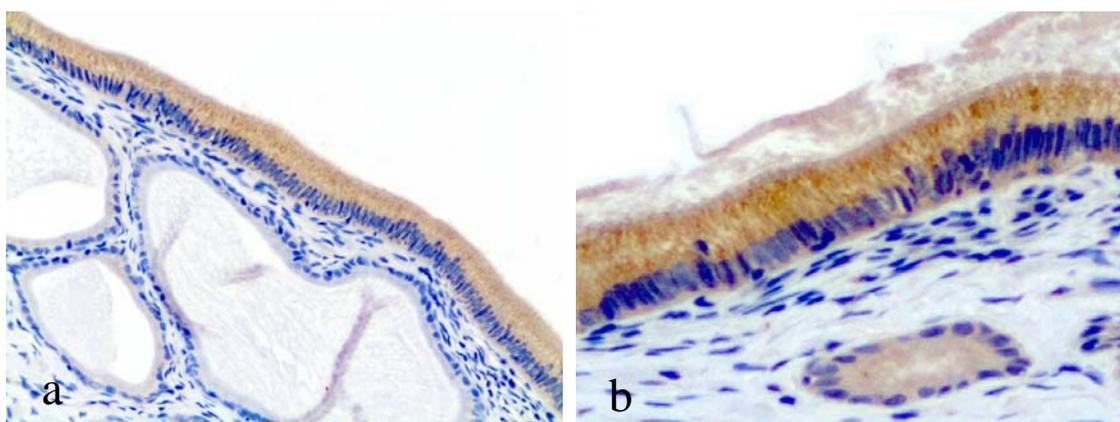


Figura 29. **Expresión inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ en vesícula biliar.** a) Reacción positiva a la inmunotinción con el anticuerpo anti-proteína 14-3-3 σ en el epitelio cilíndrico de la vesícula biliar. La intensidad de tinción es débil (+). 10x. Clon N14. b) Reacción positiva a la inmunotinción con el anticuerpo anti-proteína 14-3-3 σ en el epitelio cilíndrico de la vesícula biliar. Intensidad de tinción media (++) . 40x. Clon 5D7. IHQ.

La porción acinar o exocrina del páncreas, compuesta por células de morfología troncopiramidal, fueron siempre negativas a la tinción con ambos anticuerpos anti-proteína 14-3-3 σ . Por el contrario, cuando se empleó el clon N14, el páncreas endocrino (islotos de Langerhans) demostró una reacción de intensidad media (++), siendo su patrón de tinción únicamente citoplasmática (Fig. 30a, b) (Tabla 17).

El clon 5D7 no produjo inmunoprecipitado en ninguna estructura celular del páncreas (Fig. 30c, d) (Tabla 17).

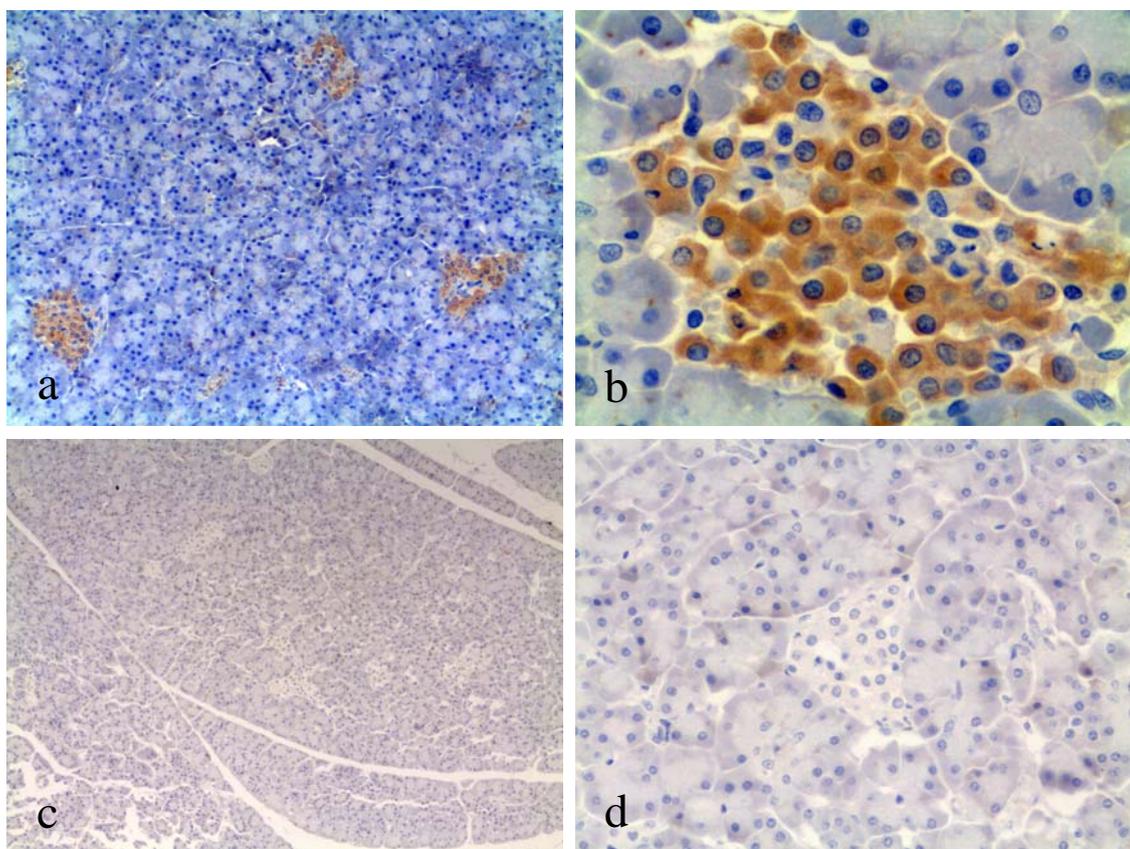


Figura 30. **Expresión inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ en páncreas.** a) Imagen a pocos aumentos donde se observan varios islotes de Langerhans moderadamente positivos (++). 4x. Clon N14. b) Imagen a mayores aumentos donde se observa una tinción de intensidad media con un patrón de expresión exclusivamente citoplasmático en un islote de Langerhans. 40x. Clon N14. c) y d) Las mismas preparaciones no mostraron ningún tipo de inmunorreacción cuando se incubaron con el clon 5D7. 4x y 20x, respectivamente. Clon 5D7. IHQ.

4.1.2.3. APARATO RESPIRATORIO

Vías respiratorias y pulmón

Las secciones de tráquea y bronquios analizadas mostraron un inmunoprecipitado débil a nivel de las células basales del epitelio (Fig. 31a). El resto de tunicas y el tejido cartilaginoso no mostraron inmunotinción. Las secciones de parénquima pulmonar demostraron ausencia de reacción en las células que tapizan los alveolos (Fig. 31b-d) (Tabla 17).

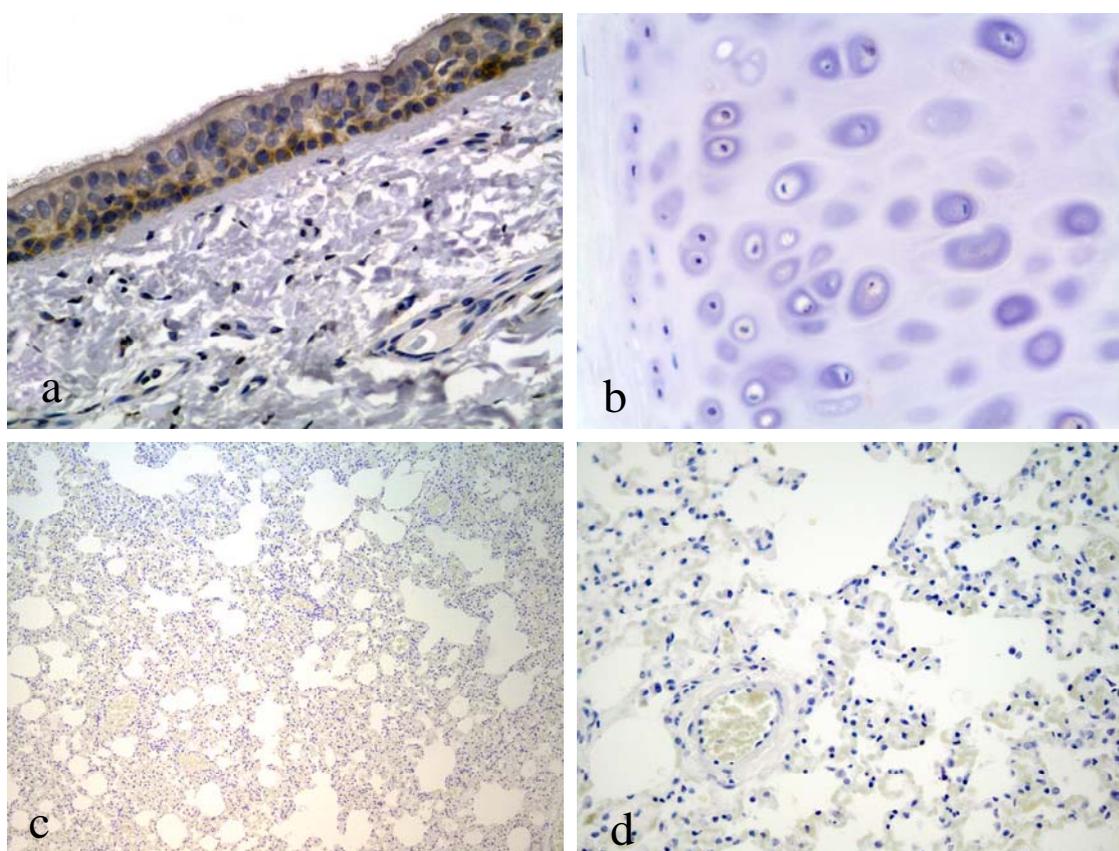


Figura 31. **Expresión inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ en pulmón.** a) Las células basales de la tráquea presentan reacción positiva débil (+) con el anticuerpo anti-proteína 14-3-3 σ . 20x. Clon N14. b) El cartilago traqueal no presentó expresión de la proteína 14-3-3 σ . 40x. Clon N14. b) El parénquima pulmonar no presenta inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-proteína 14-3-3 σ . 10x. Clon N14. c) Imagen a mayores aumentos donde se observa negatividad en todas las células. 40x. Clon N14. IHQ.

4.1.2.4. APARATO URINARIO

Riñón, Uréter y Uretra

A nivel renal la expresión de la proteína 14-3-3 σ se vio limitada al epitelio de transición de la pelvis renal. No se observó inmunorreacción a nivel de glomérulos ni en el sistema de túbulos (Fig. 32a y b) (Tabla 17).

La mucosa de uréteres y uretra reaccionó de manera intensa (+++) con ambos anticuerpos anti-proteína 14-3-3 σ . La reacción se distribuyó de manera homogénea en el citoplasma de las células del epitelio de transición, teniendo un reforzamiento de la inmunotinción a nivel de membrana. Variable cantidad de células positivas a nivel citoplasmático mostraron tinción de sus núcleos (Fig. 32c y d) (Tabla 17).

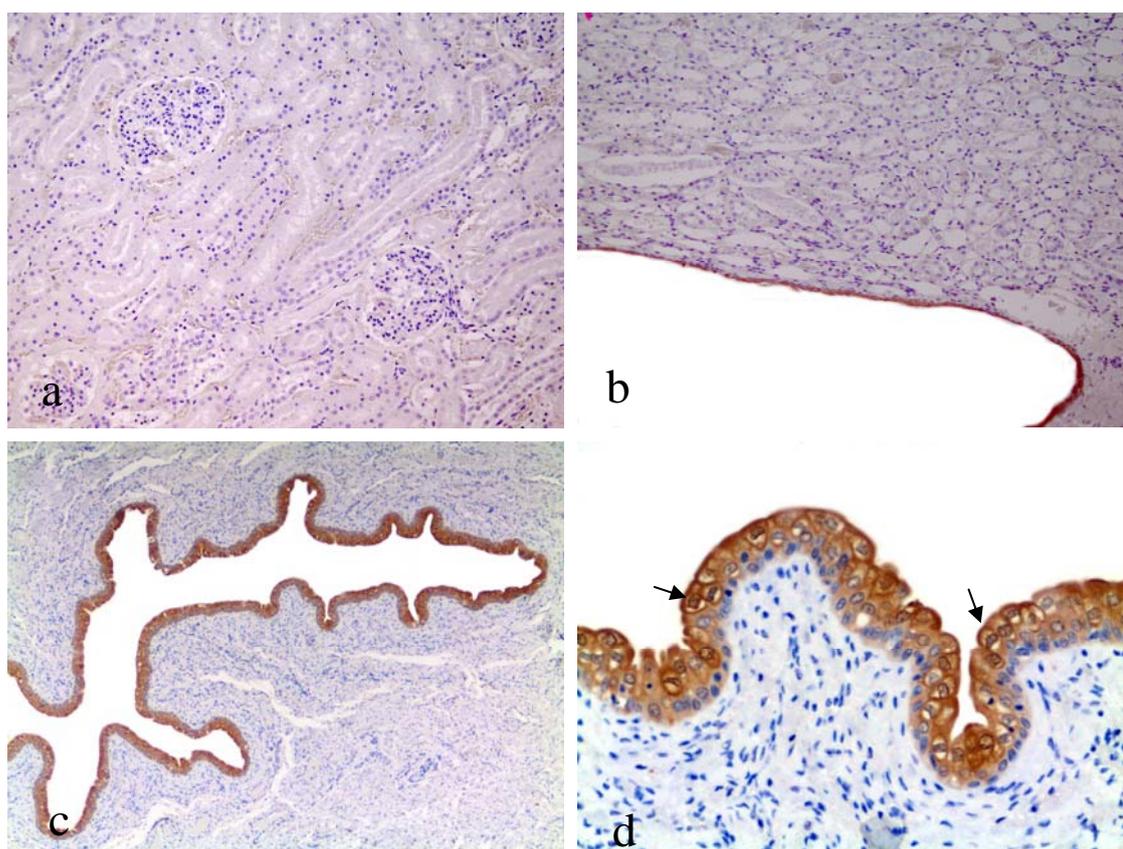


Figura 32. **Expresión inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ en riñón y uretra.** a) No se observó inmunotinción en ningún elemento celular del glomérulo ni en las células epiteliales de los túbulos. 20x. Clon 5D7. b) Se observa inmunorreacción positiva a nivel del epitelio de transición de la pelvis renal. 20x. Clon 5D7. c) Imagen a pocos aumentos de la uretra femenina. Se observa tinción intensa y homogénea de todo el epitelio del órgano. 4x. Clon N14. d) Imagen a mayores aumentos donde se observa un patrón de inmunotinción citoplasmático, de membrana y nuclear (flechas). 20x. Clon N14. IHQ.

Vejiga urinaria

A nivel de la vejiga urinaria, las células de los estratos basales y medios del epitelio de transición presentaron una intensa (+++) inmunotinción citoplasmática. Por el contrario, las células apicales de dicho epitelio presentaron una inmunotinción positiva débil (+) o negativa. Además de la intensa reacción citoplasmática, se observó reacción positiva en numerosos núcleos de las células epiteliales de transición. Estos resultados de inmunotinción fueron los mismos con ambos anticuerpos anti-proteína 14-3-3 σ empleados (Fig. 33) (Tabla 17).

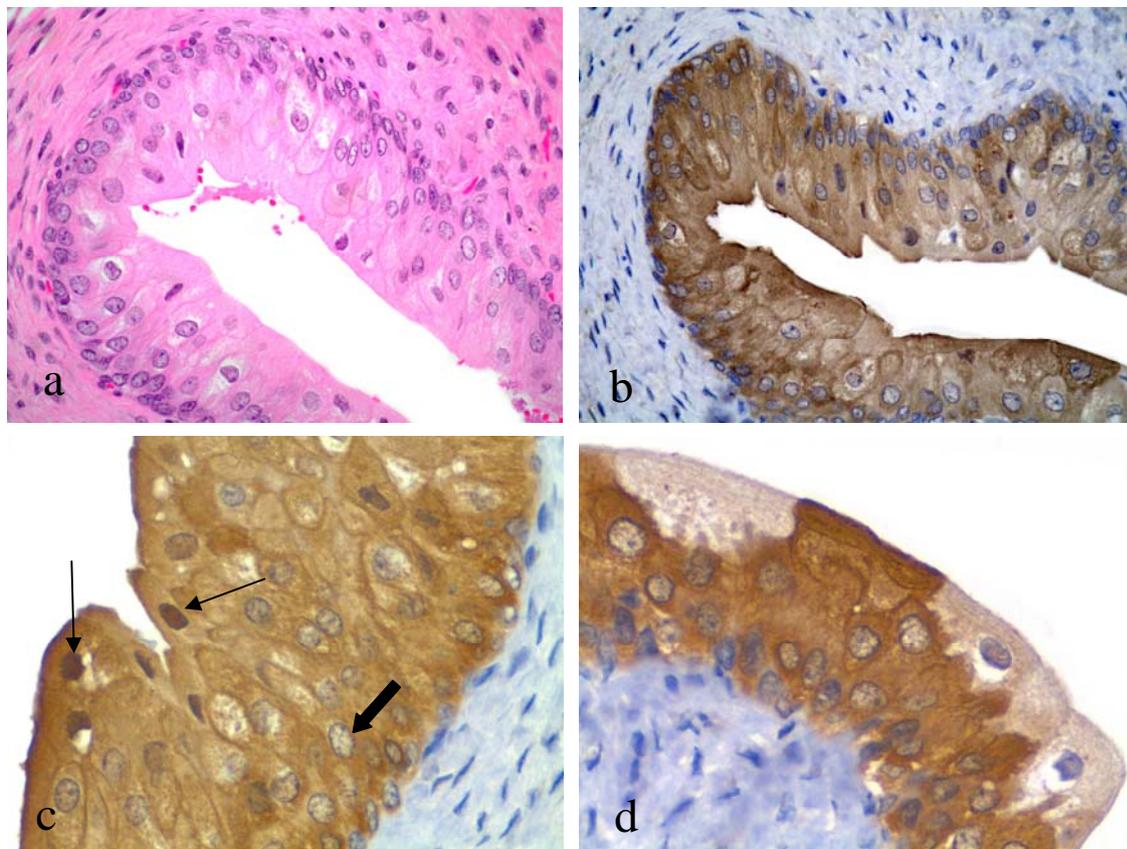


Figura 33. **Expresión inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ en vejiga.** a) Sección histológica teñida con hematoxilina-eosina del epitelio de transición de la vejiga urinaria canina. 40x. HE. b) Sección histológica seriada en la que se observa reacción positiva de elevada intensidad a nivel del citoplasma de las células epiteliales de la mucosa de la vejiga urinaria. 40x. Clon N14. c) Todas las células presentan inmunorreacción intracitoplasmática positiva. Los núcleos de algunas células aparecen heterogéneamente positivos (flechas) en tanto que otros aparecen negativos (flechas gruesas). 40x. Clon 5D7. d) Las células en paraguas del epitelio de transición aparecen intensamente positivas y se intercalan con células de tinción débil. 40x. Clon 5D7. IHQ.

4.1.2.5. APARATO REPRODUCTOR DEL MACHO

Testículos y Próstata

No se encontró ninguna inmunotinción en las diferentes poblaciones celulares que componen el testículo.

Ambos anticuerpos anti-proteína 14-3-3 σ produjeron un inmunoprecipitado de gran intensidad (+++) en las células epiteliales de los ductos (Fig. 34a y c). Con el clon N14 se observó, además, una reacción yuxtannuclear (++) que no se evidenció con el clon 5D7 (Fig. 34b). El clon 5D7 produjo además, una reacción intracitoplasmática en escasos grupos de células secretoras con una intensidad de tinción baja (+) (Fig. 34d) (Tabla 17).

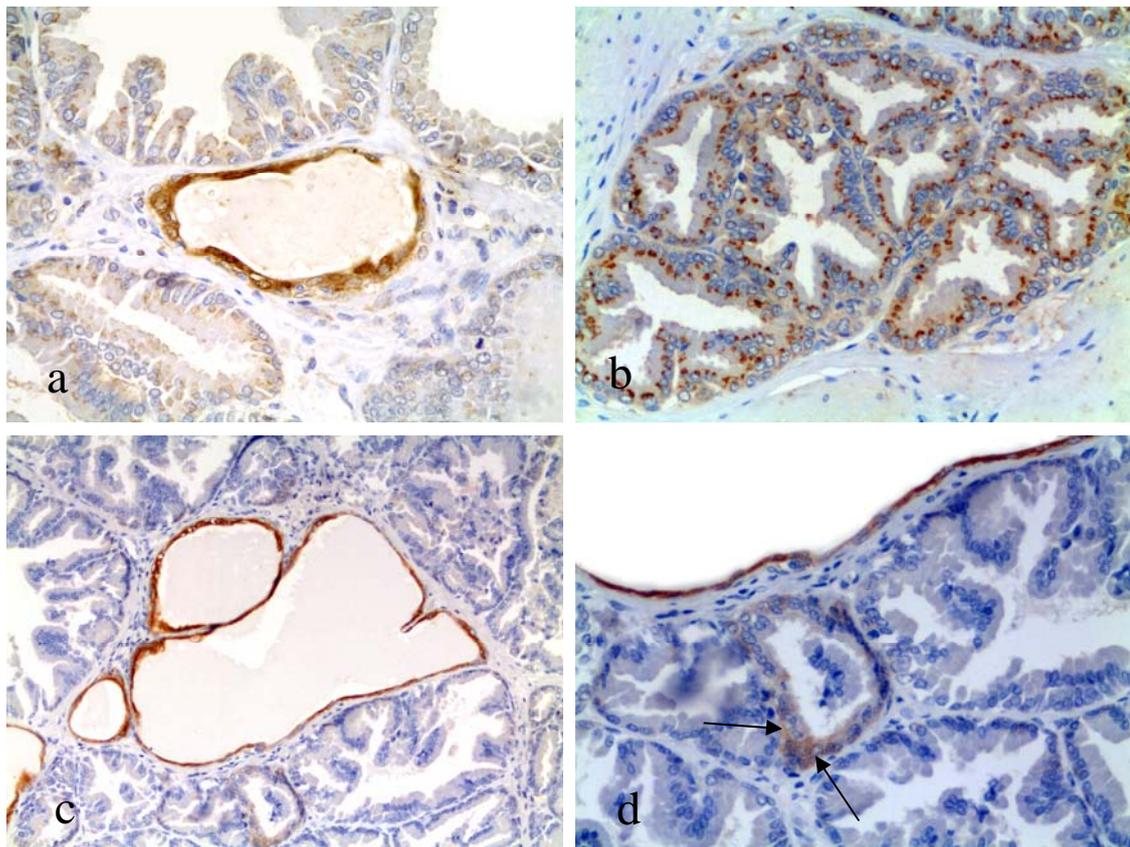


Figura 34. **Expresión inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ en próstata.** a) Inmunorreacción en el epitelio ductal de la próstata. Se observa inmunoprecipitado yuxtannuclear en las células secretoras. 20x. Clon N14. b) Lobulillo prostático en el que se observa una generalizada inmunoprecipitación yuxtannuclear en las células epiteliales. 20x. Clon N14. c) Inmunorreacción en las células epiteliales ductales. Las células alveolares no presentan inmunorreacción. 20x. Clon 5D7. d) Imagen a mayores aumentos donde se observa ocasional positividad de moderada intensidad en el epitelio secretor. 40x. Clon 5D7. IHQ.

4.1.2.6. APARATO REPRODUCTOR DE LA HEMBRA

Ovario, Útero y Cuernos uterinos

No se encontró ninguna inmunotinción en las diferentes poblaciones celulares que componen el ovario.

A nivel de útero se encontró inmunotinción únicamente a nivel de endometrio. Las células que componen este epitelio fueron inmunomarcadas en el citoplasma de manera heterogénea con una intensidad baja (+). De igual manera, las glándulas endometriales fueron heterogéneamente positivas (+) (Tabla 17).

Vagina

El epitelio vaginal presentó entre 2 y 3 capas de células, siendo todas ellas positivas con ambos anticuerpos anti-proteína 14-3-3 σ . La intensidad de reacción fue media-intensa (++)/ (+++) en los estratos más basales, mientras que en superficie la reacción fue débil o negativa (+/-). La reacción se localizó principalmente en el citoplasma, sin embargo, numerosos núcleos también mostraron positividad (Fig. 35) (Tabla 17).

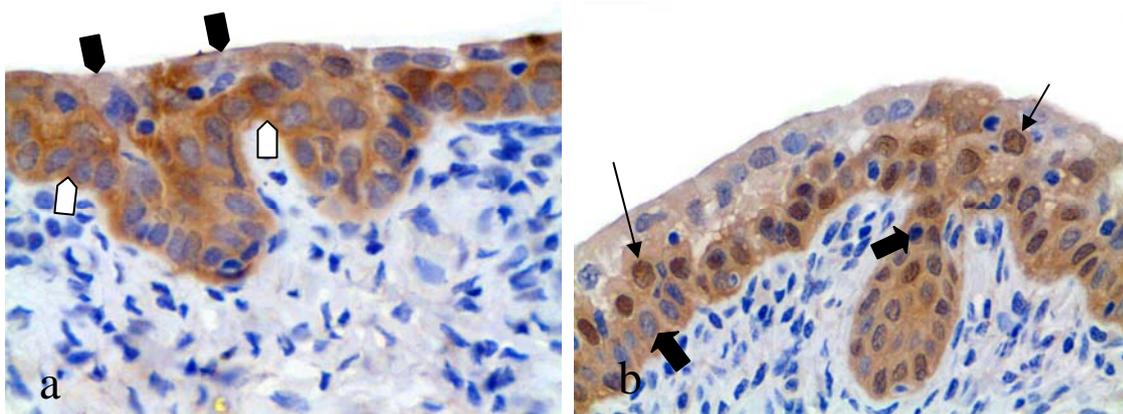


Figura 35. **Expresión inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ en vagina.** a) El estrato basal del epitelio de revestimiento de la vagina mostró una inmunorreacción intensa (+++) (puntas de flecha blanca), mientras que el estrato superficial mostró una inmunorreacción débil (+) (puntas de flecha negra). 40x. Clon N14. b) Se observa variable inmunorreacción con el anticuerpo anti-proteína 14-3-3 σ en el citoplasma de las células epiteliales de la mucosa de la vagina. Mientras que algunos núcleos presentan inmunoprecipitado (flechas) otros son negativos (flechas gruesas). 40x. Clon 5D7. IHQ.

4.1.2.7. GLÁNDULA MAMARIA

El patrón de inmunotinción del anticuerpo anti-proteína 14-3-3 σ fue diferente en las dos glándulas mamarias examinadas.

La glándula mamaria en reposo, mostró una inmunotinción de intensidad elevada (+++) y distribución citoplasmática en la totalidad de las células mioepiteliales de ductos y acinos glandulares. Por otra parte, las células epiteliales fueron, en su práctica totalidad, negativas y sólo ocasionalmente algunas presentaron una inmunotinción débil (+) a nivel citoplasmático (Fig. 36) (Tabla 17).

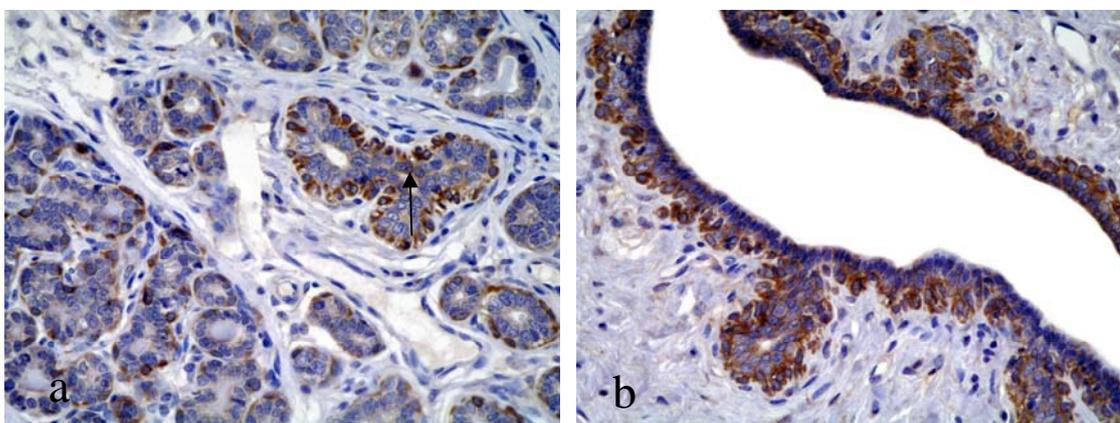


Figura 36. **Expresión de la proteína 14-3-3 σ en glándula mamaria.** a) Mama canina en reposo. Expresión de la proteína 14-3-3 σ en células mioepiteliales lobulares y ductales. Se observa positividad en células epiteliales (flecha). 20x. Clon N14. b) Mama canina en reposo. Intensa inmunorreacción en células mioepiteliales ductales. Se observa, además, moderada y heterogénea reacción en células epiteliales luminales. 20x. Clon N14.

La glándula mamaria activa, perteneciente a una perra muerta durante el periodo de recuperación tras una cesárea, presentó una reacción positiva de intensidad media (++) en un importante número de células epiteliales secretoras. Además de en estas células, también se observó inmunotinción en las células mioepiteliales de los ductos. Las células mioepiteliales de los acinos glandulares quedaron reducidas a un fino citoplasma positivo, muchas veces imperceptible debido a la dilatación de las luces glandulares. En ambas localizaciones, células epiteliales y células mioepiteliales, el patrón de reacción fue exclusivamente citoplasmático y ningún núcleo mostró tinción con los anticuerpos anti-proteína 14-3-3 σ empleados (Fig. 37) (Tabla 17).

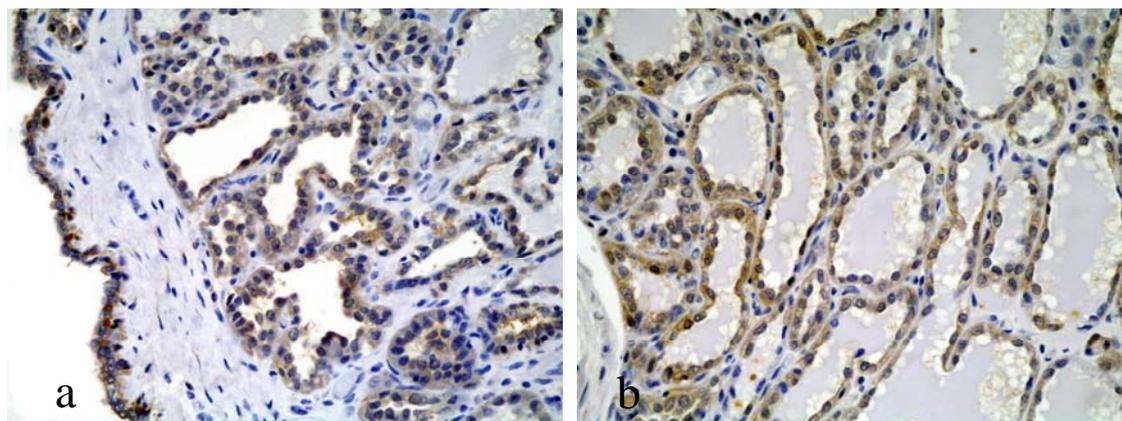


Figura 37. **Expresión de la proteína 14-3-3 σ en glándula mamaria.** a) Mama canina lactante. Se observa positividad en células mioepiteliales ductales y en variable cantidad de células epiteliales lumbales. 20x. Clon N14. b) Acinos mamarios ocupados por secreción láctea. Se observa inmunorreacción citoplasmática en células epiteliales lumbales. 20x. Clon N14. IHQ.

4.1.2.8. GLÁNDULAS ENDOCRINAS

No se observó expresión de la proteína 14-3-3 σ en la glándula pituitaria, el tiroides y el paratiroides en ninguna de las muestras analizadas con ninguno de los anticuerpos empleados.

La inmunotinción con el anticuerpo anti-proteína-14-3-3 σ , clon N14, produjo reacción positiva de intensidad moderada (++) y localización citoplasmática en las células de la médula adrenal. La corteza adrenal fue negativa (Fig. 38a) (Tabla 17).

Además, en una de las glándulas adrenales se observó positividad de los cuerpos neuronales de un ganglio nervioso. Los cuerpos neuronales presentaron una positividad de intensidad baja (+) a moderada (++). Dicha inmunotinción fue siempre de localización citoplasmática. Los gliocitos distribuidos a manera de cápsula incompleta en torno a los cuerpos neuronales fueron negativos (Fig. 38b) (Tabla 17).

Finalmente, no se observó inmunorreacción en la glándula adrenal ni en el ganglio nervioso mediante la incubación con el anticuerpo anti-proteína 14-3-3 σ , clon 5D7 (Fig. 38c y d) (Tabla 17).

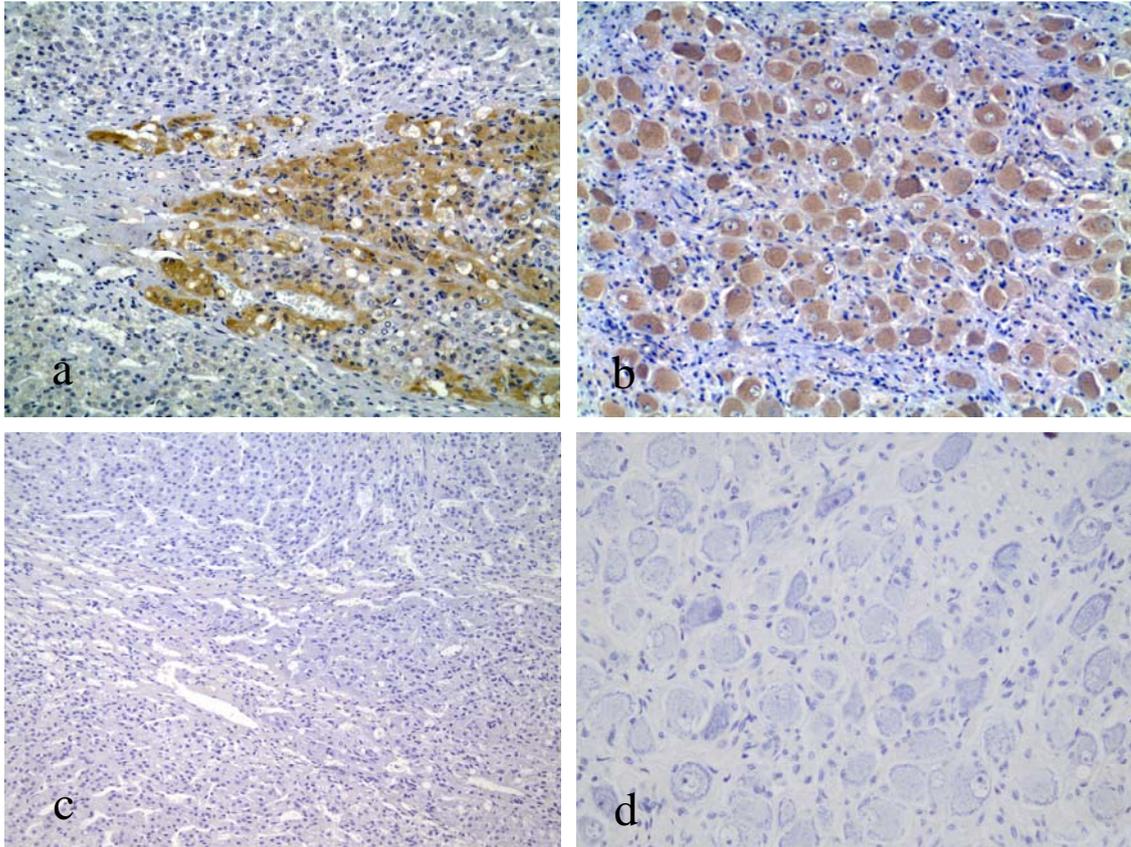


Figura 38. **Expresión inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ en glándula adrenal.** a) Inmunorreacción positiva en las células de la médula adrenal tras la incubación con el anticuerpo anti-proteína 14-3-3 σ . 20x. Clon N14. b) La misma sección histológica mostró cuerpos neuronales positivos. 20x. Clon N14. c) y d) Las mismas preparaciones no mostraron ningún tipo de inmunorreacción cuando se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-proteína 14-3-3 σ . 20x. Clon 5D7. IHQ.

4.1.2.9. TEJIDO LINFOIDE

Ninguna de las secciones de nódulos linfáticos y bazo expresó la proteína 14-3-3 σ . De manera similar, el tejido linfoide asociado a la mucosa de estómago, así como en las placas de Peyer, no expresó la proteína 14-3-3 σ .

El análisis de las tonsilas palatinas reveló una intensa expresión de la proteína 14-3-3 σ en el epitelio de revestimiento de este órgano sin que se observara inmunotinción en linfocitos (Fig. 39).

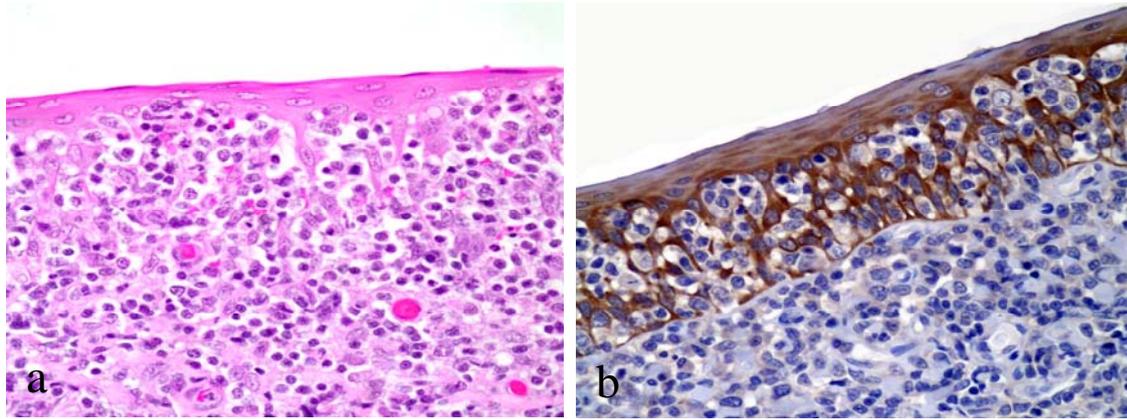


Figura 39. **Expresión inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ en tonsila.** a) Sección histológica teñida con hematoxilina-eosina de tonsila palatina. (20x). HE. b) Sección seriada donde se observa una intensa expresión de la proteína 14-3-3 σ en las células epiteliales de la mucosa que recubre la tonsila palatina. Las células linfoides son negativas. 20x. Clon N14. IHQ.

4.1.2.10. OTROS TEJIDOS

Cerebro, cerebelo, medula espinal, músculos estriados cardiaco y esquelético y tejido adiposo no mostraron ningún tipo de reacción con ninguno de los anticuerpos anti-proteína 14-3-3 σ empleados en este estudio (Tabla 17).

4.2. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA 14-3-3 σ EN TEJIDOS NORMALES DE LA ESPECIE CANINA MEDIANTE WESTERN BLOT

La incubación con ambos anticuerpos anti-proteína 14-3-3 σ fue capaz de producir quimioluminiscencia específica en las bandas correspondientes a los homogeneizados de tejidos caninos analizados. El voltaje que produjo mejores resultados para la transferencia de proteínas a las membranas de polivinilo fue de 230 mA.

La incubación con el clon N14 permitió identificar una banda proteica del peso esperado, 30kD, en los homogeneizados de tejido mamario, vejiga, esófago y piel. Los homogeneizados de glándula salival, riñón, cerebro, hígado y nódulo linfático no mostraron reacción específica en sus bandas. Además, en la banda que correspondía al tejido hepático se observó una imagen de barrido artefactuaria (Fig. 40).

La incubación con el clon 5D7 permitió identificar bandas proteicas de idéntico peso molecular que las identificadas con el clon N14. En este caso, las bandas permitieron identificar la presencia de la proteína en los homogeneizados de tejido mamario, vejiga, glándula salival, esófago y piel. Si bien, todas las bandas de reacción obtenidas con el clon 5D7 fueron más intensas que las obtenidas con el clon N14. Además, el artefacto observado, mediante la incubación con el clon N14 en la banda del tejido hepático no se presentó en la incubación con el clon 5D7 (Fig. 40).

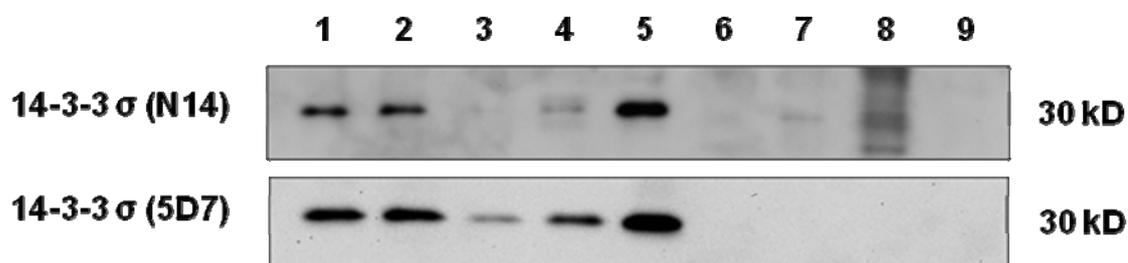


Figura 40. **Expresión de la proteína 14-3-3 σ mediante Western blot con los clones N14 y 5D7.** Se observa una detección más precisa y con menos artefactos en las bandas obtenidas con la incubación del clon 5D7. 1. Glándula mamaria. 2. Vejiga urinaria. 3. Glándula salival. 4. Esófago. 5. Piel. 6. Riñón. 7. Cerebro. 8. Hígado. 9. Nódulo linfático.

4.3. LOCALIZACIÓN Y DISTRIBUCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA PROTEÍNA 14-3-3 σ EN TEJIDOS NORMALES, DISPLÁSICOS Y NEOPLÁSICOS MAMARIOS DE LA ESPECIE CANINA

El análisis de la expresión de la proteína 14-3-3 σ en el tejido mamario normal, displásico y neoplásico se llevó a cabo empleando el anticuerpo monoclonal anti-proteína 14-3-3 σ , clon 5D7, estando los resultados obtenidos resumidos en la Tabla 18.

Tabla 18. Expresión inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ en células epiteliales y mioepiteliales en tejidos normales, displásicos y neoplásicos de la glándula mamaria de la especie canina.

Tipo Histológico	Nº de casos	Intensidad de inmunotinción				Proporción de células inmunopositivas			
		-	+	++	+++	1 (<5%)	2 (5-25%)	3 (25-50%)	4 (>50%)
Células epiteliales									
Glándula mamaria normal	53	41	12	0	0	12	0	0	0
Displasias mamarias	23	15	4	3	1	4	2	2	0
Neoplasias benignas									
Adenoma simple	6	2	4	0	0	3	1	0	0
Adenoma complejo	6	0	4	2	0	0	5	1	0
Fibroadenoma	4	4	0	0	0	0	0	0	0
Neoplasias malignas									
Carcinoma simple túbulo-papilar	18	3	4	7	4	1	3	7	4
Carcinoma simple sólido	15	1	1	4	9	1	1	4	8
Carcinoma complejo	15	3	8	3	1	7	1	3	1
Carcinoma en tumor benigno	8	0	2	2	4	0	3	2	3
Carcinosarcoma	2	0	0	0	2	0	0	0	2
Carcinoma anaplásico	1	0	0	0	1	0	0	1	0
Carcinoma rico en lípidos	3	0	0	1	2	0	0	0	3
Células mioepiteliales									
Glándula mamaria normal	53	0	0	0	53	0	0	0	53
Displasias mamarias	23	2	1	6	14	0	0	14	7
Neoplasias benignas									
Adenoma simple	6	0	0	1	5	0	1	2	3
Adenoma complejo	6	0	1	2	3	1	4	0	1
Fibroadenoma	4	0	0	0	4	0	0	1	3
Neoplasias malignas									
Carcinoma simple túbulo-papilar	18	5	2	4	7	2	1	6	4
Carcinoma simple sólido	15	9	5	0	1	6	0	0	0
Carcinoma complejo	15	0	3	4	8	0	10	2	3
Carcinoma en tumor benigno	8	0	4	3	1	1	5	2	0
Carcinosarcoma	2	0	0	0	2	1	1	0	0
Carcinoma anaplásico	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Carcinoma rico en lípidos	3	1	0	1	1	2	0	0	0

4.3.1. GLÁNDULA MAMARIA NORMAL Y DISPLÁSICA

En la **glándula mamaria normal canina**, la incubación de las preparaciones histológicas con el anticuerpo monoclonal anti-proteína 14-3-3 σ 5D7 produjo inmunorreacción, con un patrón de tinción citoplasmático, en todas las células mioepiteliales periacinares y periductales (n=53). La intensidad de tinción fue homogénea en todas las preparaciones. En 12 casos pudieron observarse inmunoprecipitados en células epiteliales de alveolos y ductos. No obstante, la inmunotinción de las células mioepiteliales siempre fue de mayor intensidad que la de las células epiteliales (Fig. 41).

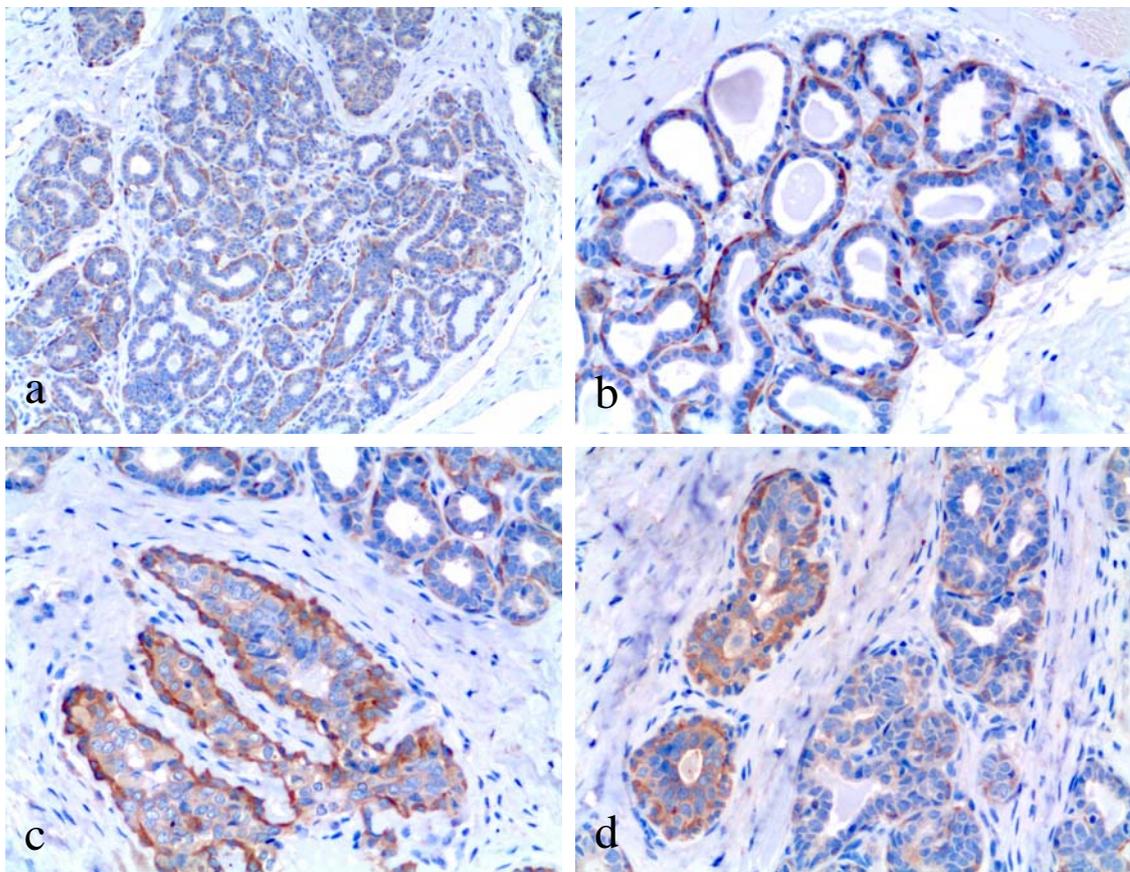


Figura 41. **Expresión inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ en mama normal.** a) Imagen a pocos aumentos donde se observa homogeneidad de reacción en células mioepiteliales en los acinos de un lobulillo mamario. 10x. Clon 5D7. b) Imagen a mayores aumentos. Se observa una capa continua de células mioepiteliales cuyo citoplasma presenta inmunotinción exclusivamente citoplasmática. 20x. Clon 5D7. c) Se observan estructuras acinares con positividad en células mioepiteliales (parte superior de la imagen). Adyacente se observa un ducto con positividad en células epiteliales y mioepiteliales. 20x. Clon 5D7. d) Mismo patrón de inmunotinción que en c) 20x. Clon 5D7. IHQ.

En 23 de las muestras de tumores analizados se encontró **mama displásica** adyacente a las proliferaciones neoplásicas. Las displasias mamarias encontradas fueron hiperplasias lobulillares de tipo adenosis (n=19) e hiperplasias lobulillares de tipo epitelirosis (n=4). Las zonas de hiperplasia lobulillar de tipo adenosis presentaron un patrón de tinción similar al de la mama normal, aunque en 2 casos de adenosis no se observó inmunotinción a nivel de las células mioepiteliales ni de las epiteliales. En los 4 casos de hiperplasias de tipo epitelirosis se observó, además de la inmunotinción en las células mioepiteliales, positividad de moderada a intensa en las células epiteliales (Fig. 42).

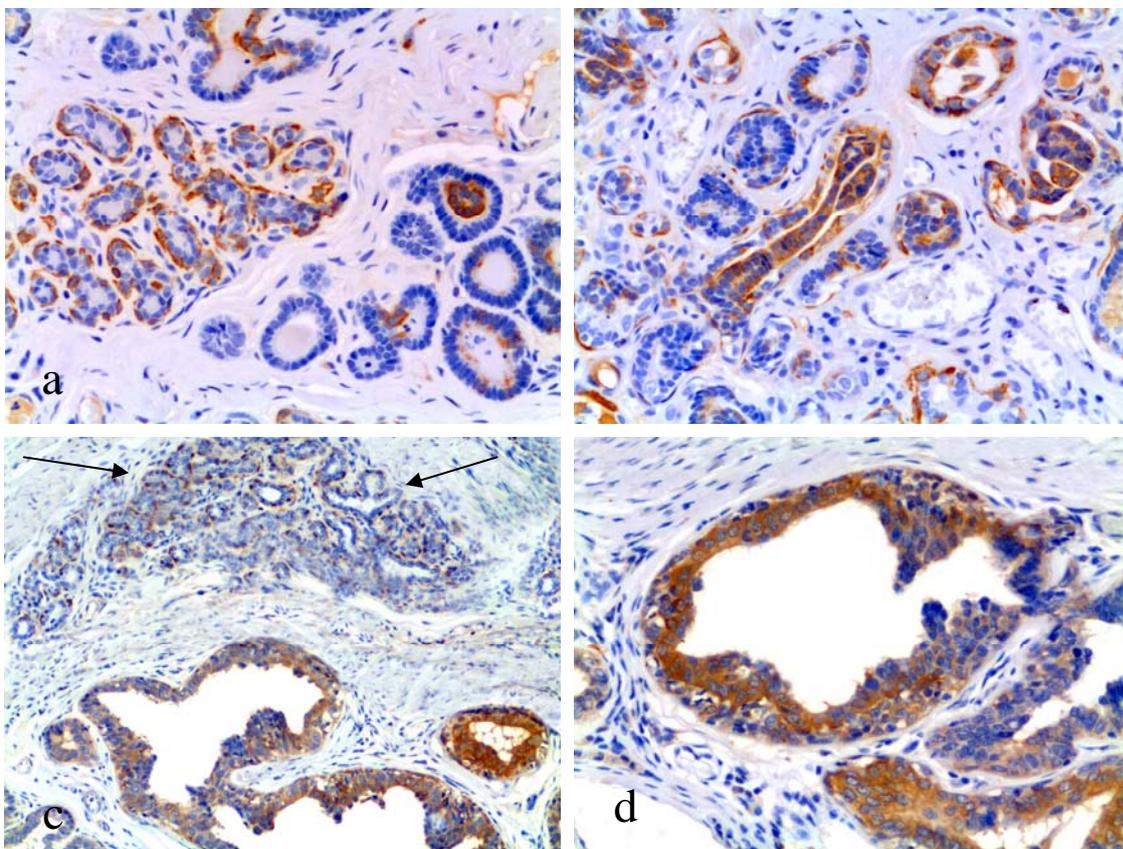


Figura 42. **Expresión de la proteína 14-3-3 σ en tejidos mamarios displásicos.** a) Área de epitelirosis donde las células epiteliales son positivas (flecha), adyacente a un lóbulo donde los acinos expresan la proteína en las células mioepiteliales. 20x. Clon 5D7. b) Foco de epitelirosis donde ambos compartimentos, epitelial y mioepitelial, presentan reacción positiva. 20x. Clon 5D7. c) Imagen a pocos aumentos donde se observa un lobulillo mamario histológicamente normal (flechas) adyacente a un ducto con hiperplasia epitelial. La inmunorreacción en la mama normal queda confinada a las células mioepiteliales, mientras que el conducto hiperplásico presenta intensa reacción en las células epiteliales. 10x. Clon 5D7. d) Imagen a mayores aumentos donde se observa la positividad de las células epiteliales ductales. 20x. Clon 5D7. IHQ.

4.3.2. NEOPLASIAS BENIGNAS

La expresión inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ se examinó en 16 neoplasias benignas mamarias que pertenecían a los siguientes tipos histológicos: adenoma simple de mama (n=6), adenoma complejo de mama (n=6) y fibroadenoma (n=4).

Se detectó expresión de la proteína, con diferente proporción e intensidad, a nivel del compartimento mioepitelial en el 100% de los casos examinados, mientras que el compartimento epitelial presentó positividad, igualmente con diferentes grados de intensidad de tinción y proporción, en el 37,5 % de los casos.

La proteína 14-3-3 σ se expresó en el 100 % de los tumores benignos. La expresión de la proteína 14-3-3 σ en los **adenomas simple de origen epitelial** (n=5) se localizó principalmente en las células mioepiteliales pre-existentes que rodeaban los acinos mamarios. Las células epiteliales en estas neoplasias presentaron escasos signos de atipia celular. Una única capa de células epiteliales tapizaba el interior de los acinos. No se observó, normalmente, pérdida de la polaridad ni de la orientación nuclear. Las mitosis observadas fueron escasas (Fig. 43a). En 4 casos de adenomas simples de origen epitelial se observó que, además de la positividad en las células mioepiteliales pre-existentes (+++) e hipertróficas (+++), las células epiteliales luminales expresaron la proteína 14-3-3 σ . La intensidad de reacción de estas células fue débil (+) y se produjo en una baja proporción (Fig. 43a). El resto de adenomas simples presento sólo reacción en células mioepiteliales (Fig. 43b-d) (Tabla 18).

Uno de los **adenomas simples** analizados fue de **origen mioepitelial**. Este tumor se caracterizó por la presencia de una proliferación neoplásica de células mioepiteliales que crecían formando estructuras a manera de ovillos. Las células neoplásicas mostraron escasos signos de atipia y presentaron una morfología eminentemente fusiforme y estrellada. La proteína 14-3-3 σ se observó de manera intensa (+++) y homogénea en el citoplasma de las células mioepiteliales neoplásicas (Fig. 43e y f) (Tabla 18). Las células epiteliales que quedaron inmersas entre las células mioepiteliales fueron débil (+) o moderadamente positivas (++) .

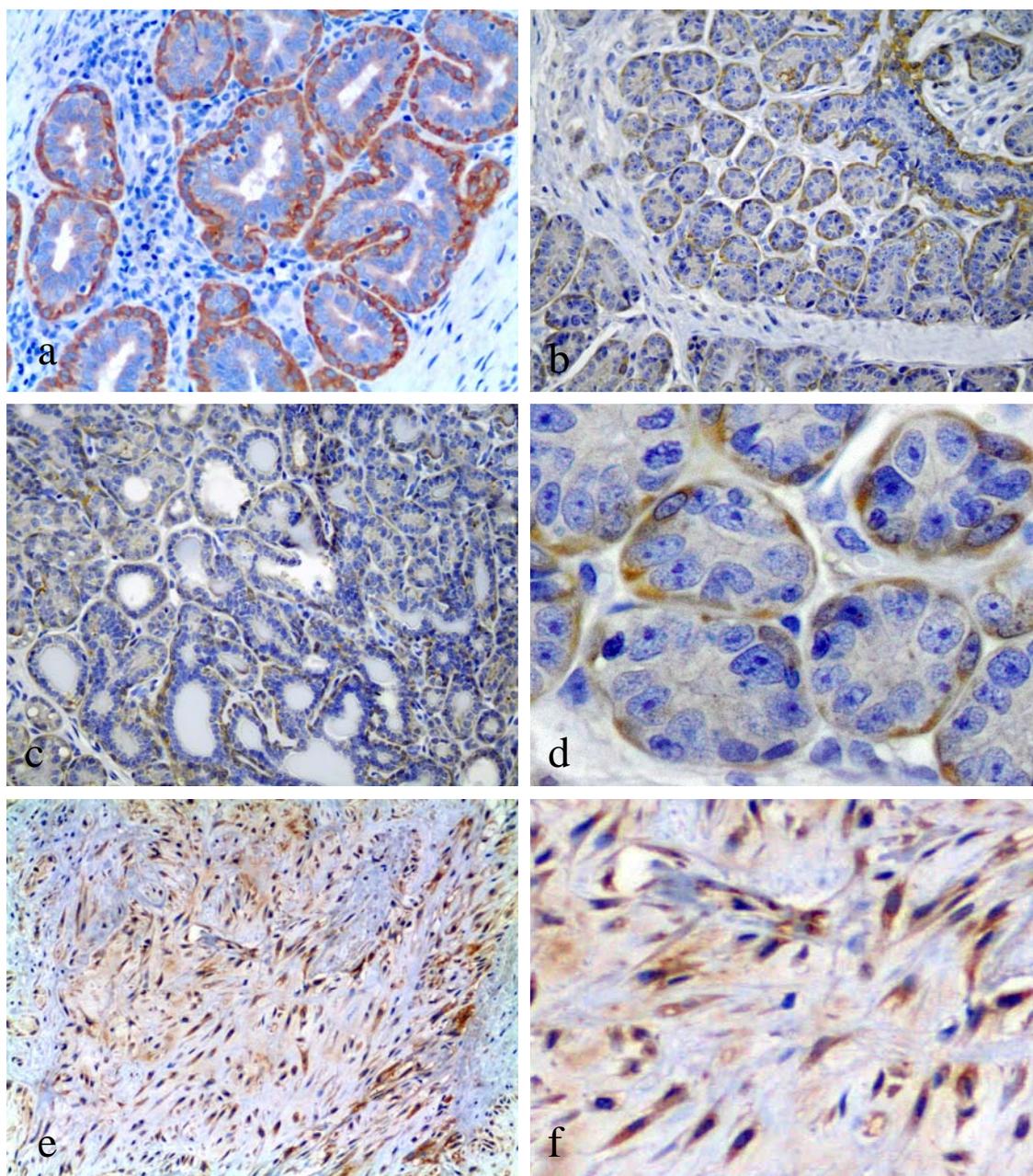


Figura 43. **Expresión de la proteína 14-3-3 σ en neoplasias benignas de mama. Adenomas simples.** a) Expresión en las células mioepiteliales hipertróficas. Las células epiteliales aunque son positivas muestran una menor intensidad de tinción (+). 20x. Clon 5D7. b) y c) Imágenes a pocos aumentos en la que se observan acinos mamarios de escasa atipia con frecuentes luces glandulares. Sólo las células mioepiteliales son positivas. 10x. Clon 5D7. d) Imagen a mayores aumentos donde se observa positividad citoplasmática en las células mioepiteliales pre-existentes. Las células epiteliales son negativas 40x. Clon 5D7. e) Adenoma simple mioepitelial. Imagen a pocos aumentos donde se observa una homogénea positividad en las células mioepiteliales neoplásicas. 10x. Clon 5D7. f) Imagen a mayores aumentos en la que se aprecia positividad en células mioepiteliales de morfología fusiforme y estrellada. 40x. Clon 5D7. IHQ.

Los **adenomas complejos** (n=6) mostraron positividad a nivel de células mioepiteliales pre-existentes y en células mioepiteliales neoplásicas de diferentes tipos morfológicos (fusiformes y estrelladas) en todos los casos. No obstante, la positividad de los grupos de células mioepiteliales fusiformes y estrelladas varió de zona a zona en cada uno de los tumores, observándose tanto nidos de células mioepiteliales negativos como positivos a la expresión de la proteína 14-3-3 σ (Fig. 44) (Tabla 18).

En todos los casos de adenomas complejos se observaron grupos de células epiteliales que expresaron la proteína 14-3-3 σ . Sin embargo, la expresión en el compartimento epitelial también fue heterogénea, observándose grupos de células epiteliales negativas y positivas (Fig. 44) (Tabla 18).

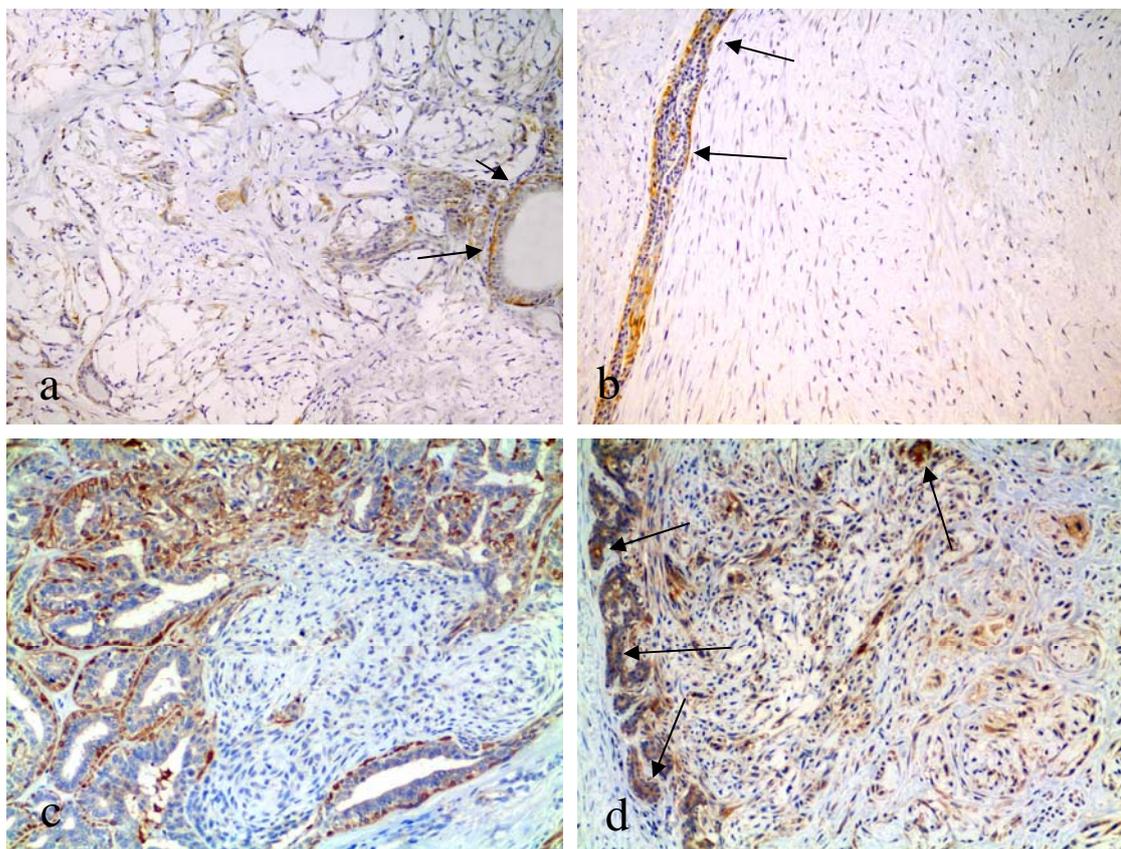


Figura 44. **Expresión de la proteína 14-3-3 σ en neoplasias benignas de mama. Adenomas complejos.** a) Células fusiformes y estrelladas con reacción positiva heterogénea. Se observan células mioepiteliales pre-existentes positivas (flechas). Las células epiteliales son negativas. 10x. Clon 5D7. b) La mayoría de las células mioepiteliales fusiformes y estrelladas son negativas, mientras que las pre-existentes son positivas (flechas). 10x. Clon 5D7. c) Células mioepiteliales pre-existentes positivas (flechas). Las células epiteliales son mayoritariamente negativas. 10x. Clon 5D7. d) Las células mioepiteliales fusiformes y estrelladas son mayoritariamente positivas. Abundantes células epiteliales son positivas (flechas). 10x. Clon 5D7. IHQ.

Los **fibroadenomas** (n=4) examinados se caracterizaron por presentar una proliferación del tejido conectivo asociada a la proliferación de estructuras epiteliales glandulares. Todos los fibroadenomas examinados presentaron expresión de la proteína 14-3-3 σ a nivel de las células mioepiteliales pre-existentes (+++) de ductos y acinos. En todos los casos las células epiteliales resultaron negativas (Fig. 45) (Tabla 18).

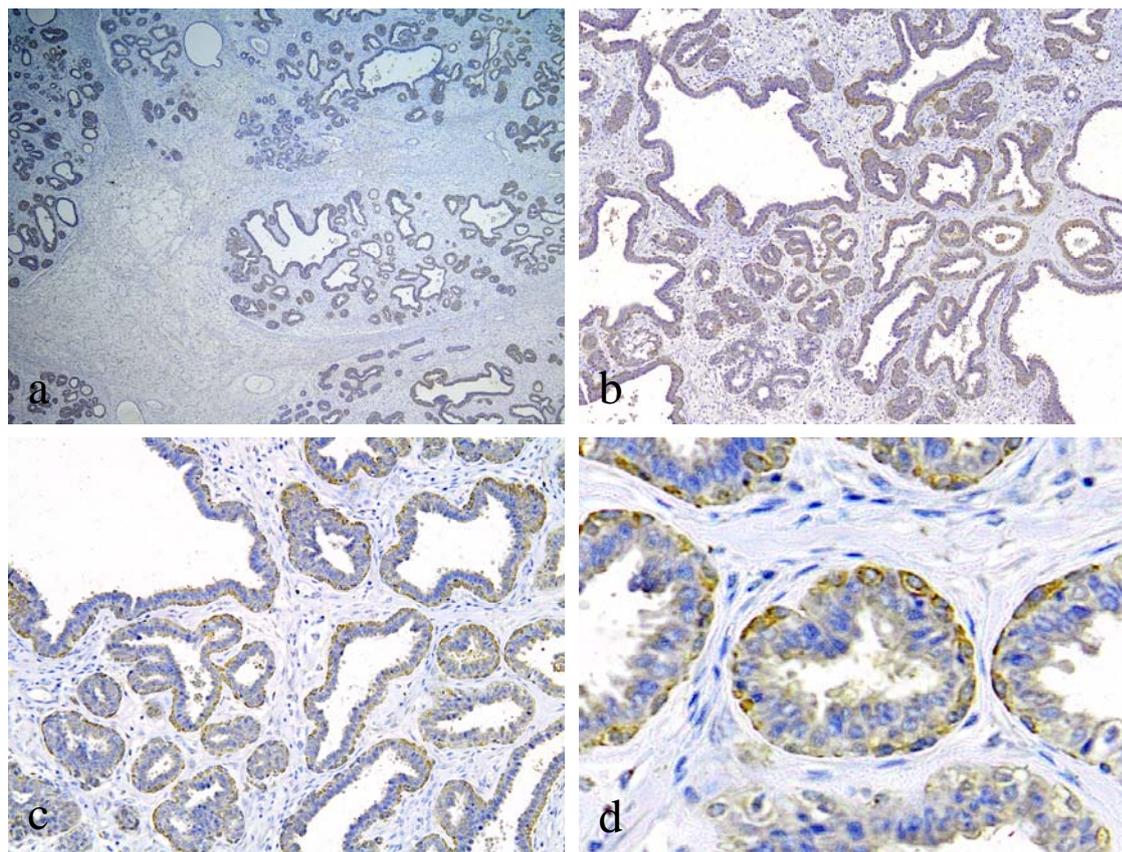


Figura 45. **Expresión de la proteína 14-3-3 σ en neoplasias benignas de mama. Fibroadenomas.** a) y b). Imagen a pocos aumentos donde se observa proliferación del componente conectivo y glandular mamario. 1,25x y (4x) respectivamente. Clon 5D7. c) Se observan ductos y yemas terminales delimitadas por una membrana continua de células mioepiteliales positivas. 10x. Clon 5D7. d) Imagen a grandes aumentos, donde se observan acinos cuyas células epiteliales negativas quedan rodeadas por una banda continua de células mioepiteliales pre-existentes con reacción exclusivamente citoplasmática. 40x. Clon 5D7. IHQ.

4.3.3. NEOPLASIAS MALIGNAS

La expresión inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ se examinó en 63 neoplasias malignas mamarias de la especie canina que pertenecían a los siguientes tipos histológicos: carcinoma simple túbulo-papilar (n=18), carcinoma simple sólido (n=15), carcinoma complejo (n= 15), carcinoma en tumor mixto benigno (n=8), carcinosarcoma (n=2), carcinoma anaplásico (n=1) y carcinoma rico en lípidos (n=3) (Tabla 18).

La proteína 14-3-3 σ se expresó en el 96% de los tumores malignos. Se detectó expresión de la proteína, con diferente proporción e intensidad, a nivel del compartimento mioepitelial en el 88% de los casos examinados, mientras que el compartimento epitelial presentó positividad en el 74% de los casos, igualmente con diferentes grados de intensidad de tinción y proporción de células positivas. En este grupo de neoplasias se detectó un único caso negativo (Tabla 18).

Los **carcinomas simples túbulo-papilares** (n=18) analizados presentaron expresión de la proteína 14-3-3 σ en el compartimento mioepitelial y epitelial en el 72% y en el 83% de los casos, respectivamente. En el compartimento mioepitelial se observó inmunorreacción en las células de morfología pre-existentes. En este tipo histológico también se observó tinción positiva e intensa en células mioepiteliales hipertróficas. Además, cuando éstas presentaron actividad mitótica mostraron intensa inmunorreacción a nivel citoplasmático (Fig. 46a-c) (Tabla 18).

Cuando las neoplasias presentaron mayor grado de desdiferenciación, una mayor proporción de células epiteliales tendieron a presentar inmunotinción citoplasmática. Inversamente, el número de células mioepiteliales de tipo pre-existentes positivas a la inmunotinción con el anticuerpo anti-14-3-3 σ fue menor según la malignidad de las neoplasias aumentaba. De esta manera, se observaron numerosos campos de estructuras tubulares y papilares, constituidas por células epiteliales de moderada/elevada atipia celular, con moderado o intenso inmunomarcaje (Fig. 46d-f).

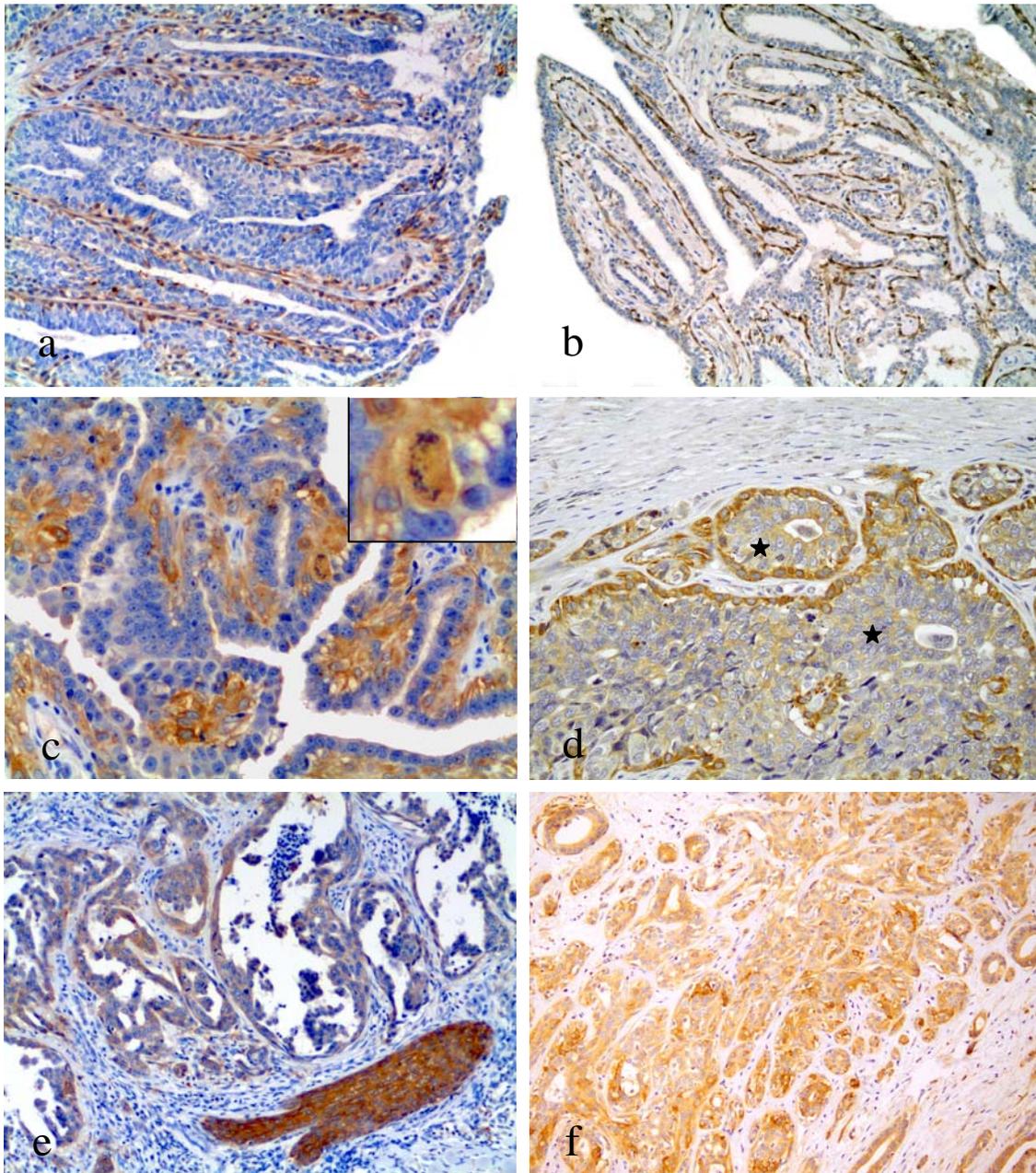


Figura 46. **Expresión de la proteína 14-3-3 σ en neoplasias malignas de mama. Carcinomas simples túbulo-papilares de mama.** a) y b) Se observa inmunotinción de células mioepiteliales pre-existentes. Las células epiteliales son negativas. 10x. Clon 5D7. c) Se observa intensa inmunotinción de células mioepiteliales hipertróficas. *Inset:* Mitosis aberrante en el compartimento mioepitelial. 20x. Clon 5D7. d) Se observa intensa expresión a nivel de células mioepiteliales hipertróficas. Las células epiteliales muestran moderada intensidad de tinción (++) (estrellas). 20x. Clon 5D7. e) Se observa positividad de intensidad moderada (++) en todas las células epiteliales que se encuentran invadiendo el tejido conectivo. No se observan células mioepiteliales pre-existentes. El folículo piloso sirve como control positivo interno. 20x. Clon 5D7. f) Intensa expresión en todas las células epiteliales (+++). 10x. Clon 5D7. IHQ.

En dos carcinomas simples túbulo-papilares se observaron áreas de proliferación neoplásica de tipo sólido, en las que la expresión de la proteína 14-3-3 σ permitió identificar una barrera continua de células mioepiteliales con citoplasma grueso que abrazaba focos de células neoplásicas de elevada atipia celular, siendo algunas de ellas multinucleadas (Carcinoma *in situ*) (Fig. 47).

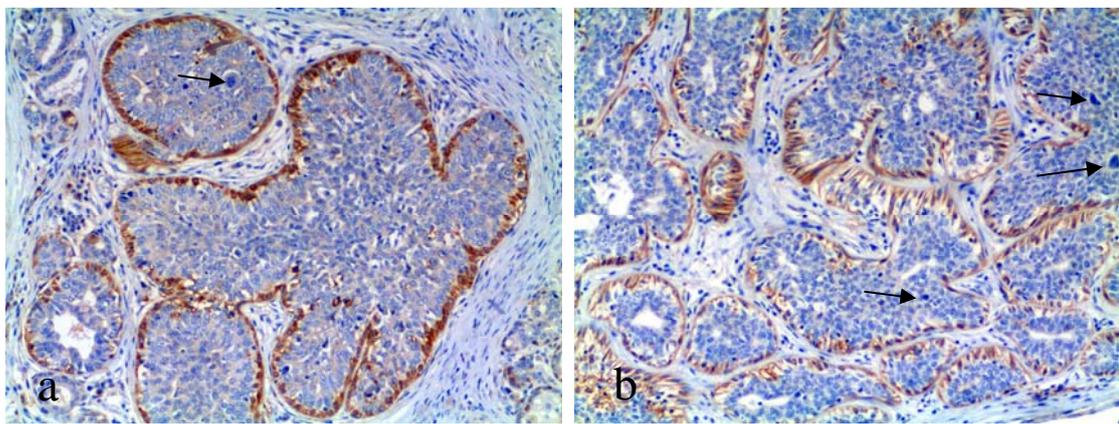


Figura 47. **Expresión de la proteína 14-3-3 σ en neoplasias malignas de mama. Carcinomas simples túbulo-papilares de mama.** a) y b) Dos áreas de carcinoma *in situ* adyacentes a zonas de carcinomas simples túbulo-papilares de mama. La expresión de la proteína 14-3-3 σ permite evidenciar en ambos casos una banda continua de células mioepiteliales. Las células epiteliales presentan evidentes signos de anaplasia celular, observándose incluso algunas células multinucleadas (flechas). 10x. Clon 5D7. IHQ.

En un caso de carcinoma simple túbulo-papilar, que presentó metástasis ganglionar, se observó que algunas células mioepiteliales hipertróficas fueron positivas en el citoplasma y en el núcleo (Fig. 48).

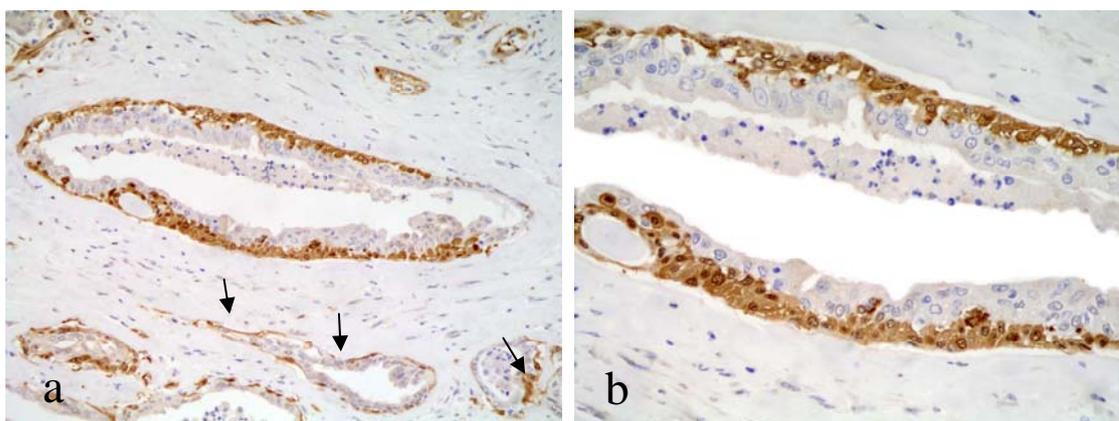


Figura 48. **Expresión de la proteína 14-3-3 σ en neoplasias malignas de mama.** a) Estructura ductal neoplásica con células mioepiteliales hipertróficas positivas. Adyacente se observan acinos histológicamente normales con células mioepiteliales pre-existentes (flechas). 10x. Clon 5D7. b) Se observa positividad citoplasmática y nuclear en las células mioepiteliales hipertróficas. Las células epiteliales son negativas. Este caso presentó metástasis ganglionar inmunohistoquímicamente positiva. 20x. Clon 5D7. IHQ.

En los **carcinomas simples sólidos** (n=15) analizados se observó moderada (++) o intensa (+++) expresión de la proteína 14-3-3 σ en 14 casos. La tinción quedó siempre relegada al citoplasma de las células epiteliales neoplásicas. También en este tipo tumoral, numerosas figuras mitóticas, en ocasiones de tipo bizarro, presentaron positividad (Fig. 49 a-c) (Tabla 18).

El grupo de carcinomas simples sólidos se caracterizó por presentar proliferaciones neoplásicas mal delimitadas y de carácter normalmente infiltrativo y cuyas células neoplásicas crecían a manera de sábana. Ocasionalmente se observaron luces de tipo acinar inmersas en la lesión tumoral. En este grupo, un caso resultó negativo al no observarse ningún tipo de inmunorreacción en las células neoplásicas (Fig. 49 d).

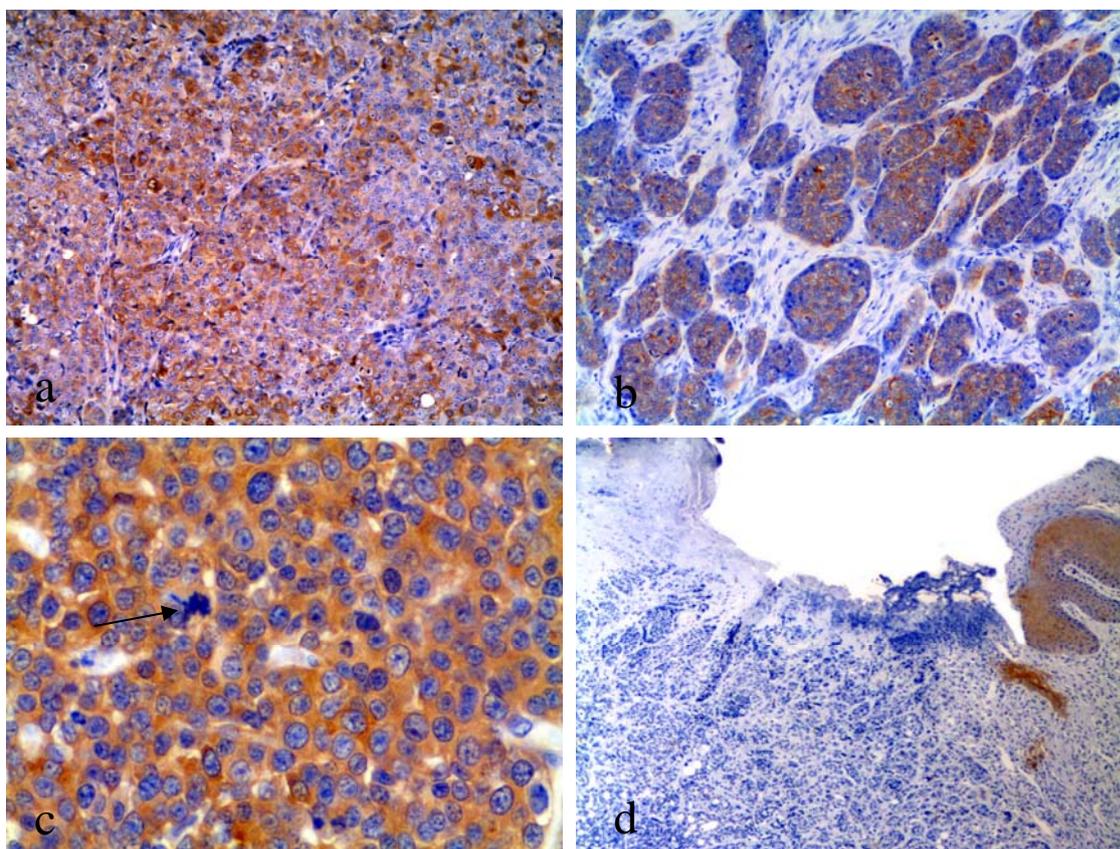


Figura 49. **Expresión de la proteína 14-3-3 σ en neoplasias malignas de mama. Carcinomas simples sólidos de mama.** a), b) y c) Diferentes imágenes que muestran positividad a nivel citoplasmático, en células neoplásicas de morfología epitelial en carcinomas simples sólidos. Obsérvese la inmunorreacción en figuras mitóticas bizarras (flecha). 10x, 10x y 40x, respectivamente. Clon 5D7. d) Este caso de carcinoma simple sólido resultó negativo. 4x. Clon 5D7. IHQ.

Todos los **carcinomas complejos** (n=15) analizados, originados de la proliferación neoplásica de los componentes epitelial y mioepitelial del acino mamario, presentaron expresión de la proteína 14-3-3 σ . Los compartimentos mioepitelial y epitelial presentaron expresión de la proteína 14-3-3 σ en un 100% y en un 80% de los casos, respectivamente (Tabla 18). En general, la proteína 14-3-3 σ se expresó en las células mioepiteliales pre-existentes, visibles fácilmente con hematoxilina-eosina, sobre la que descansaban las células epiteliales neoplásicas. Además, se observaron numerosos focos de células mioepiteliales de morfología fusiforme y estrellada formando estructuras a manera de ovillo con variable cantidad de matriz extracelular, similares a los observados en los adenomas complejos. Estas células presentaron positividad en diferente proporción e intensidad (+, ++, +++) de tinción. Se observó una progresiva pérdida de expresión en estas formas de células mioepiteliales (fusiformes, estrelladas y redondas) (Fig. 50 a-e).

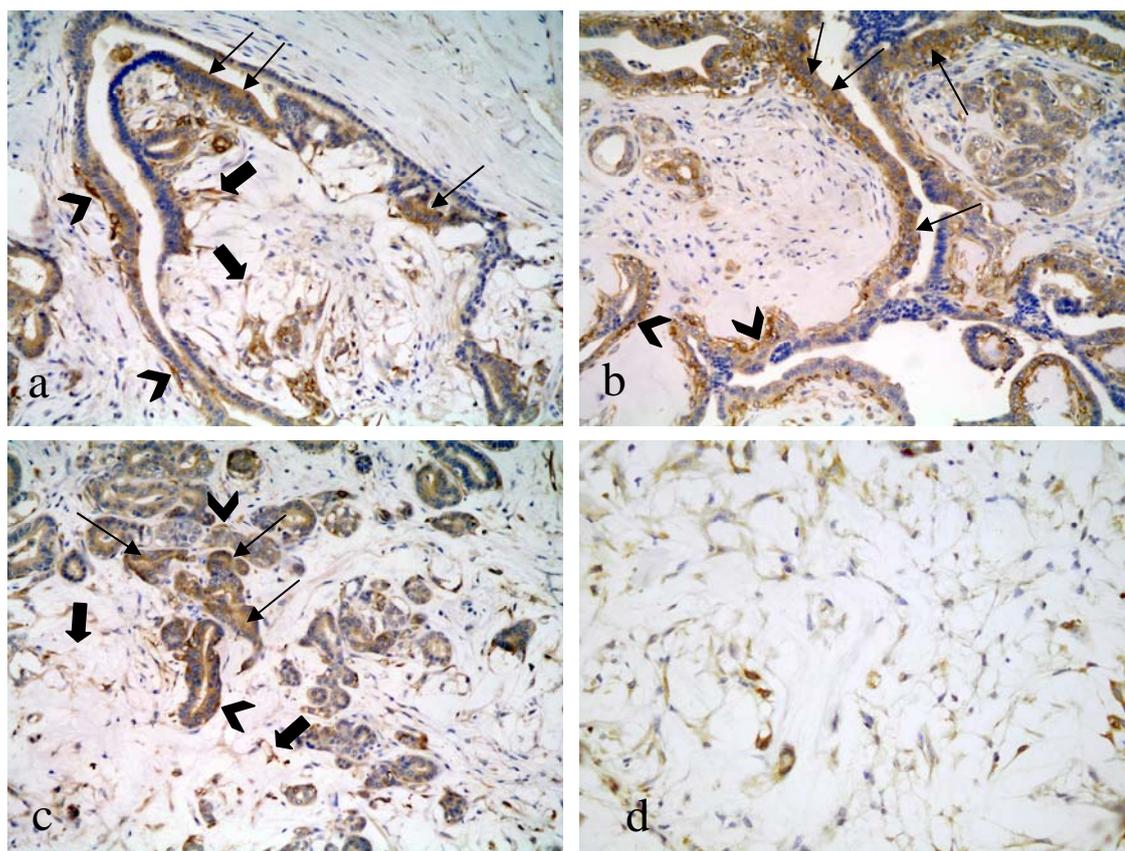


Figura 50. **Expresión de la proteína 14-3-3 σ en neoplasias malignas de mama. Carcinomas complejos.** a), b) y c). Diferentes imágenes donde se observa inmunotinción de células mioepiteliales pre-existentes (cabeza de flecha) y fusiformes (flecha gruesa). Grupos de células epiteliales son también positivas (flecha fina). 10x. Clon 5D7. d) Nidos de células fusiformes que presentan positividad heterogénea en intensidad y proporción. 10x. Clon 5D7. IHQ.

Los **carcinomas en tumor mixto benigno** (n=8), compuestos por la proliferación neoplásica de células epiteliales y mioepiteliales asociada a la presencia de tejido condroide y/u osteoide, presentaron un patrón de tinción similar al de los carcinomas complejos. Todos los casos presentaron positividad en ambos compartimentos (epitelial y mioepitelial). Adicionalmente, en este tipo tumoral se observó inmunotinción de condrocitos en los focos de metaplasia de tipo condroide (Fig. 51) (Tabla 18).

En los casos en los que existió metaplasia osteoide, las células asociadas a la producción de matriz de hidroxapatita (osteoblastos) fueron siempre negativas, no así las células epiteliales neoplásicas que quedaron embebidas en la matriz extracelular que fueron moderada (++) o intensamente (+++) positivas (Fig. 51).

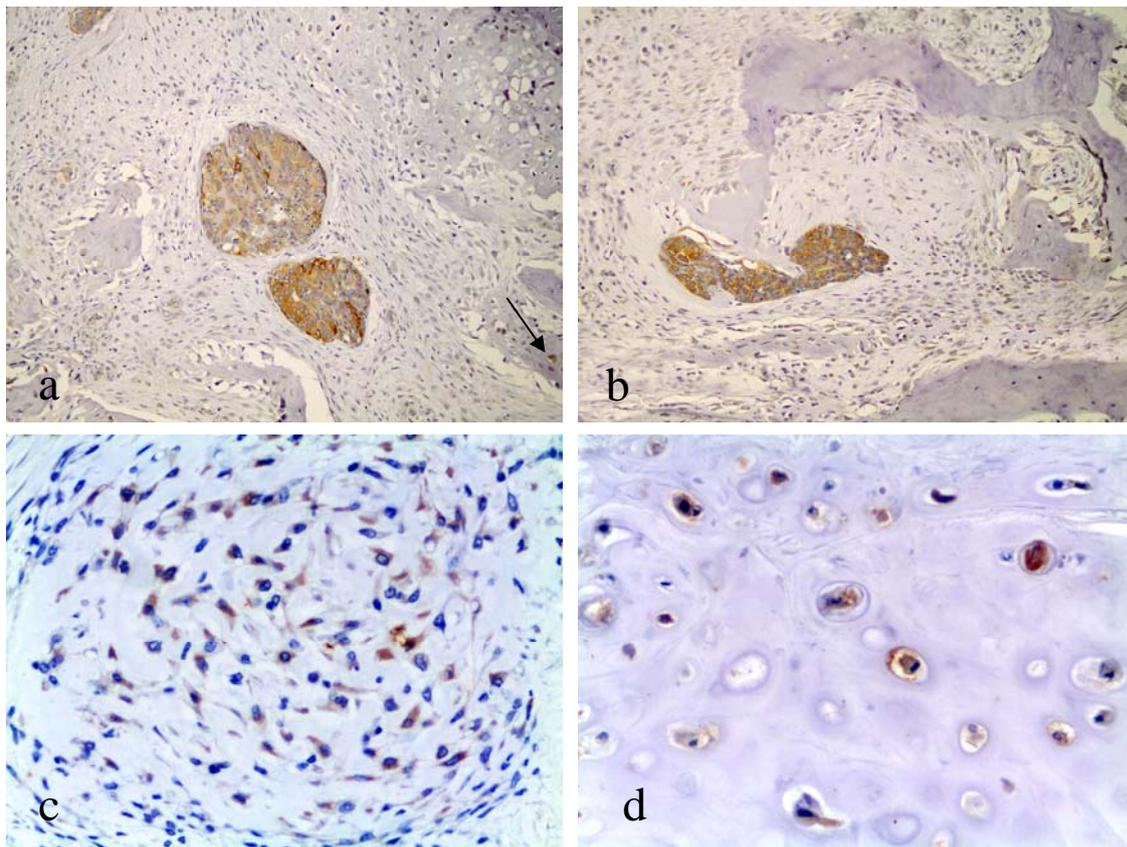


Figura 51. **Expresión de la proteína 14-3-3 σ en neoplasias malignas de mama. Carcinomas en tumor mixto benigno.** a) y b) Intensa expresión a nivel de células epiteliales. El tejido conectivo y la mayoría de los grupos isógenos, así como el tejido óseo, son negativos. Algunos condrocitos resultan positivos (flecha). 10x. Clon 5D7. C) Células mioepiteliales fusiformes y estrelladas expresando positividad heterogénea. 20x. Clon 5D7. d) Imagen a grandes aumentos en la que se observa positividad en los condrocitos de la metaplasia condroide. 40x. Clon 5D7. IHQ.

Los dos **carcinosarcomas** (n=2) analizados presentaron una intensa (+++) expresión de la proteína 14-3-3 σ a nivel de las células epiteliales, siendo el componente mesenquimal negativo. Las células mioepiteliales pre-existentes fueron positivas (Tabla 18).

En esta serie se analizó un **carcinoma anaplásico** (n=1) que expresó la proteína 14-3-3 σ en un número variable de células neoplásicas con diferentes tipos de intensidad de tinción. Mientras que algunas células mostraron una intensidad de marcaje intenso o moderado, otras fueron negativas. Se observaron células neoplásicas en mitosis que expresaron la proteína a nivel citoplasmático. Las células mioepiteliales pre-existentes fueron positivas (Fig. 52) (Tabla 18).

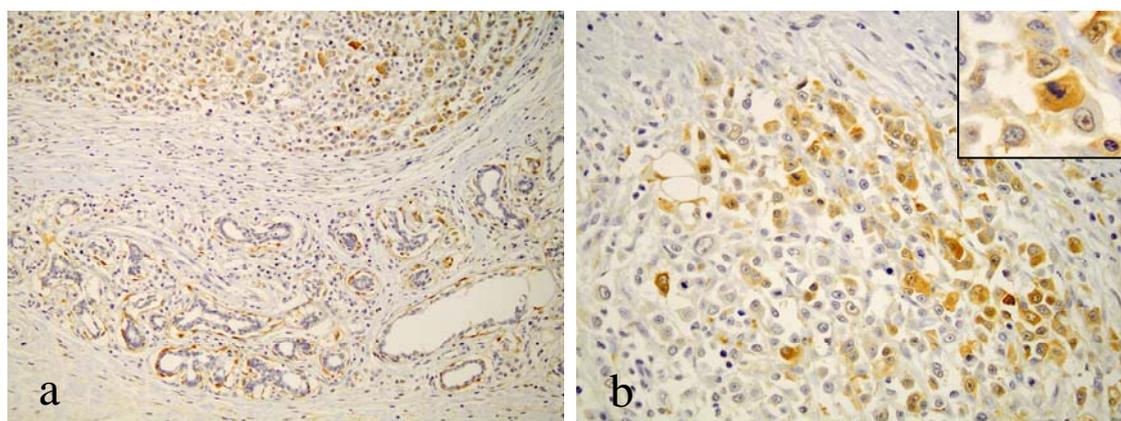


Figura 52. **Expresión de la proteína 14-3-3 σ en neoplasias malignas de mama. Carcinoma anaplásico.** a) Estructuras glandulares histológicamente normales mostrando intensa reacción a nivel de las células mioepiteliales pre-existentes (parte inferior de la imagen). En la parte superior de la imagen se observan células neoplásicas epiteliales infiltrativas de intensidad similar a las de las células mioepiteliales. 10x. Clon 5D7. b) Heterogénea positividad en células epiteliales neoplásicas de elevada anaplasia. *Inset*: Se observan figuras mitóticas con intensa positividad. 20x y 40x, respectivamente. Clon 5D7.IHQ.

El último de los tipos histológicos analizados en esta serie, fue el de los **carcinomas ricos en lípidos** (n=3). En todos los casos se observó intensa expresión (+++) de la proteína 14-3-3 σ en las células epiteliales neoplásicas, incluso en aquellas que se encontraban en mitosis. La tinción de células mioepiteliales fue mínima y se redujo a células mioepiteliales pre-existentes de áreas de glándula mamaria normal adyacente a los crecimientos neoplásicos (Fig. 53) (Tabla 18).

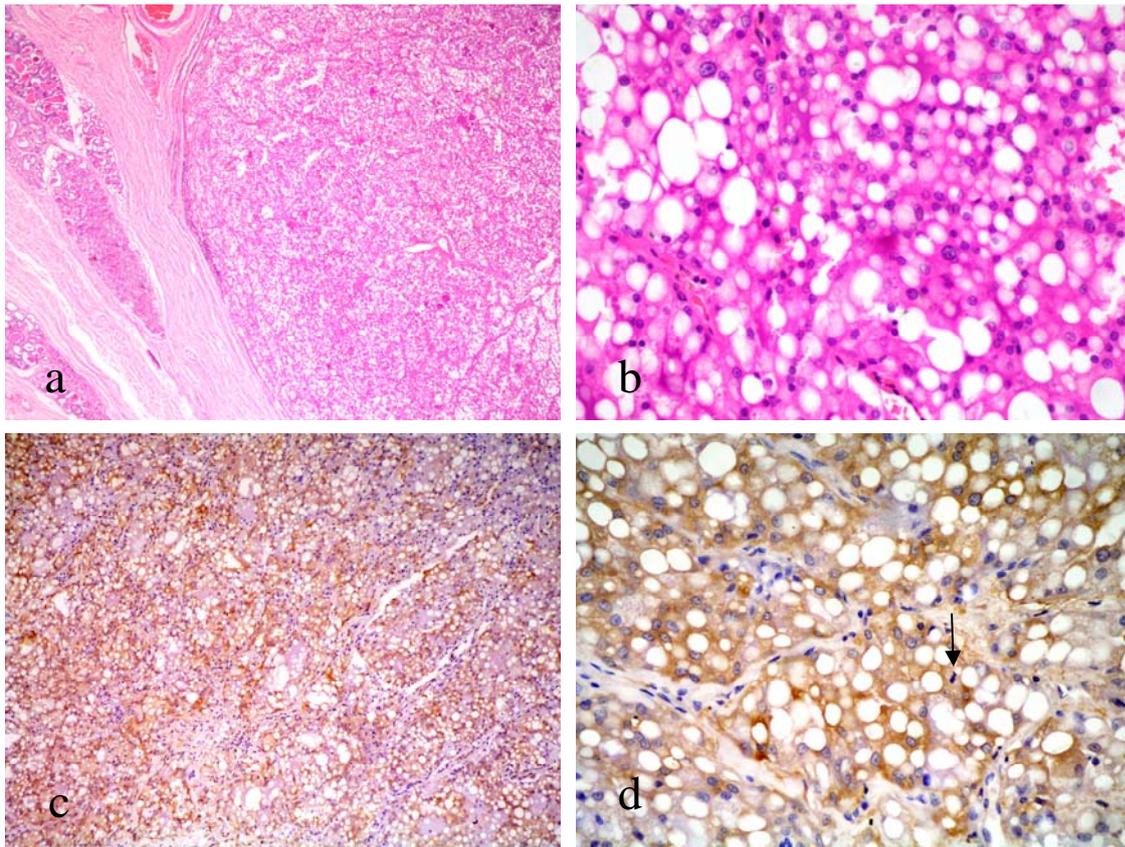


Figura 53. **Expresión de la proteína 14-3-3 σ en neoplasias malignas de mama. Carcinomas ricos en lípidos.** a) y b) Secciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina que muestran las características vacuolas lipídicas intracitoplasmáticas de este tipo histológico. 4x y 20x, respectivamente. HE. c) y d) Imágenes a pocos y mayores aumentos que muestran la positividad de las células neoplásicas epiteliales cargadas de vacuolas lipídicas. Obsérvese la inmunotinción citoplasmática de células en mitosis (flecha). 10x y 20x, respectivamente. Clon 5D7. IHQ.

4.3.4. INVASIONES VASCULARES

Se observó invasión de células neoplásicas en el interior de vasos linfáticos en 15 carcinomas de la serie examinada: 4 carcinomas simples túbulo-papilares, 8 carcinomas simples sólidos, 2 carcinomas ricos en lípidos y 1 carcinoma anaplásico. Las células epiteliales neoplásicas en estas invasiones vasculares se encontraban aisladas o formando estructuras sólidas y/o tubulares. En 14 de las 15 invasiones vasculares se observó positividad moderada/intensa (++)/+++ en las células neoplásicas (Fig. 54).

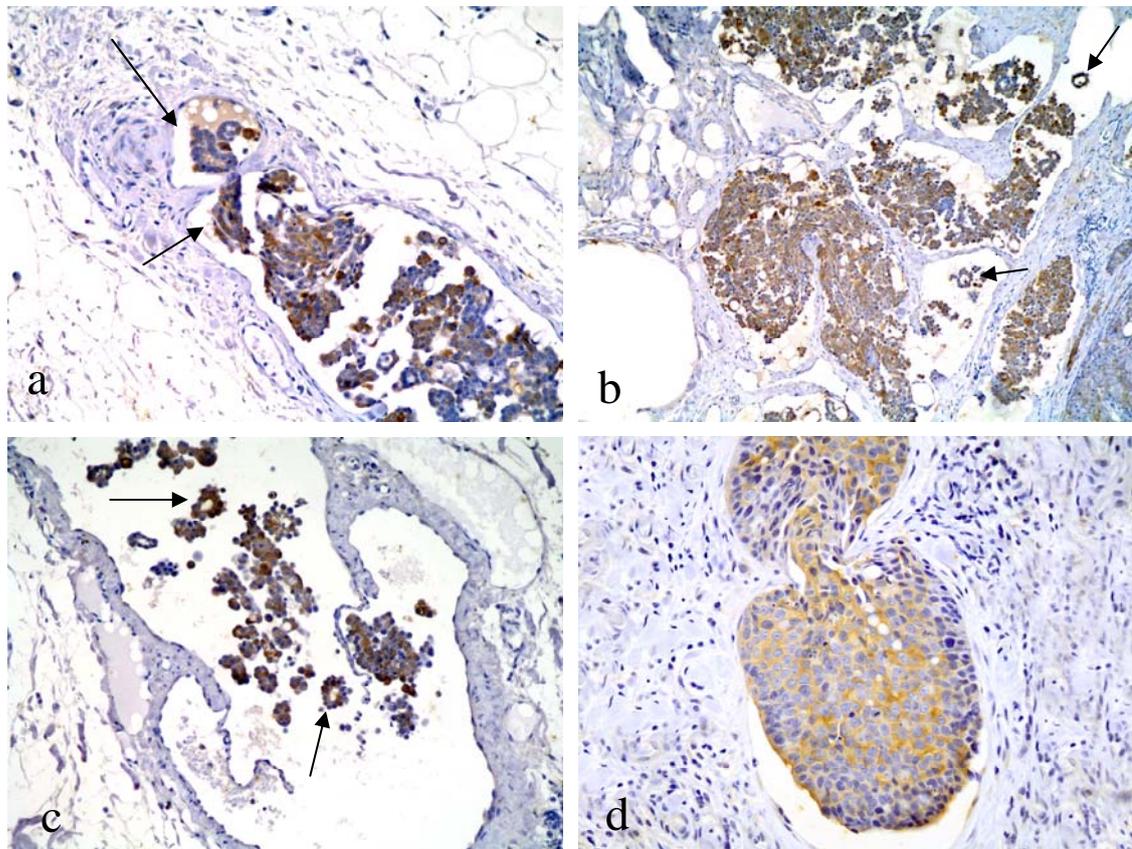


Figura 54. **Expresión de la proteína 14-3-3 σ en invasiones vasculares de neoplasias de mama malignas.** a), b), c) y d) Diferentes imágenes que muestran intensa reacción citoplasmática en las células epiteliales neoplásicas. Algunos grupos de células forman estructuras con morfología de acino glandular (flechas). 10x, 4x, 10x y 20x, respectivamente. Clon 5D7. IHQ.

4.3.5. METÁSTASIS

Trece de los carcinomas analizados inmunohistoquímicamente presentaron metástasis en nódulo linfático regional: 3 carcinomas simples túbulo-papilares, 6 carcinomas simples sólidos, 2 carcinomas ricos en lípidos y un carcinoma complejo. Se observaron tres tipos morfológicos de metástasis. El primer tipo de metástasis (bien diferenciada) (n=3) se caracterizaba por presentar una proliferación neoplásica de estructuras glandulares a manera de acinos, compuestos por células epiteliales lumbinales y células mioepiteliales fácilmente identificables, con luces claramente definidas. Estos acinos se encontraban asociados a estructuras ductales dilatadas, en cuyo interior se observó una secreción acidófila. Un segundo tipo morfológico de metástasis (moderadamente diferenciada) (n=2) consistió en proliferaciones neoplásicas de crecimiento sólido, cuyas células aparecían estrechamente empaquetadas y rodeadas por una fina capa de células con moderada cantidad de citoplasma. Por último, se observaron metástasis (pobremente diferenciadas) (n=8) constituidas por proliferaciones neoplásicas sólidas de elevada desdiferenciación sin patrón arquitectónico definido.

En 12 de los 13 ganglios con crecimientos neoplásicos se observó moderada a intensa (++/+++) expresión de la proteína 14-3-3 σ en las células epiteliales neoplásicas.

El primer tipo morfológico de metástasis presentó una expresión homogénea de la proteína 14-3-3 σ tanto en las células epiteliales como en las células mioepiteliales de los acinos. No obstante, la expresión en las células mioepiteliales fue siempre de mayor intensidad. El segundo tipo morfológico de metástasis presentó una generalizada expresión de la proteína 14-3-3 σ . Sin embargo, se observó mayor intensidad en las células de la periferia del crecimiento metastásico, identificadas como células mioepiteliales. El último tipo morfológico de metástasis expresó la proteína 14-3-3 σ de manera homogénea en todas las células neoplásicas que la componían (Fig. 55a-d).

Un caso de carcinoma simple túbulo-papilar presentó, además de metástasis en nódulo linfático, metástasis en bazo. Las células neoplásicas de

dicha metástasis fueron positivas en su mayoría presentando diferentes intensidades de inmunotinción (+, ++, +++) (Fig. 55e y f).

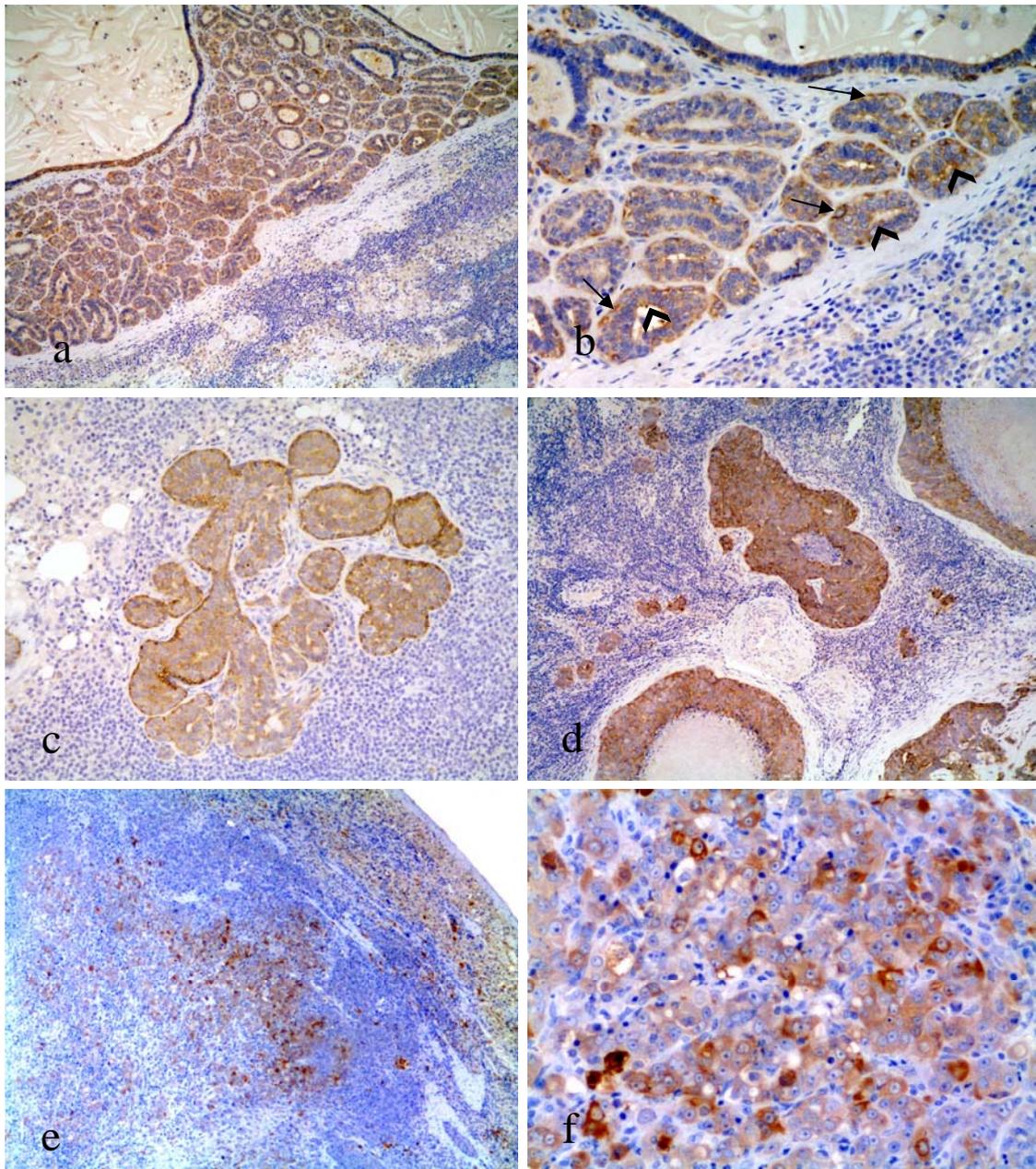


Figura 55. **Expresión de la proteína 14-3-3 σ en carcinomas metastásicos.** a) y b) Imágenes a pocos y mayores aumentos donde se observa una metástasis bien diferenciada. En b) se observan células mioepiteliales (flechas) y epiteliales (cabezas de flecha) positivas. Las células mioepiteliales presentan mayor intensidad de tinción. 10x y 20x, respectivamente. Clon 5D7. c) Metástasis moderadamente diferenciada en la que se aprecia una mayor intensidad de tinción en la periferia de la lesión. 10x. Clon 5D7. d) Metástasis indiferenciada en la que se observan crecimientos sólidos de tinción homogénea. 10x. Clon 5D7. e) Foco de metástasis en bazo. Se observa positividad en las células neoplásicas. 4x. Clon 5D7. f) Imagen a grandes aumentos de la sección anterior en la que se observan células neoplásicas con diferentes intensidades de reacción. 40x. Clon 5D7. IHQ.

4.3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cada preparación histológica recibió un valor total de números enteros, que varió desde 0 a 12, y que se obtuvo a partir de multiplicar el valor asignado a la proporción de células positivas por el valor asignado a la intensidad de la inmunotinción de las células. Dicho valor total se obtuvo tanto para el compartimento epitelial como para el mioepitelial.

El análisis estadístico permitió evidenciar diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los compartimentos mioepitelial y epitelial y entre los tejidos no neoplásicos (GMN), displásicos (DM), tumores benignos (TB) y tumores malignos (TM) (Tabla 19, 20 y 21) (Fig. 56).

Se observaron diferencias significativas entre los valores totales de las células mioepiteliales (CME) y células epiteliales (CE) positivas presentando una relación inversa en la mama normal, displásica y neoplasias benignas y malignas (Tabla 19) (Fig. 56).

Tabla 19. Análisis estadístico de la comparación entre los valores totales entre compartimentos mioepitelial y epitelial en el mismo grupo de tejidos.

Tejido	Valor CME	Valor CE	p
GMN	12±0 12 (12-12)	0.32±0.67 0(0-1)	<0.001
DM	7.9±3 9 (6-9)	1.1±2.2 0(0-2)	<0.001
TB	8.3±4.1 8(4-12)	1.4±1.7 1(0-2)	<0.001
TM	3.9±4 3(0-6)	6.1±4.6 6(2-12)	<0.001
Media, ±SD y mediana, (P ₂₅ -P ₇₅). GMN: Glándula mamaria normal; DM: Displasia mamaria; TB: Tumores benignos; TM: Tumores malignos; CME: Células mioepiteliales; CE: Células epiteliales			

También se analizaron las relaciones entre los valores de ambos compartimentos con respecto al grupo de tejidos. Este análisis evidenció diferencias significativas en la mayoría de los grupos. No se observaron diferencias significativas en el valor total de las ME entre los TB y las DM. Tampoco se observaron diferencias en el valor total de las CE entre la GMN y los TB ni entre las DM y los TB. Así mismo, cuando se aplicó la corrección de

Bonferroni para múltiples test, las diferencias significativas siguieron siendo significativas (Tablas 20 y 21).

Tabla 20. Diferencias significativas y no significativas entre los valores totales de los compartimentos mioepitelial y epitelial y entre grupos de tejidos.

Tejido	GMN	DM	TB	TM
GMN	-	<.001	<.001	<.001
DM	.211	-	.471	<.001
TB	.001	.187	-	0.001
TM	<.001	<.001	<.001	-

P valores en comparación de grupos. CME encima de la diagonal. CE debajo de la diagonal. Valores no corregidos para múltiples test. GMN: Glándula mamaria normal; DM: Displasia mamaria; TB: Tumores benignos; TM: Tumores malignos

Tabla 21. Diferencias significativas y no significativas entre los valores totales de los compartimentos mioepitelial y epitelial y entre grupos de tejidos. Corregido para acumulación de error tipo 1.

Tejido	GMN	DM	TB	TM
GMN	-	<.001	<.001	<.001
DM	1	-	1	<.001
TB	.001	1	-	0.006
TM	<.001	<.001	<.001	-

P valores comparing groups. CME encima de la diagonal. CE debajo de la diagonal. Correcciones de Bonferroni para múltiples test. GMN: Glándula mamaria normal; DM: Displasia mamaria; TB: Tumores benignos; TM: Tumores malignos

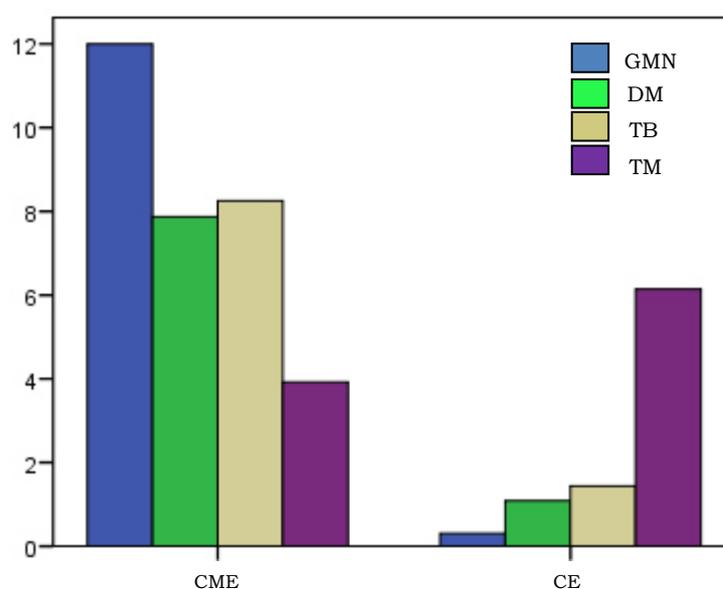


Figura 56. **Expresión de la proteína 14-3-3σ en neoplasias de mama caninas.** Representación gráfica de la variación de los valores totales de expresión de la proteína 14-3-3σ en los compartimentos mioepitelial y epitelial con respecto a los grupos de tejido analizados.

4.4. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA 14-3-3 σ EN TEJIDOS NORMALES, DISPLÁSICOS Y NEOPLÁSICOS MAMARIOS DE LA ESPECIE CANINA MEDIANTE WESTERN BLOT

En un total de 12 casos se pudo obtener tejido fresco para la detección de la proteína 14-3-3 σ mediante Western blot. Estos casos pertenecieron a los siguientes tipos histológicos: adenoma simple (T2), carcinoma simple túbulo-papilar (T5, T6, T8, T10, T11 y T12), carcinoma simple sólido (T9) y carcinoma complejo (T1, T3, T4 y T7). De dos de estos tumores (T2 y T9) se obtuvo nódulo linfático regional: nódulo linfático sin metástasis (L1) y nódulo linfático con metástasis (L2) (Fig.57).

La incubación con el clon 5D7 permitió identificar una banda proteica del peso esperado, 30 kD, en todos los homogeneizados de tejido neoplásico de origen mamario. Además, el homogeneizado de nódulo linfático que histológicamente presentaba enfermedad metastásica, y que fue positivo inmunohistoquímicamente, resultó también positivo para la expresión de la proteína 14-3-3 σ (L2). Por su parte, el homogeneizado de nódulo linfático que fue histológicamente negativo para metástasis no expresó la proteína 14-3-3 σ (L1).

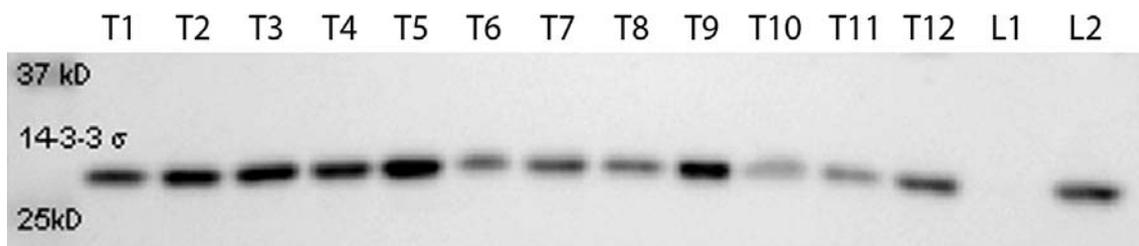


Figura 57. **Expresión de la proteína 14-3-3 σ en homogeneizados de tumor de mama caninos, nódulo linfático y nódulo linfático con metástasis.** Se observan bandas positivas únicas a la altura de 30 kD. T1-T12 representan homogeneizados de tumores de mama. L1 y L2 representan nódulos linfáticos sin y con metástasis, respectivamente. Clon 5D7.

4.5. CO-EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS 14-3-3 σ Y p63 EN TEJIDOS NORMALES Y NEOPLÁSICOS MAMARIOS DE LA ESPECIE CANINA

Se determinó la co-expresión de las proteínas 14-3-3 σ y p63 en 35 casos que previamente habían sido positivos al análisis inmunohistoquímico de la proteína 14-3-3 σ . De ellos, dos eran glándulas mamarias normales y 33 eran carcinomas, que incluían tanto simples túbulo-papilares (n=7), simples sólidos (n=15), complejos (n=7), carcinomas en tumor mixto benigno (n=3), y carcinosarcoma (n=1).

Las inmunorreacciones positivas fueron visualizadas de color marrón e intracitoplasmática para el anticuerpo anti-proteína 14-3-3 σ y de color rojo y localización nuclear para el anticuerpo anti-proteína p63.

De acuerdo con el patrón de inmunorreacción de ambas proteínas se observaron cuatro inmunofenotipos de tinción. De esta manera, se observaron células 14-3-3 σ +/p63 + (+/+), células 14-3-3 σ +/p63 - (+/-), células 14-3-3 σ -/p63 + (-/+) y células 14-3-3 σ -/p63 - (-/-). Los fibroblastos del tejido conectivo siempre fueron -/-.

4.5.1. CONTROLES POSITIVOS

El control positivo técnico (piel canina) presentó inmunoprecipitados en las localizaciones esperadas. Se observó co-expresión de las proteínas 14-3-3 σ y p63 (células +/+) a nivel de los queratinocitos. La proteína 14-3-3 σ , detectada por el inmunoprecipitado de color marrón, se detectó a nivel citoplasmático y de manera homogénea en todas las pieles analizadas. La proteína p63, identificado por un inmunoprecipitado de color rojo, se detectó en los núcleos de los queratinocitos, especialmente aquellos del estrato basal. También se observó inmunorreacción en los queratinocitos de folículos pilosos. Se detectó una variabilidad en la co-expresión de ambas proteínas, de tal manera que, tanto en epidermis como a nivel de los folículos pilosos, se observaron células que expresaron 14-3-3 σ pero no p63 (células +/-) (Fig. 58).

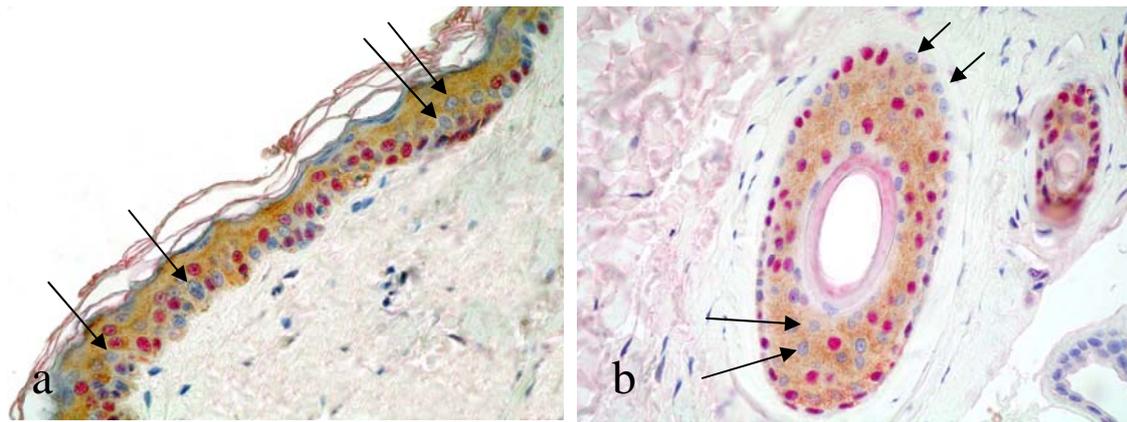


Figura 58. **Co-expresión de las proteínas 14-3-3 σ y p63 en piel canina.** a) Las proteínas 14-3-3 σ (marrón) y p63 (rojo) se observaron en piel canina tiñendo diferentes estratos de la epidermis. Algunas células 14-3-3 σ positivas no presentaron expresión de p63 (flechas). 20x. b) La membrana radicular externa del folículo piloso presentó una expresión homogénea de la proteína 14-3-3 σ . Algunas células 14-3-3 σ positivas no presentaron expresión de p63 (flechas). 20x. Clones 5D7 y 4A4. Doble IHQ.

4.5.2. GLÁNDULA MAMARIA NORMAL

En la **glándula mamaria normal** se observó una población de células +/+, que se correspondieron con células mioepiteliales claramente visibles con la técnica de hematoxilina-eosina, mientras que las células epiteliales y mesenquimales fueron células -/- (Fig. 59).

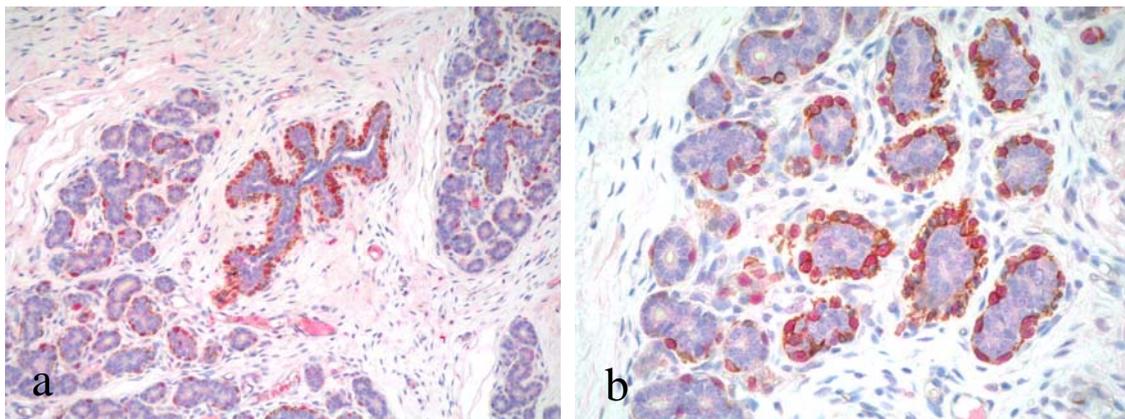


Figura 59. **Co-expresión de las proteínas 14-3-3 σ y p63 en glándula mamaria normal canina.** a) Imagen a pocos aumentos donde se observan varios lóbulos y un ducto cuyo compartimento mioepitelial queda limitado a una banda continua de células cuyo citoplasma (marrón) expresa la proteína 14-3-3 σ y el núcleo (rojo) la proteína p63. 10x. b) Acinos mamarios delimitados por células mioepiteliales de fino citoplasma con la misma inmunotinción que en la imagen anterior. El tejido conectivo no presenta inmunotinción. 20x. Clones 5D7 y 4A4. Doble IHQ.

4.5.3. NEOPLASIAS MALIGNAS

De los **carcinomas simples túbulo-papilares** (n=7), tres mostraron células **+/+** formando una capa simple y continua en torno a las células epiteliales neoplásicas (células **-/-**). Los restantes cuatro casos de carcinomas simples túbulo-papilares presentaron tres poblaciones celulares diferentes: células **+/+**, identificadas como células mioepiteliales fácilmente visibles con la hematoxilina-eosina, células **+/-**, identificadas como células neoplásicas de morfología epitelial, y células **-/-**, de morfología epitelial. En un caso de carcinoma simple túbulo-papilar se observaron células neoplásicas **+/-** infiltrando el estroma y rodeando estructuras tubulares que conservaron células de morfología claramente mioepitelial de tipo pre-existentes con inmunofenotipo **+/+** (Fig. 60).

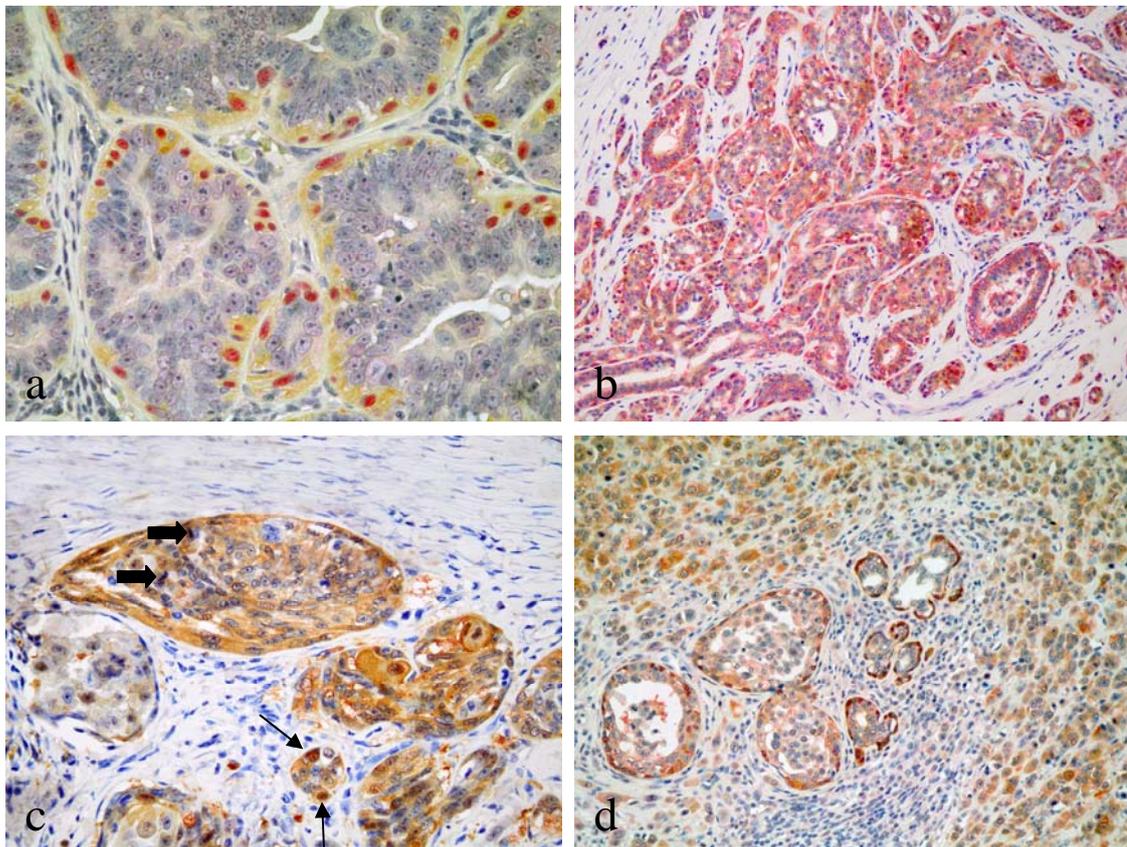


Figura 60. **Co-expresión de las proteínas 14-3-3 σ y p63 en carcinomas simples túbulo-papilares de mama.** a) Grupo de células mioepiteliales con inmunofenotipo **+/+** rodeando las células epiteliales neoplásicas de tipo **-/-**. 40x. b) Estructuras tubulares constituidas por células **+/+** y **+/-**. Las células del tejido conectivo son **-/-**. 10x. c) Se observan abundantes células neoplásicas **+/-**, algunas de ellas en mitosis (flechas gruesas) y escasas células **+/+** (flechas finas). 20x. d) Se observa una abundante población de células neoplásicas **+/-** que infiltran el tejido conectivo y rodean estructuras tubulares neoplásicas 10x. Clones 5D7 y 4A4. Doble IHQ.

La co-expresión de las proteínas 14-3-3 σ y p63 se analizó en 15 casos de **carcinomas simples sólidos**. De estos, en 6 casos se observó una población difusa de células neoplásicas del tipo +/- . En estos casos, al igual que en el análisis inmunohistoquímico simple, se observaron figuras mitóticas positivas para la expresión de 14-3-3 σ . En 9 casos restantes se observó una población difusa de células neoplásicas de morfología epitelial, con la hematoxilina-eosina, de inmunofenotipo +/+ (Fig. 61).

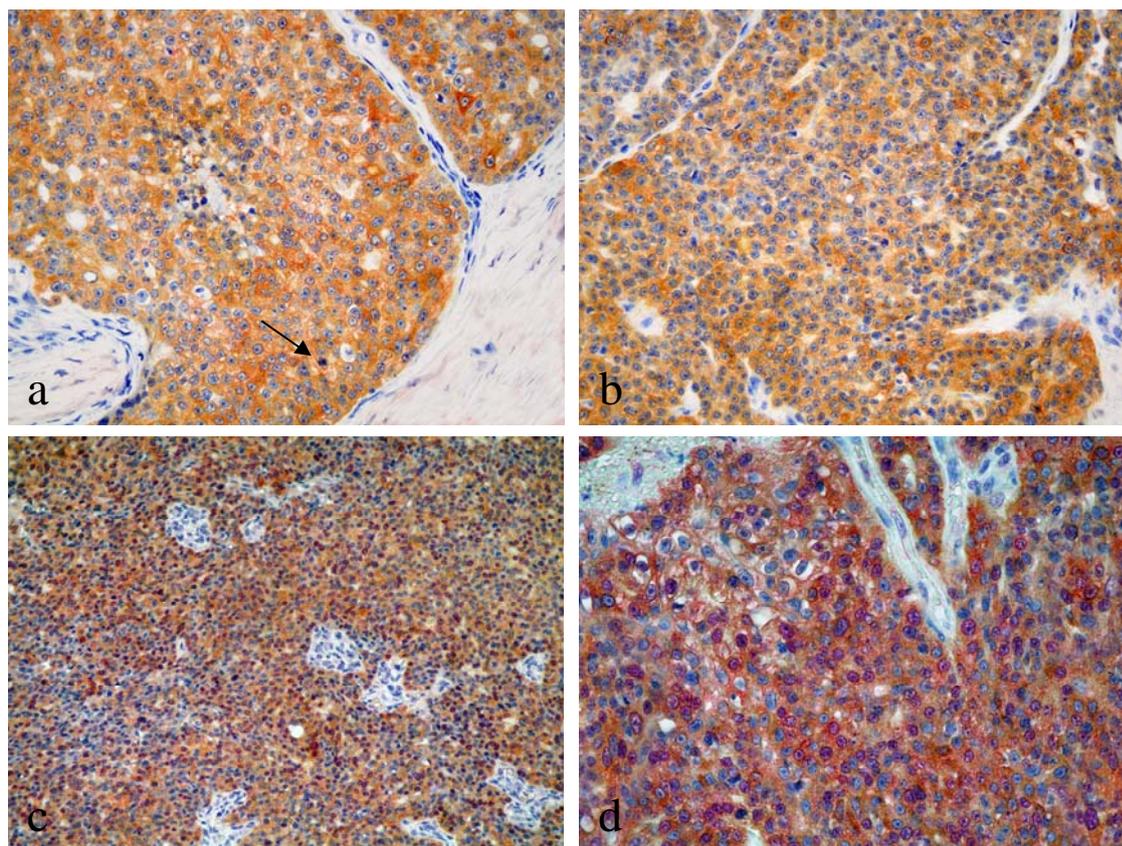


Figura 61. **Co-expresión de las proteínas 14-3-3 σ y p63 en carcinomas simples sólidos de mama.** a) y b) Presencia de una población difusa de células neoplásicas +/- . Células +/- en mitosis (flecha). 40x. c) y d) Dos casos en los que se observa una doble población de células +/+ y +/- . En d) predominan las células +/+. 10x y 40x, respectivamente. Clones 5D7 y 4A4. Doble IHQ.

En los **carcinomas complejos** (n=7) analizados se observaron tres tipos celulares: a) células +/+, identificadas como células mioepiteliales pre-existentes, fusiformes y/o estrelladas, según su morfología con la hematoxilina-eosina, b) células +/- , identificadas como células epiteliales, y c) células -/- , identificadas como células mioepiteliales fusiformes y/o estrelladas (Fig. 62a y b).

Los **carcinomas de tipo mixto** (n=3) presentaron un patrón de inmunotinción similar al de los carcinomas complejos, exhibiendo las mismas poblaciones celulares. Además, en este tipo histológico, los condrocitos presentaron tres tipos de inmunofenotipos, observando condrocitos +/-, -/+ y -/-. No se observaron condrocitos +/+ (Fig. 62c y d).

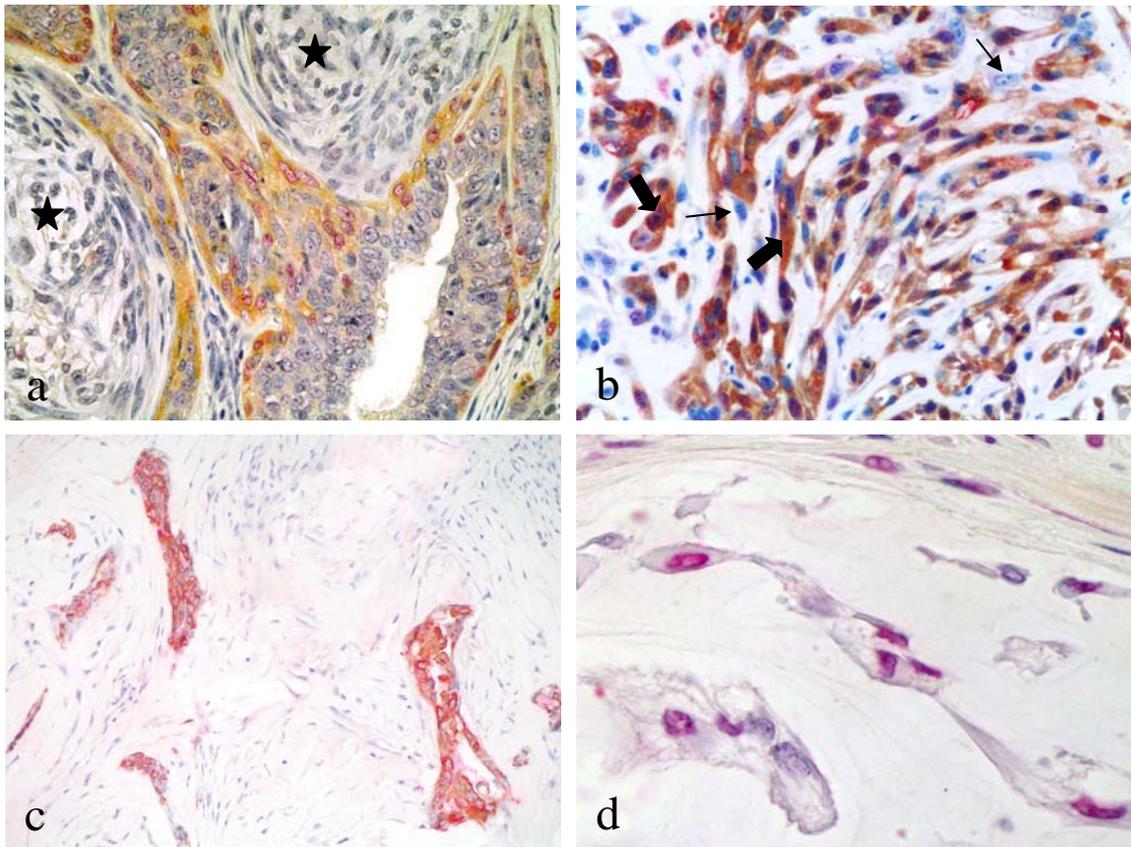


Figura 62. **Co-expresión de las proteínas 14-3-3 σ y p63 en carcinomas complejos y mixtos de mama.** a) Carcinoma complejo. Se observan células mioepiteliales pre-existentes de tipo +/+. Las células epiteliales son -/-. Se observan además nidos de células mioepiteliales fusiformes y estrelladas -/- (estrellas). 20x. b) Carcinoma complejo. Nido de células mioepiteliales fusiformes y estrelladas con células +/+ (flechas gruesas) y -/- (flechas finas). 20x. c) Carcinoma en tumor mixto. Grupos de células epiteliales neoplásicas +/- . 10x. d) Carcinoma en tumor mixto. Grupos de condrocitos -/+. 40x. Clones 5D7 y 4A4. Doble IHQ.

En 8 casos de los 33 en los que se realizó la doble inmunotinción, donde se observó **invasión vascular**. Los émbolos de células neoplásicas estaban constituidos por células predominantemente del tipo +/-, observándose además células neoplásicas -/- y, muy ocasionalmente, células +/+. Al igual que en otras localizaciones se observaron células neoplásicas de fenotipo +/- en mitosis (Fig. 63).

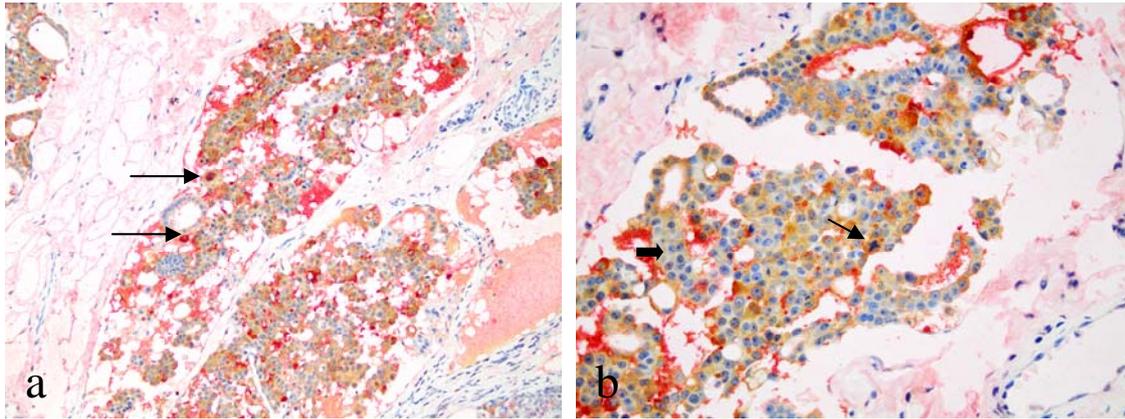


Figura 63. **Co-expresión de las proteínas 14-3-3 σ y p63 en invasiones vasculares.** a) Émbolo de células neoplásicas mayoritariamente +/- . Se observan aisladas células +/+ (flechas). 10x. b) Imagen a mayores aumentos de una invasión vascular donde se observan las células neoplásicas con inmunofenotipo +/- . Una mitosis bizarra expresa la proteína 14-3-3 σ de manera intensa (flecha). Se observan algunas células neoplásicas -/- (flecha gruesa). 20x. Clones 5D7 y 4A4. Doble IHQ.

5.1. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA 14-3-3 σ EN FUNCIÓN DEL CLON Y LA TÉCNICA EMPLEADA PARA SU ANÁLISIS.

La proteína 14-3-3 σ es una proteína constitutiva que se expresa en una alta variedad de tejidos epiteliales. Para analizar su expresión, se han empleado en el presente trabajo dos anticuerpos comerciales de la casa Santa Cruz Biotechnology, inc. (Santa Cruz, USA). Los anticuerpos empleados fueron un anticuerpo policlonal creado en cabra (clon N14) y un anticuerpo monoclonal creado en ratón (clon 5D7), ambos válidos para su uso en inmunohistoquímica y Western blot, sin que produzcan reacción cruzada con ninguna de las otras 6 isoformas descritas en mamíferos (Información comercial de Santa Cruz Biotechnology, inc.).

Aunque, en general, no se observaron diferencias significativas de expresión de la proteína 14-3-3 σ en los tejidos normales caninos analizados tanto inmunohistoquímicamente como por Western blot, sí se apreciaron algunas variaciones que requieren ser analizadas.

El empleo de ambos anticuerpos permitió determinar su expresión en células de origen epitelial de varias localizaciones orgánicas con un patrón de inmunotinción intracitoplasmático, nuclear y/o de membrana. Adicionalmente, mediante el uso del clon N14, se observó un inmunoprecipitado, de localización yuxtannuclear, de aspecto granular tanto en el epitelio de la mucosa del estómago como en el epitelio de la próstata. Este inmunoprecipitado no se observó cuando se empleó el clon 5D7.

Además, mediante el empleo del clon N14, se observó expresión de la proteína 14-3-3 σ en células de origen neuroendocrino a nivel del estómago, intestino, páncreas endocrino, médula adrenal y cuerpos neuronales, reacción que no se produjo cuando se empleó el clon 5D7. Estos resultados pueden ser explicados por hallazgos descritos previamente (Moore y Pérez, 1967). Las proteínas 14-3-3 son una familia de proteínas ácidas altamente conservadas entre especies y compuesta por, al menos, 7 isoformas (Hermeking., 2003; Lodygin y Hermeking, 2006). Originalmente, estas proteínas fueron descubiertas en el estudio de tejidos de origen nervioso (Moore y Pérez, 1967) y

está demostrado que se expresan y desarrollan importantes funciones a nivel del sistema nervioso y neuroendocrino (Wilker y Yaffe, 2004; Liu *et al.*, 2010). Debido a que el resto de isoformas de la familia 14-3-3 se expresan en tejidos de origen nervioso y neuroendocrino, hecho que no ocurre con la isoforma σ , la inmunotinción producida por el anticuerpo policlonal N14 podría deberse a una reacción cruzada con alguna de las restantes isoformas de la familia.

Por otra parte, el inmunoprecipitado de aspecto granular de localización yuxtannuclear observado en las células epiteliales del estómago y la próstata podría corresponderse con una reacción inespecífica frente a proteínas presentes en el aparato de Golgi, reacción observada con el uso de otros anticuerpos de tipo policlonal (Ramos Vara *et al.*, 2005; 2008).

En concordancia con lo anterior, se observó una mayor capacidad de detección de la proteína 14-3-3 σ en la técnica de Western blot con el clon 5D7. El clon N14 identificó bandas menos inmunorreactivas que el clon 5D7 así como un barrido de banda en una de las posiciones. Por el contrario, el clon 5D7 produjo bandas más nítidas e intensas y no se observaron los artefactos de barrido generados por el clon N14. Además, la identificación de una banda específica correspondiente a una proteína de 30 kDa, mediante Western blot, indica la reactividad cruzada entre la proteína 14-3-3 σ de la especie humana y la canina así como la utilidad del anticuerpo empleado para detectar dicha proteína en tejidos caninos (Ramos-Vara *et al.*, 2008; Webster *et al.*, 2011).

Teniendo en mente lo anterior, podría sugerirse que el clon 5D7 es más adecuado para estudiar la expresión de la proteína 14-3-3 σ en tejidos caninos.

La expresión inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ se ha llevado a cabo en numerosos estudios en la especie humana. La bibliografía nos presenta una gran variedad de métodos inmunohistoquímicos, métodos de desenmascaramiento antigénico, tiempos de incubación y anticuerpos empleados.

Con respecto a los métodos de desenmascaramiento antigénico, llama la atención que se hayan empleado técnicas tan dispares como el tratamiento

térmico con olla a presión, microondas, tratamiento térmico sin presión y autoclave, en donde las preparaciones histológicas se sumergían en soluciones tampón. Los tiempos a los que se ha sometido a las preparaciones histológicas a la acción del calor también han sido variables. Se han empleado intervalos de tiempos que han oscilado desde los 10 hasta 45 minutos en los métodos de calor sin presión y de 3 a 5 minutos en aquellos sometidos a presión. De igual manera se han empleado temperaturas desde los 86° a los 121° (Gasco *et al.*, 2002b; Osada *et al.*, 2002; Yatabe *et al.*, 2002; Akahira *et al.*, 2004; Kaneuchi *et al.*, 2004; Simpson *et al.*, 2004; Uchida *et al.*, 2004; Mhaweche *et al.*, 2005a; 2005b; Moreira *et al.*, 2005; Perathoner *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2010; Shibaishi *et al.*, 2011). Además, en varios estudios se describe la ausencia de método de desmascaramiento antigénico (Sniezek *et al.*, 2002; Nakajima *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2004; Guweidhi *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2004; Sano *et al.*, 2004; Simooka *et al.*, 2004; Urano *et al.*, 2004; Nakayama *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 2005).

Por otra parte, las soluciones tampón empleadas descritas varían en su molaridad y pH, habiéndose empleado, por ejemplo, soluciones de citrato y EDTA con variaciones de 6 a 9 unidades de pH. Los métodos de visualización también son variados, habiéndose usado el método de la avidina-biotina-peroxidasa (ABC) o el de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) (Gasco *et al.*, 2002b; Osada *et al.*, 2002; Yatabe *et al.*, 2002) y los polímeros, como el EnVision (Sniezek *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2008).

Los anticuerpos empleados por los investigadores también varían considerablemente, habiéndose utilizado anticuerpos comerciales monoclonales de diferente tipo, anticuerpos comerciales policlonales creados en conejo y cabra, así como anticuerpos purificados por los mismos investigadores (Gasco *et al.*, 2002b; Osada *et al.*, 2002; Yatabe *et al.*, 2002; Akahira *et al.*, 2004; Kaneuchi *et al.*, 2004; Simpson *et al.*, 2004; Uchida *et al.*, 2004; Mhaweche *et al.*, 2005a; 2005b; Moreira *et al.*, 2005; Perathoner *et al.*, 2005). También cabe destacar que en diversos artículos, no se hace referencia a las especificaciones técnicas del método inmunohistoquímico empleado (Iwata *et al.*, 2000; Lodygin *et al.*, 2003).

Esta disparidad de métodos hace pensar que muchas de las discrepancias entre estudios pudieran deberse a dicha falta de homogeneidad de la técnica. En el presente trabajo, la incubación con ambos anticuerpos anti-proteína 14-3-3 σ (clon N14 y clon 5D7) produjo un inmunoprecipitado específico en los tejidos control y problema utilizados, cuando se sometieron a un proceso de desenmascaramiento antigénico mediante inmersión en una solución de citrato a pH 6, en olla sin presión durante 20 minutos. Dicho método se asemeja al empleado por otros autores (Uchida *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2010). En cualquier caso, es importante recordar que las técnicas de detección de cada anticuerpo deben de ser estandarizadas en cada laboratorio (Ramos-Vara *et al.*, 2008). Se requerirían de más estudios en la especie canina que pudieran corroborar nuestros resultados y que analizaran las diferencias ocasionadas por el empleo de pequeñas o mayores modificaciones de la técnica descrita en el presente trabajo.

5.2. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA 14-3-3 σ EN TEJIDOS NORMALES CANINOS

Según el conocimiento de los autores, este es el primer trabajo que estudia la expresión de la proteína 14-3-3 σ en tejidos de la especie canina.

La proteína 14-3-3 σ , también llamada estratifina, fue identificada en principio como un marcador de células epiteliales, denominándola “marcador específico epitelial mamario humano 1” o HME1 (Human mammary epithelium-specific marker 1) (Prasad *et al.*, 1992). Éste fue el primer trabajo en que se analizó la expresión de la proteína 14-3-3 σ en tejidos normales. No obstante, dicha expresión se realizó analizando el ARN presente en cultivos celulares de diferentes localizaciones orgánicas y no analizó la expresión directa de la proteína en tejidos, tal y como se ha realizado en el presente trabajo.

Se han empleado diversos métodos para estudiar la expresión de la proteína 14-3-3 σ . O bien se han utilizado métodos de análisis directos, que han analizado la presencia concreta de la proteína mediante técnicas

inmunohistoquímicas o de Western blot, o se han empleado análisis indirectos, estudiándose la expresión del ARN (RT-PCR, Northern blot) o ADN (Southern blot), métodos que, orientativamente, deberían corresponderse con los niveles de expresión proteica si esta fuera analizada en el tejido problema (Prasad *et al.*, 1992; Dellambra *et al.*, 1995; Hermeking *et al.*, 1997; Chan *et al.*, 1999; Ferguson *et al.*, 2000; Iwata *et al.*, 2000; Vercoutter-Edouart *et al.*, 2001; Gasco *et al.*, 2002a, b; Osada *et al.*, 2002; Sniezek *et al.*, 2002; Yatabe *et al.*, 2002; Bhathia *et al.*, 2003; Lodygin *et al.*, 2003; Nakajima *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2004; Guweidhi *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2004; Lodygin *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2004; Sano *et al.*, 2004; Simooka *et al.*, 2004; Simpson *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2004; Uchida *et al.*, 2004; Urano *et al.*, 2004; Mhawech *et al.*, 2005a; 2005b; Moreira *et al.*, 2005; Nakayama *et al.*, 2005; Perathoner *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 2005; Kunze *et al.*, 2006; Dillon *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2007; Wilker *et al.*, 2007; Bhawal *et al.*, 2008; Kilani *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2008; Neupane *et al.*, 2008; Shankardas *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Hayashi *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009a; Luo *et al.*, 2009; Sitek *et al.*, 2009; Kuramitsu *et al.*, 2010; Mühlmann *et al.*, 2010; Okumura *et al.*, 2010; Pei *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2010; Dabbous *et al.*, 2011; Dim *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2011; Ravi *et al.*, 2011; Shiba-Ishi *et al.*, 2011; Sureban *et al.*, 2011).

En general, el patrón de distribución de la proteína 14-3-3 σ en los tejidos de la especie canina es similar al descrito en la especie humana. Sin embargo, además de que en la literatura existan discrepancias entre la expresión de esta proteína en un mismo tejido de la especie humana, en nuestro estudio se han reconocido varias diferencias entre los patrones de distribución y la reactividad de la proteína 14-3-3 σ entre los tejidos normales caninos y los humanos.

En relación a la **piel y los anejos cutáneos**, pocos estudios han analizado la expresión inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ en la especie humana (Lodygin *et al.*, 2003; Nakajima *et al.*, 2003; Kilani *et al.*, 2008). En el trabajo de Lodygin *et al.* (2003) se analizó la expresión de la proteína 14-3-3 σ en comparación con lesiones proliferativas benignas y neoplasias cutáneas. En dicho trabajo no se estudiaron pieles de diferentes

localizaciones orgánicas, limitándose a las regiones de piel sana adyacentes a las lesiones. Nakajima *et al.* (2003) analizaron secciones de pieles normales (sin identificar su localización) y Kilani *et al.* (2008) estudiaron tanto la distribución de la proteína 14-3-3 σ como la de las 6 isoformas restantes de la proteína en pieles de la especie humana y de la rata inmunohistoquímicamente y por Western blot. En estos trabajos, y de manera similar a nuestros hallazgos, se observó una intensa expresión de la proteína 14-3-3 σ a nivel de la epidermis, folículos pilosos y en las células de reserva de las glándulas sebáceas, mientras que en la dermis no se detectó expresión de la proteína 14-3-3 σ en fibroblastos, músculos piloerectores o terminaciones nerviosas.

Es importante resaltar que Lodygin *et al.* (2003) y Kilani *et al.* (2008) observaron una tinción de mayor intensidad hacia los estratos suprabasales de la epidermis, en concreto hacia el estrato lúcido, mientras que el estrato córneo resultó negativo, hallazgos también observados en nuestro estudio. La mayor intensidad hacia los estratos suprabasales de la epidermis puede ser explicado por los resultados de Dellambra *et al.* (2000) que, en estudios *in vitro*, encontraron que la expresión de la proteína 14-3-3 σ era necesaria en la diferenciación final de células epiteliales y cuya pérdida o disminución de expresión en dichas células permitía que éstas evadieran la senescencia (vejez y muerte) y entraran en un ciclo de replicación continua, es decir, se tornarían inmortales (Dellambra *et al.*; 2000; Lodygin *et al.*, 2003). Por otra parte, en nuestro trabajo se detectó, además de la inmunotinción a nivel citoplasmático, una reacción nuclear en queratinocitos de la epidermis de algunos de los animales estudiados. Mientras que se ha observado expresión nuclear en tejidos normales humanos de otras localizaciones, este patrón no se ha descrito para la piel humana. Aunque un número diverso de estudios *in vitro* sugiere que la proteína 14-3-3 σ actúa en el ciclo celular (Hermeking *et al.*, 1997; Chan *et al.*, 1999; Laronga *et al.*, 2000; Rosner *et al.*, 2006), no está dilucidado por completo el papel que juega la proteína 14-3-3 σ *in vivo* en tejidos normales de la especie humana. En nuestro caso, la expresión a nivel nuclear de una manera tan esporádica (uno de cuatro animales) pudiera responder al papel de molécula chaperona atribuida a la proteína 14-3-3 σ (Hondermarck *et al.*, 2002; Hermeking, 2003; 2006; Mhawech *et al.*, 2005c;

Hermeking *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006), con capacidad para moverse libremente del citoplasma al núcleo o viceversa en función de los requerimientos fisiológicos de la célula en un momento dado.

En la piel humana utilizada en nuestro estudio como control positivo técnico se observó expresión citoplasmática en las células epiteliales de las glándulas sudoríparas, siendo las células mioepiteliales negativas. Según nuestro conocimiento, no se ha estudiado la expresión de la proteína 14-3-3 σ en las glándulas sudoríparas humanas. En contraposición, en nuestro estudio pudo observarse un patrón de expresión heterogéneo en las glándulas sudoríparas apocrinas de la especie canina. Mientras que algunos grupos de glándulas presentaron positividad a nivel de las células mioepiteliales y débil o muy débil positividad en las células epiteliales, otros grupos de glándulas resultaron totalmente negativas.

Futuros estudios son necesarios para dilucidar el papel que juega la expresión de la proteína 14-3-3 σ en la piel normal canina, así como en las lesiones proliferativas y neoplásicas que se asienten en ella.

Varios trabajos han descrito datos sobre la expresión de la proteína 14-3-3 σ en los diferentes órganos del **aparato digestivo**.

En la especie humana se ha observado intensa expresión de la proteína 14-3-3 σ en el epitelio de revestimiento de la cavidad bucal, así como a nivel del epitelio de la lengua (Gasco *et al.*, 2002a; Sniezek *et al.*, 2002; Nakajima *et al.*, 2003; Uchida *et al.*, 2004; Bhawal *et al.*, 2007; 2008). En estos trabajos se ha reportado que la expresión de la proteína 14-3-3 σ tiende a presentar mayor intensidad en los estratos medios y superiores del epitelio lingual. Sin embargo, en el presente trabajo se observó que, mientras que los estratos basal y suprabasal presentaban intensa expresión de la proteína, se producía una disminución de la misma hacia los estratos superiores.

Además, el mismo animal que presentó tinción nuclear a nivel de epidermis, presentó además tinción nuclear esporádica en el epitelio lingual,

hallazgo que ha sido reportado previamente en la especie humana (Nakajima *et al.*, 2003).

En nuestro trabajo se observó una expresión muy débil en el citoplasma de las células epiteliales del esófago. Además, en dichas células se observó una expresión generalizada de la proteína a nivel nuclear en todos los animales estudiados, resultado que también ha sido descrito para la especie humana (Nakajima *et al.*, 2003). No obstante, existen discrepancias en cuanto a la expresión de la proteína 14-3-3 σ en el esófago. Mientras que unos autores describen una intensa expresión citoplasmática y débil tinción nuclear (Nakajima *et al.*, 2003), otros no han encontrado expresión en el tejido normal esofágico (Okumura *et al.*, 2010). Las discrepancias entre estos autores podrían deberse a las diferentes técnicas inmunohistoquímicas y anticuerpos empleados en sus estudios. El hecho de que en nuestros especímenes se observara una escasa expresión citoplasmática fue corroborada mediante la técnica de Western blot, donde se observó una banda de menor intensidad que las generadas por otros tejidos compuestos por epitelio escamoso como la piel. La causa de esta escasa expresión de la proteína 14-3-3 σ en el esófago requiere de mayores estudios.

Dos trabajos, presentando discrepancias entre ellos, han estudiado la expresión de la proteína 14-3-3 σ en la glándula salival humana (Nakajima *et al.*, 2003; Uchida *et al.*, 2004). De esta manera, mientras que unos autores indican una expresión homogénea de dicha proteína a nivel de las células mioepiteliales que rodean las células glandulares, con esporádica expresión a nivel de las células epiteliales de los conductos de excreción (Nakajima *et al.*, 2003), otros autores describen la expresión de la proteína 14-3-3 σ únicamente a nivel de las células epiteliales ductales (Uchida *et al.*, 2004). Además, también se ha descrito débil expresión a nivel de las células acinares (Nakajima *et al.*, 2003). En nuestro trabajo se observó expresión tanto en las células de los conductos como en las células mioepiteliales que rodeaban las células glandulares, siendo negativas las células acinares, lo que concuerda por separado con los resultados obtenidos previamente por varios autores (Nakajima *et al.*, 2003; Uchida *et al.*, 2004).

Según el conocimiento de los autores, sólo existen dos trabajos en los que se haya analizado la expresión inmunohistoquímica de la proteína 14-3-3 σ en el estómago (Nakajima *et al.*, 2003; Mühlmann *et al.*, 2010), con resultados, nuevamente, discrepantes. Mientras que unos autores han encontrado moderada expresión en el epitelio foveolar (Nakajima *et al.*, 2003), otros no encontraron reacción alguna (Mühlmann *et al.*, 2010). Como ya se ha comentado previamente, las diferencias de inmunotinción encontradas entre los dos clones (N14 y 5D7), el marcaje de células neuroendocrinas así como el inmunoprecipitado yuxtannuclear en células epiteliales de la mucosa, se corresponderían con la diferente especificidad inherente de ambos anticuerpos. Así, en el presente trabajo no se observó expresión a nivel del epitelio glandular del estómago, lo que concuerda con algunos resultados descritos previamente (Mühlmann *et al.*, 2010).

El intestino delgado y grueso presentó un patrón de inmunotinción similar al del estómago. Mientras que el clon N14 produjo inmunotinción en células neuroendocrinas del intestino, mediante el empleo del clon 5D7 no se observó expresión en ninguna estructura del intestino. La ausencia de reacción en el epitelio intestinal ha sido descrita previamente por otros autores para la especie humana (Tanaka *et al.*, 2004; Perathoner *et al.*, 2005) lo que concuerda con la negatividad observada en las muestras de intestino de nuestro estudio. Sin embargo, otros autores describen expresión de la proteína 14-3-3 σ a nivel del epitelio de las criptas intestinales (Nakajima *et al.*, 2003).

Más extensamente ha sido estudiada la expresión de la proteína 14-3-3 σ en el tejido pancreático exocrino de la especie humana (Nakajima *et al.*, 2003; Guweidhi *et al.*, 2004; Neupane *et al.*, 2008; Sitek *et al.*, 2009). En todos los trabajos que han analizado dicha expresión en tejido pancreático normal se ha descrito que no existe expresión constitutiva de dicha proteína en este órgano, resultados que concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo. Además, Nakajima *et al.* (2003) encontraron inmunorreacción en células periductales, hallazgo no observado en nuestro trabajo. Por otra parte, mediante el empleo del clon N14, se observó expresión a nivel de los islotes de Langerhans, resultado que ha sido discutido en el apartado 5.1.

Según nuestro conocimiento, la expresión de la proteína 14-3-3 σ en tejido hepático normal ha sido escasamente estudiada, presentando resultados contradictorios. Mientras que unos autores no han encontrado expresión en tejido hepático normal (Nakajima *et al.*, 2003), otros sí han encontrado tal expresión (Iwata *et al.*, 2000). Nuestros resultados concuerdan con los de Nakajima *et al.* (2003), al no haber observado ningún tipo de inmunoprecipitado en el parénquima hepático.

Con respecto a la vesícula biliar, sólo existe un trabajo en el que se analice la expresión de la proteína 14-3-3 σ en el epitelio de dicho órgano (Nakajima *et al.*, 2003). En el presente trabajo se encontró moderada expresión de esta proteína 14-3-3 σ en las células epiteliales de la mucosa de la vesícula biliar, estando en concordancia con lo descrito por Nakajima *et al.* (2003).

En el **aparato respiratorio** humano, se ha descrito tanto una inmunorreactividad intensa como difusa, sobre todo, en los núcleos de las células basales del epitelio de la tráquea, los bronquios y los bronquiolos. Además, la proteína 14-3-3 σ se ha detectado inmunohistoquímicamente en el núcleo y el citoplasma de las células basales del epitelio de la tráquea y de las glándulas bronquiales, así como de manera esporádica en neumocitos tipo II (Osada *et al.*, 2002; Yatabe *et al.*, 2002; Nakajima *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2009a; Xiao *et al.*, 2010). No obstante, otros autores no han encontrado expresión de la proteína 14-3-3 σ en tejido pulmonar (Shiba-Ishii *et al.*, 2011). Nuestros resultados, aunque muestran una débil inmunorreacción únicamente a nivel de las células basales del epitelio de revestimiento de la tráquea y de los bronquios, siendo negativas el resto de estructuras así como los neumocitos tipo II, se asemejan a los descritos previamente (Osada *et al.*, 2002; Yatabe *et al.*, 2002; Nakajima *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2009a; Xiao *et al.*, 2010).

En el **sistema urinario**, se ha descrito una moderada y esporádica expresión de la proteína 14-3-3 σ en las células epiteliales de los túbulos renales y una nula expresión a nivel de los glomérulos por diferentes autores (Nakajima *et al.*, 2003; Mhaweche *et al.*, 2005a; 2005b; Liang *et al.*, 2008). Sin

embargo, en el presente estudio no se encontró expresión inmunohistoquímica ni por Western blot en los tejidos renales caninos analizados.

En el presente trabajo se observó una intensa expresión citoplasmática y nuclear en el urotelio de la vejiga de la orina en todos los especímenes analizados. Además, se observó cómo algunas células superficiales presentaban una menor expresión o eran negativas. Dichos resultados, exceptuando la expresión de tipo nuclear, concuerda con los hallazgos descritos en la especie humana por varios autores (Nakajima *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, 2004; Mhaweck *et al.*, 2005a; 2005b; Kunze *et al.*, 2006; 2008). El urotelio del uréter y de la uretra presentó igualmente una intensa inmunorreacción, observándose además un patrón de tinción de membrana, hallazgo que también ha sido reportado en la especie humana (Nakajima *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, 2004; Mhaweck *et al.*, 2005a; 2005b; Kunze *et al.*, 2006; 2008; Xiao *et al.*, 2010). La expresión nuclear observada en el urotelio de la especie canina concuerda con el hecho de que la proteína 14-3-3 σ puede moverse libremente según la fisiología de las células lo requieran (Hermeking, 2003).

Varios trabajos han estudiado la expresión de la proteína 14-3-3 σ en los órganos del **aparato reproductor** masculino y femenino de la especie humana. A nivel testicular se ha observado que las células germinales no expresan la proteína 14-3-3 σ , mientras que las células periductales del epidídimo si son positivas (Nakajima *et al.*, 2003). No obstante, otros autores han obtenido resultados negativos para todo el testículo (Mhaweck *et al.*, 2005a; 2005b). Nuestros resultados concuerdan con estos últimos autores al no obtener ningún tipo de inmunoprecipitado en las secciones de testículo.

La expresión de la proteína 14-3-3 σ en tejido prostático ha sido estudiada en varios trabajos con resultados contradictorios. Algunos autores han señalado una intensa expresión de la proteína a nivel citoplasmático y nuclear en las células periacinares/periductales de la próstata, así como una esporádica reacción citoplasmática en células glandulares y ductales (Nakajima *et al.*, 2003). Otros autores describen una intensa expresión tanto en las células periacinares/periductales como en las glandulares (Cheng *et al.*,

2004; Lodygin *et al.*, 2004), mientras que otros describen únicamente intensa reacción en las células epiteliales glandulares (Huang *et al.*, 2004; Urano *et al.*, 2004). Contrariamente, otros trabajos describen que la proteína 14-3-3 σ se expresa únicamente en las células periglandulares y periductales (Mhaweck *et al.*, 2005a; 2005b). En el presente trabajo se detectó expresión intensa citoplasmática y nuclear, en el epitelio de los ductos, así como una expresión esporádica en el citoplasma de las células glandulares sin expresión a nivel de las células periductales ni periglandulares, resultados que concuerdan con los de otros autores (Urano *et al.*, 2004).

Varios estudios han analizado la expresión de la proteína 14-3-3 σ en el ovario con resultados, nuevamente contradictorios. Unos autores no han encontrado expresión en tejido ovárico (Nakajima *et al.*, 2003; Mhaweck *et al.*, 2005a; 2005b). Otros investigadores han indicado variabilidad en su expresión encontrando tanto ejemplares de tejido ovárico negativos como difusamente positivos (Ravi *et al.*, 2011). Otros autores, sin embargo, han encontrado una generalizada expresión de la proteína 14-3-3 σ en el tejido ovárico (Akahira *et al.*, 2004). Esta disparidad de resultados puede ser debida al empleo de diferentes anticuerpos y técnicas inmunohistoquímicas (Ramos Vara *et al.*, 2008). Otra posible explicación para esta disparidad de resultados en la especie humana podría estar justificada en el trabajo de Nakayama *et al.* (2005). Estos autores pusieron de manifiesto una correlación inversa entre el estatus hormonal en diferentes fases del ciclo menstrual y la expresión de la proteína 14-3-3 σ en tejidos uterinos. En estados proliferativos, mientras que la expresión de receptores de estrógenos es máxima, no existe expresión de la proteína 14-3-3 σ . Al contrario en la fase secretora del útero, la expresión de receptores de estrógenos es escasa siendo máxima la expresión de la proteína 14-3-3 σ . Podría pensarse que tal interacción ocurriera en otros órganos en los que el estatus hormonal varía en función de la fase del ciclo sexual en la que se encuentre el tejido en el momento de la toma de la muestra y debido a eso pudiera obtenerse inmunorreacción tanto difusamente positiva como negativa en el tejido ovárico (Nakayama *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2006; Ravi *et al.*, 2011). En el presente trabajo no se observó expresión de la proteína 14-3-3 σ en ninguna de las estructuras que componen el ovario, concordando con los resultados de Nakajima *et al.* (2003) y Mhaweck *et al.* (2005a; 2005b).

En seres humanos se ha descrito una inmunorreactividad débil para la proteína 14-3-3 σ en la mucosa del endometrio, así como a nivel de las glándulas de dicho órgano (Nakajima *et al.*, 2003; Mhaweche *et al.*, 2005a; 2005b). Otros autores han señalado que existe una inmunorreactividad citoplasmática, de débil a moderada, en el epitelio del cuello uterino, sin observarse inmunotinción alguna en las glándulas uterinas (Sano *et al.*, 2004). En nuestro trabajo se detectó una inmunotinción citoplasmática débil y heterogénea tanto en el epitelio uterino como a nivel de las glándulas endometriales lo que concuerda con estudios anteriores en humanos (Nakajima *et al.*, 2003; Mhaweche *et al.*, 2005a; 2005b). Es posible que, en función del estadio del ciclo estral de la perra, se produzcan cambios en la expresión de la proteína 14-3-3 σ , tal y como se ha reportado para la especie humana (Nakayama *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2006).

La expresión de la proteína 14-3-3 σ no ha sido analizada en el epitelio de la vagina humana. Sí se ha observado, en un estudio realizado en ratones jóvenes, que la expresión de la proteína 14-3-3 σ puede inducirse en el epitelio de la vagina tras una única inyección de dietilelbestrol (Suzuki *et al.*, 2006). En nuestro trabajo se ha observado expresión de moderada a intensa de la proteína 14-3-3 σ en todos los estratos del epitelio de la vagina, con un patrón de tinción citoplasmático y nuclear en todos los animales analizados. Dichos resultados concuerdan con el hecho de que la proteína 14-3-3 σ se expresa en diversos epitelios de revestimiento estratificado (Gasco *et al.*, 2002a; Nakajima *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2008).

En la **glándula mamaria** canina, el patrón de inmunorreactividad de la proteína 14-3-3 σ en las células epiteliales luminales y mioepiteliales fue variable y dependió de la etapa de la actividad secretora de la glándula. En la glándula no lactante de la hembra madura, la proteína 14-3-3 σ se expresó de manera consistente sólo en el citoplasma de las células mioepiteliales dispuestas como una capa continua alrededor de las unidades lobulares y los conductos, mientras que las células epiteliales luminales mostraron tinciones ocasionales. En la glándula mamaria lactante se observó una expresión débil a moderada en las células epiteliales secretoras y moderada a intensa en las células mioepiteliales de los conductos y los acinos. La proteína 14-3-3 σ se ha

propuesto como un marcador nuevo y específico de células mioepiteliales de la glándula mamaria humana (Simpson *et al.*, 2004, Leibl *et al.*, 2005). Por otro lado, otros autores describen la inmunorreactividad de la proteína 14-3-3 σ en el citoplasma de las células epiteliales luminales y mioepiteliales de los conductos y los lóbulos, siendo la intensidad más fuerte en las células mioepiteliales que en las células luminales (Simooka *et al.*, 2004).

La expresión de la proteína 14-3-3 σ se encuentra asociada a hormonas como los estrógenos y a otras proteínas de índole hormonal, como la proteína EFP (estrogen-responsive finger protein) (Nalepa y Harper *et al.*, 2002; Urano *et al.*, 2002; Simooka *et al.*, 2004; Nakayama *et al.*, 2005). Nuestros hallazgos podrían justificarse a mecanismos similares a los descritos para la especie humana. No obstante, aunque se han evidenciado cambios morfológicos en el parénquima mamario en las diferentes fases del ciclo estral (Santos *et al.*, 2010), dichos cambios no se han estudiado inmunohistoquímicamente en relación a la expresión de hormonas y/o sus receptores en los tejidos mamaros de perras sanas en las diferentes etapas del ciclo sexual. Por otra parte, no existen referencias sobre la expresión de la proteína EFP en la especie canina. Serían necesarios más estudios que relacionaran la presencia de la proteína 14-3-3 σ con receptores de hormonas, así como con la proteína EFP.

En seres humanos, las **glándulas endocrinas** muestran una ausencia completa de expresión de la proteína 14-3-3 σ (Nakajima *et al.*, 2003). En nuestro trabajo, las glándulas tiroides, paratiroides, pituitaria y corteza adrenal no expresaron la proteína 14-3-3 σ , lo que concuerda con estudios previos (Nakajima *et al.*, 2003). El hecho de que, mediante el empleo del anticuerpo policlonal N14, se produjera inmunotinción a nivel del páncreas endocrino, médula adrenal y células neuroendocrinas del aparato digestivo, y que dicha reacción no se observara al emplearse el anticuerpo monoclonal 5D7, sugiere una reacción cruzada entre la isoforma σ y otra u otras de las 6 isoformas descritas en mamíferos, cuya expresión sí se produce en tejidos endocrinos (Roseboom *et al.*, 1994; Roth *et al.*, 1994; Graf *et al.*, 2011). Según el conocimiento de los autores no existen referencias que comparen la reactividad de anticuerpos policlonales y monoclonales de la proteína 14-3-3 σ .

El **tejido linfoide** analizado en nuestro trabajo fue siempre negativo para la expresión de la proteína 14-3-3 σ . Este hecho concuerda con los resultados previamente descritos para la especie humana (Bhatia *et al.*, 2003; Nakajima *et al.*, 2003). Uno de los mecanismos más importantes descritos como regulador de la transcripción del gen *14-3-3 σ* y la producción de la proteína es el silenciamiento del gen mediante la metilación de islas CpG. Este mecanismo se ha encontrado en varios tipos de neoplasias y se ha propuesto como la causa para la no transcripción de la proteína (Hermeking, 2003). Un estudio encontró metilación del ADN en la células de origen linfoide proponiendo que dicha metilación podría ser un mecanismo de regulación de expresión génica en diferentes tipos de tejidos normales (Bhatia *et al.*, 2003).

Otros tejidos analizados en el presente trabajo fueron cerebro, cerebelo, médula espinal y músculos estriados esquelético y cardíaco. En ninguno de ellos se observó expresión de la proteína 14-3-3 σ , lo que concuerda con los resultados obtenidos para la especie humana (Nakajima *et al.*, 2003). No obstante, es importante destacar que en periodos fetales humanos, otros autores han documentado la expresión de la proteína 14-3-3 σ en músculo estriado esquelético y cardíaco, músculo liso, condrocitos y epitelio alveolar (Yatabe *et al.*, 2002). En otros trabajos se ha analizado la expresión de las diferentes isoformas de la familia 14-3-3 en tejidos de rata de diferentes edades postnatales, observando que la isoforma σ , mientras que se expresa al comienzo de las etapas de desarrollo, disminuye en periodos más tardíos (Umahara *et al.*, 2009). Debido a que las proteínas 14-3-3 cumplen importante funciones biológicas a nivel del sistema nervioso, encontrándose desreguladas en varias patologías que afectan al tejido nervioso (Wilker y Yaffe, 2004), y teniendo en cuenta que la especie canina ha sido propuesta como un modelo natural de estudio para algunas enfermedades neurodegenerativas humanas (Yu *et al.*, 2011), futuros estudios centrados en la expresión de las diferentes isoformas de la familia 14-3-3 en los tejidos nerviosos caninos deberían de llevarse a cabo.

5.3. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA 14-3-3 σ EN TEJIDOS MAMARIOS NORMALES, DISPLÁSICOS Y NEOPLÁSICOS CANINOS

Aunque el papel principal de la proteína 14-3-3 σ en el cáncer de mama humano ha sido discutido en muchos y variados estudios (Prasad *et al.*, 1992; Ferguson *et al.*, 2000; Umbricht *et al.*, 2001; Vercoutter-Edouart *et al.*, 2001; Simooka *et al.*, 2004; Simpson *et al.*, 2004; Leibl *et al.*, 2005; Mhaweche *et al.*, 2005a; 2005b; Moreira *et al.*, 2005; Jeronimo *et al.*, 2008; Martínez-Galán *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2009), la mayoría de estos han evaluado el estado de metilación del gen, concluyendo que la hipermetilación de las islas CpG causa el silencio epigenético de la proteína 14-3-3 σ en el cáncer de mama humano. Sin embargo, muy pocos estudios han tratado de determinar las modificaciones existentes de la proteína 14-3-3 σ en los tejidos mamarios neoplásicos comparados con los tejidos mamarios no tumorales (Simooka *et al.* 2004; Simpson *et al.*, 2004; Mhaweche *et al.*, 2005a; 2005b; Moreira *et al.*, 2005). Según el conocimiento de los autores, éste es el primer trabajo en el que se examina la expresión de la proteína 14-3-3 σ en neoplasias derivadas de la glándula mamaria de la especie canina.

La proteína 14-3-3 σ ha sido detectada mediante inmunohistoquímica en las células mioepiteliales y epiteliales de la glándula mamaria normal de la especie humana, siendo siempre la tinción de las primeras más intensa (Nakajima *et al.*, 2003; Simooka *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2005). Sin embargo, los resultados reportados por Simpson *et al.* (2004) mostraron que la proteína 14-3-3 σ se expresó únicamente en las células mioepiteliales de la glándula mamaria normal. Esta discrepancia de resultados podría deberse a diferencias entre las técnicas y anticuerpos usados en cada estudio. Nuestros resultados indican que la proteína 14-3-3 σ se expresa preferentemente en células mioepiteliales de tejido normal (100%) y displásico (91%) de la glándula mamaria, observándose además positividad en células epiteliales luminales tanto en la mama normal (22%) como en la displásica (65%), lo que concuerda con estudios anteriores en humanos (Simooka *et al.*, 2004; Simpson *et al.*, 2004; Mhaweche *et al.*, 2005a; 2005b; Moreira *et al.*, 2005).

El patrón de inmunotinción expresado por la proteína 14-3-3 σ en las neoplasias de mama caninas fue casi exclusivamente intracitoplasmático. Sin embargo, en un caso de carcinoma simple túbulo-papilar con metástasis a nódulo linfático regional, se observó en el tumor primario positividad en el núcleo de algunos grupos de células mioepiteliales. La expresión nuclear de la proteína 14-3-3 σ ha sido previamente descrita por varios autores, atribuyendo este patrón de expresión a un peor pronóstico (Nakajima *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008; Okumura *et al.*, 2010). Otros autores, sin embargo, observaron un menor tiempo de supervivencia en aquellos casos con un patrón de tinción citoplasmática (Simpson *et al.*, 2004). Aunque en nuestra serie únicamente se produjo la expresión nuclear en un caso, ésta ocurrió en un caso con metástasis, lo que podría concordar con los resultados de aquellos autores que conceden un peor pronóstico a los casos con tinción nuclear. No obstante, se requiere de un mayor número de casos para poder elaborar conclusiones más consistentes en este aspecto.

En nuestro estudio, la proteína 14-3-3 σ se detectó en 78 (97%) de las neoplasias analizadas. En el compartimento mioepitelial se observó inmunorreactividad en el 100% y en el 77% de los tumores benignos y malignos, respectivamente, mientras que en el compartimento epitelial se obtuvo expresión en el 62% y 88% en los tumores benignos y malignos, respectivamente. Por otra parte, estos resultados inmunohistoquímicos concuerdan con los obtenidos en el ensayo mediante Western blot donde todas las neoplasias, tanto benignas como malignas, así como el nódulo linfático con metástasis, expresaron la proteína 14-3-3 σ .

En contraposición a nuestros resultados, la pérdida de la expresión de la proteína 14-3-3 σ ha sido descrita, mediante análisis inmunohistoquímico, en altos porcentajes en tumores de mama humanos, con tasas descritas del 81% (Simpson *et al.*, 2004), 77% (Simooka *et al.*, 2004; Mhaweche *et al.*, 2005a; 2005b) y 62 % (Suzuki *et al.*, 2007). Esta discrepancia podría ser explicada por el hecho de que la mayoría de los carcinomas de mama humanos se originan a partir de células epiteliales lumbinales, mostrando por tanto las neoplasias mamarias de la especie humana un inmunofenotipo general de epitelio luminal, basado en la expresión de diferentes citoqueratinas y otros

marcadores (Taylor-Papadimitriou y Lane, 1987; Lakhani y O'Hare, 2001). Por otra parte, en los estudios en los que se detectó ausencia de la proteína 14-3-3 σ en tumores de mama humanos, el tejido usado como control consistió en líneas celulares de células epiteliales mamarias humanas (HMECs) (Prasad *et al.*, 1992; Nacht *et al.*, 1999; Ferguson *et al.*, 2000). Estas células usadas como tejido control derivaban de cultivos celulares indeterminados de epitelio mamario normal, presentando un fenotipo predominantemente mioepitelial (O'Hare *et al.*, 1991; Page *et al.*, 1999; DiRenzo *et al.*, 2002). Como consecuencia, aquellas moléculas que se expresan preferentemente en células mioepiteliales parecían estar disminuidas en los carcinomas de mama humanos en comparación con estas líneas celulares (Simpson *et al.*, 2004).

Por otro lado, los tumores de mama caninos se caracterizan por la alta frecuencia de lesiones que muestran proliferación mioepitelial, tumores de mama complejos y mixtos (Misdorp, 1999) y, por consiguiente, las moléculas que se expresan preferentemente en las células mioepiteliales no parecen estar disminuidas en los tumores de mama caninos. Más aún, otras proteínas propuestas como supresores de tumores, como la p63 y la maspina (Abd El-Maqsoud *et al.*, 2010), se expresan en células mioepiteliales de la mama y, a pesar de su descripción como supresores de tumores, tanto la p63 como la maspina han sido detectados en un 90% (Gama *et al.*, 2003) y en un 98% (Espinosa de los Monteros *et al.*, 2005) de los tumores mamarios caninos, respectivamente, no observándose una dramática disminución de las mismas tal y como ocurre en la especie humana (Bailey *et al.*, 2006; Abd *et al.*, 2010). No obstante, es importante resaltar dos hechos: en primer lugar, aunque los resultados descritos por Gama *et al.* (2003) y Espinosa de los Monteros *et al.* (2005) hagan referencia a un gran número de casos positivos, 90% y 98 respectivamente, la expresión de las proteínas en sus trabajos (p63 y maspina) se vio disminuida si se expresaba en proporción a las células (principalmente células mioepiteliales) positivas, sin embargo estos trabajos no presentaron resultados cuantitativos al respecto. En segundo lugar, si de nuestro trabajo tenemos sólo en cuenta las neoplasias de tipo simple, que se corresponderían con el inmunofenotipo luminal humano, nuestros resultados muestran también que, a diferencia de la pérdida de expresión que algunos autores describen para las neoplasias humanas, nuestra serie de neoplasias simples

fueron positivas en un 94%, debido a la expresión de la proteína en uno u otro compartimento.

En el presente trabajo, se observó expresión de la proteína 14-3-3 σ en el 97% de las neoplasias mamarias analizadas inmunohistoquímicamente y en el 100% de los casos analizados mediante Western blot. La proteína 14-3-3 σ se expresó principalmente en células mioepiteliales de diferente morfología, preexistente, fusiformes, estrelladas, redondas y en los condrocitos de focos de metaplasia condroide de los tumores mixtos. Dicha expresión disminuyó desde las formas tumorales benignas hacia las malignas. Además, los tipos histológicos malignos, tanto simples como complejos, presentaron mayores niveles de expresión en las células neoplásicas epiteliales en comparación con las células epiteliales lumbinales normales.

Adicionalmente, la alta frecuencia de pérdida de la proteína 14-3-3 σ en los tumores de mama humano ha sido cuestionada por Moreira *et al.* (2005). En su estudio, sólo 9 de 105 carcinomas primarios de mama mostraron una expresión reducida de la proteína 14-3-3 σ contrariamente a la alta frecuencia detectada en diversos estudios previos, que indicaban la pérdida de expresión de la proteína 14-3-3 σ debido al silencio epigenético de la mayoría de las muestras analizadas (Ferguson *et al.*, 2000; Umbricht *et al.*, 2001; Simooka *et al.*, 2004; Mhawech *et al.*, 2005a) o en contraposición a otros estudios inmunohistoquímicos (Simooka *et al.*, 2004; Simpson *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2007). La discrepancia entre estos estudios revela que el papel real del gen 14-3-3 σ y su producto de transcripción debe ser estudiado con mayor profundidad.

En la actualidad los estudios en torno al gen 14-3-3 σ y la proteína 14-3-3 σ se centran, más que en su estudio inmunohistoquímico, en el grado de metilación presente en sus regiones CpG. De hecho, muchos estudios han descrito elevados grados de metilación del ADN en los tumores de mama humanos y una nula o escasa producción de ARN (Ferguson *et al.*, 2000; Umbricht *et al.*, 2001; Mhawech *et al.*, 2005a). El estudio de la metilación del gen 14-3-3 σ también se ha llevado a cabo sobre muestras obtenidas mediante punción-aspiración con aguja fina. Esta técnica ha sido propuesta para la

especie humana como un método adicional en el diagnóstico de lesiones mamarias sospechosas de transformación maligna (Jeronimo *et al.*, 2008).

Más aún, en la actualidad, la línea de investigación en la especie humana es la de detectar la metilación del ADN del gen *14-3-3 σ* , entre otros, y así realizar un barrido en pacientes con historia clínica de tumor de mama en búsqueda de posibles recidivas y/o metástasis (Jing *et al.*, 2008; Martínez-Galán *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2009; Zurita *et al.*, 2010). Sin embargo, otros autores consideran que, debido a la hipermetilación fisiológica del gen *14-3-3 σ* en las células sanguíneas, el estudio de la metilación de este marcador en el suero de pacientes con cáncer de mama podría no ser eficaz (Bhatia *et al.*, 2003). Nuestro trabajo se ha limitado a estudiar la expresión de la proteína *14-3-3 σ* en tejidos caninos. Se requiere de futuros estudios que analicen el grado de metilación del ADN de los tejidos neoplásicos mamarios caninos, así como el grado de metilación en sangre periférica. En la especie canina se han realizado escasos estudios acerca de marcadores tumorales en sangre periférica, habiéndose identificado que la detección de moléculas como la CK19, HER-2 y el EGFR en sangre, pudiera servir como factor pronóstico en el futuro (da Costa *et al.*, 2010).

La proteína *14-3-3 σ* ha sido descrita como un valioso marcador mioepitelial en el tejido mamario humano (Simpson *et al.*, 2004; Leibl *et al.*, 2005). En nuestro trabajo, el estudio de la co-expresión de las proteínas *14-3-3 σ* y p63, llevada a cabo mediante una técnica de doble inmunotinción en tejidos mamarios normales y neoplasias mamarias malignas, reveló una gran sensibilidad para la proteína *14-3-3 σ* como marcador de células mioepiteliales, ya que todas las células positivas a p63 (un marcador específico de células mioepiteliales) (Gama *et al.*, 2003) co-expresaron la proteína *14-3-3 σ* .

El clon 4A4 de la proteína p63, el mismo que el empleado en nuestro trabajo, también se ha utilizado para estudiar la implicación de las células mioepiteliales en tumores glandulares primarios de piel canina, incluyendo tumores de glándulas apocrinas, ceruminosas y perianales. De manera similar a la glándula mamaria, la p63 se detectó en células mioepiteliales y basales de las neoplasias estudiadas, así como en una proporción de células epiteliales

neoplásicas maduras. No obstante, este último hallazgo requiere de mayores estudios. Finalmente, los autores sugieren que la proteína p63 pudiera estar implicada en la oncogénesis de estos tipos tumorales (Saraiva *et al.*, 2008).

Se ha descrito una elevada participación de la proteína p63 en los tumores de mama caninos (Gama *et al.*, 2003), donde dicha proteína se expresó en el 91,4% de los casos analizados. Además, el anticuerpo anti-p63 permitió, a diferencia del diagnóstico histológico rutinario, identificar neoplasias mamarias malignas con participación de las células mioepiteliales. Así, en varios carcinomas simples túbulo-papilares se identificaron focos de proliferación neoplásica de células mioepiteliales, lo que dio lugar a su reclasificación como carcinomas complejos. Muy importante resulta el hecho de que 7 de los 10 carcinomas simples sólidos resultaran positivos para la expresión de este marcador, lo que implica una elevada participación de las células mioepiteliales en este tipo histológico (Gama *et al.*, 2003).

En nuestro trabajo, la co-expresión de las proteínas 14-3-3 σ y p63 en 9 carcinomas sólidos simples reveló la participación en los mismos de células de inmunofenotipo mioepitelial, hallazgo que no siempre puede ser identificado mediante las técnicas histológicas de rutina (hematoxilina-eosina), como han indicado diversos autores usando diferentes marcadores de células mioepiteliales (Gama *et al.*, 2003; Martín de las Mulas *et al.*, 2004; Espinosa de los Monteros *et al.*, 2005). Por ello, es recomendable el uso conjunto de la proteína 14-3-3 σ junto con otros marcadores de células mioepiteliales, para el estudio de la glándula mamaria canina normal y neoplásica.

Al igual que en el presente trabajo, otros autores han empleado la doble inmunotinción para discernir la validez de un nuevo marcador de células mioepiteliales. En el estudio de Ramalho *et al.* (2006) se empleó el mismo kit que el usado en el presente trabajo, con el objetivo de estudiar la expresión de la citoqueratina (CK) 5 y la proteína p63. Los resultados de estos autores pusieron de manifiesto que, aunque la CK5 marcaba las mismas poblaciones que la proteína p63, otro grupo de células de morfología epitelial también expresaba la CK5, no pudiendo ser considerada como una citoqueratina específica de células mioepiteliales.

Un descubrimiento muy interesante de la relación entre las proteínas 14-3-3 σ y p63 se centra en que se ha encontrado que uno de los dos grupos de isoformas de la proteína p63, denominada Δ Np63, suprime la expresión de la proteína 14-3-3 σ (Westfall *et al.*, 2003). Sin embargo, hasta la fecha, otros autores no han sido capaces de demostrar tal interacción en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina (Lodygin *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, 2004; 2005).

El anticuerpo anti-p63 usado en nuestro estudio identifica los dos grupos de isoformas (TA y Δ N), de manera que no pueden inferirse interacciones específicas entre estas dos moléculas. Sin embargo, las diferentes poblaciones celulares observadas en el estudio de co-expresión de las proteínas 14-3-3 σ y p63, así como que no se encontraron condroblastos de fenotipo +/+, pudiera deberse a algún tipo de interacción antagonista entre una isoforma específica de la proteína p63 y la proteína 14-3-3 σ , tal y como han demostrado otros autores (Sniezek *et al.*, 2002). Más aún, se ha demostrado que la proteína p63, análogo de la proteína p53, importante supresor de tumores, cuando se expresa en altos niveles está asociada a un mejor pronóstico en algunos tipos de neoplasias en humanos (Calli *et al.*, 2011). Futuros estudios que analicen la co-expresión de las isoformas Δ Np63 y TAp63 y la proteína 14-3-3 σ en tejidos mamarios caninos podrían arrojar más claridad sobre posibles interacciones entre estas moléculas.

Recientemente, se ha comparado la expresión de la forma Δ N de la proteína p63 con la expresión del clon 4A4 en los tumores de mama de tipo mixto de la especie canina (Bertagnolli *et al.*, 2009). No obstante, como se ha comentado previamente, el clon (4A4) usado para comparar con la isoforma Δ N identifica indistintamente las 6 isoformas descritas de la proteína p63. En este estudio se demostró la presencia de ambos tipos de proteína en el núcleo de las células mioepiteliales en el 100% de los tumores mixtos benignos y en el 94% de los carcinomas en tumor mixto benigno, sugiriendo que la isoforma Δ N podría estar involucrada en el desarrollo de este último tipo tumoral. Se requerirían de más estudios inmunohistoquímicos que analizaran la expresión de las diferentes isoformas de la proteína p63 en tumores de mama caninos.

Se ha sugerido que como marcador epitelial, la proteína 14-3-3 σ podría ayudar en el diagnóstico de diferentes tipos de tumores (Kaneuchi *et al.*, 2004; Mhaweche *et al.*, 2005c). En las últimas dos décadas, las investigaciones sobre los marcadores de diferenciación celular han servido para incrementar el conocimiento sobre la histogénesis de los tumores de mama caninos. Existen diferentes hipótesis acerca del papel que juegan las células mioepiteliales en la histogénesis de los tumores de mama complejos y mixtos que, por otra parte, son los más comunes en la especie canina (Sorenmo *et al.*, 2011).

Históricamente, existen 3 líneas de pensamiento respecto al origen de los componentes mesenquimales (cartílago, hueso y/o grasa) que se observan en los tumores mixtos: metaplasia del componente epitelial, metaplasia del tejido conectivo estromal y metaplasia del componente mioepitelial (Misdorp *et al.*, 1999). Aunque los mecanismos exactos no se conocen completamente, se han realizado numerosos estudios usando diferentes paneles de marcadores de células basales que han reforzado la hipótesis del componente mioepitelial como origen de la metaplasia hacia tejido mesenquimal. Tanto en los tumores complejos como en los mixtos, las células mioepiteliales de morfología normal o pre-existentes y en íntimo contacto con la membrana basal mantuvieron sus normales perfiles inmunohistoquímicos, mientras que en las zonas de proliferación de este tipo celular, aquellas células de morfología fusiforme, estrellada y redondeada, tendieron a mostrar menor expresión de CK5, CK14, actina de músculo liso, calponina, maspina y p63 y mayor expresión de vimentina (Sorenmo *et al.*, 2011). El hecho de que los condrocitos encontrados en los focos de metaplasia cartilaginosa mantengan la expresión de moléculas expresadas en las células mioepiteliales (tales como la PTHrP, BMP-6, calponina, maspina, p63, caveolina-1) hace pensar que estas células tengan un papel importante en los mecanismos de histogénesis de los tumores de mama caninos (Okada *et al.*, 1997; Tateyama *et al.*, 2001; Espinosa de los Monteros *et al.* 2002; 2005; Gama *et al.*, 2003; Amorim *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2010).

En el presente trabajo, se observó expresión de la proteína 14-3-3 σ en células mioepiteliales de diferente morfología (fusiforme, estrellada y redondeada) así como en condrocitos, con una tendencia a la disminución en

dicha expresión en relación con la desdiferenciación de dichas células. La proteína p63 tuvo un patrón de expresión similar, disminuyendo su expresión desde la forma pre-existente de la célula mioepitelial hasta las formas más desdiferenciadas. Estos resultados concuerdan con los de otros autores (Destexhe *et al.*, 1993; Griffey *et al.*, 1993; Okada *et al.*, 1997; Gärtner *et al.*, 1999; Tateyama *et al.*, 2001; Espinosa de los Monteros *et al.*, 2002; 2005; Gama *et al.*, 2003; Ramalho *et al.*, 2006; Bertagnolli *et al.*, 2009; Amorim *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2010).

Cabe resaltar que, en nuestro estudio, el cartilago analizado en los tejidos normales no expresó la proteína 14-3-3 σ , al igual que en la especie humana (Nakajima *et al.*, 2003). Sin embargo, sí se observó expresión en los condrocitos presentes en los tumores mixtos. Este hallazgo recalca el más que probable papel de las células mioepiteliales en la histogénesis de los tumores mixtos de la especie canina.

Nuestros resultados, además, han identificado una población de células neoplásicas con reacción altamente positiva para la proteína 14-3-3 σ cuyo origen se atribuyó al componente epitelial luminal del parénquima mamario. Estos resultados indican claramente que la proteína 14-3-3 σ no es un marcador exclusivo de las células mioepiteliales, sino que, además, su expresión se encuentra aumentada en los tumores de mama caninos en el compartimento epitelial. Nuestros hallazgos no concuerdan, por tanto, con el papel de supresor tumoral que frecuentemente es atribuido a la proteína 14-3-3 σ (Hermeking *et al.*, 1997; Chan *et al.*, 1999; Ferguson *et al.*, 2000; Laronga *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2004; Simooka *et al.*, 2004; Urano *et al.*, 2004).

Sin embargo, la desregulación de la expresión de la proteína 14-3-3 σ ha sido observada en una amplia variedad de cánceres humanos, habiéndose descrito tanto la pérdida/disminución de la expresión (Prasad *et al.*, 1992; Ferguson *et al.*, 2000; Iwata *et al.*, 2000; Vercoutter-Edouart *et al.*, 2001; Gasco *et al.*, 2002a,b; Lodygin *et al.*, 2003; Akahira *et al.*, 2004; Lodygin *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2004; Simooka *et al.*, 2004; Simpson *et al.*, 2004; Uchida *et al.*, 2004; Urano *et al.*, 2004; Mhaweche *et al.*, 2005a; Bhawal *et al.*, 2008; Kunze *et al.*, 2008) como la sobre-expresión/neoexpresión de la proteína 14-3-

3 σ (Shoji *et al.*, 1994; Villaret *et al.*, 2000; Osada *et al.*, 2002; Sniezek *et al.*, 2002; Yatabe *et al.*, 2002; Nakajima *et al.*, 2003; Guweidhi *et al.*, 2004; Kaneuchi *et al.*, 2004; Sano *et al.*, 2004; Nakayama *et al.*, 2005; Perathoner *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 2005; Neupane y Korc., 2008; Wang *et al.*, 2008; Sitek *et al.*, 2009; Mühlmann *et al.*, 2010; Okumura *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2010; Ravi *et al.*, 2011; Shiba-Ishi *et al.*, 2011), asociándose ambos procesos al desarrollo de tumores malignos.

Así, varios autores han sugerido que el papel de la proteína 14-3-3 σ pudiera variar dependiendo del tipo tumoral (Perathoner *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 2005; Neupane *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). De hecho, algunos autores han denominado a la proteína 14-3-3 σ como “la espada de doble filo del cáncer humano” (Li *et al.*, 2009b).

Así, en nuestro trabajo, además de observarse un aumento de expresión de la proteína 14-3-3 σ en las células epiteliales neoplásicas, se observó que, aquellas con mayor poder de invasión y metástasis solían presentar una mayor positividad mostrando moderada o intensa inmunotinción. Se han publicado diversos artículos que apoyan nuestros resultados. En primer lugar, la sobre-expresión concomitante del receptor del factor de crecimiento epidérmico y de la proteína 14-3-3 σ ha sido observada en cáncer de páncreas humano (Neupane and Korc, 2008). En segundo lugar, en este tipo de cáncer la proteína 14-3-3 σ ha sido relacionada con el aumento de la motilidad celular y con el incremento en el factor de crecimiento epidérmico que estimula la invasión en el estroma. Todo ello parece indicar que la expresión concomitante del receptor del factor de crecimiento epidérmico y la proteína 14-3-3 σ puede aumentar la capacidad invasiva de las células neoplásicas in vivo (Perathoner *et al.*, 2005; Neupane y Korc, 2008). De hecho, la sobre-expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico ha sido descrita en tumores de mama caninos (Gama *et al.*, 2009) y, en consonancia con nuestros resultados, puede sugerirse la posibilidad de que exista algún tipo de interacción entre estas dos moléculas en los tumores de mama caninos.

Por otro lado, los hallazgos de otros autores que ponen de manifiesto que la proteína 14-3-3 σ es secretada al medio extracelular apunta a su

implicación en los eventos autocrinos y paracrinos, y plantea hipótesis interesantes sobre las funciones extracelulares de la proteína 14-3-3 σ (Ghahary *et al.*, 2004; 2005; Medina *et al.*, 2007). Así, se ha observado que la proteína 14-3-3 σ es secretada por queratocitos diferenciados y que, tras su liberación, induce la expresión de las metaloproteinasas de la matriz (MPM) en fibroblastos dérmicos (Ghahary *et al.*, 2004; 2005; Medina *et al.*, 2007). Además, el tratamiento de fibroblastos con recombinantes exógenos de la proteína 14-3-3 σ hace que se incremente la producción de MPM por los fibroblastos. En vista de la habilidad de las MPM para degradar el colágeno y promover la carcinogénesis en la especie humana y la canina (Hirayama *et al.*, 2002), estas observaciones sugieren que la proteína 14-3-3 σ pudiera favorecer la progresión, poder de invasión y la metástasis de los tumores de mama caninos.

El hallazgo de que la proteína 14-3-3 σ aumenta su expresión en función de la pérdida de receptores de estrógenos (Nakayama *et al.*, 2005), hecho este último que ocurre también en los tumores de mama de peor diferenciación y pronóstico (Martín de las Mulas *et al.*, 2005), pudiera estar relacionado con el aumento de expresión de la proteína 14-3-3 σ en las células epiteliales neoplásicas observado en nuestra serie.

Recientemente, otros autores han estudiado la proteína caveolina-1 (Cav-1), supuesta proteína supresora de tumores, que se expresa en las células mioepiteliales de la glándula mamaria humana y canina (Amorim *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2010). En estos trabajos se observó una expresión homogénea que la Cav-1 en células mioepiteliales de la glándula mamaria normal así como en fibroblastos del tejido conectivo, siendo las células epiteliales luminales negativas. Sin embargo, se observó una neoexpresión de la Cav-1 en las células neoplásicas epiteliales (Amorim *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2010). Dichos resultados arrojan una interesante similitud con los obtenidos sobre la expresión de la proteína 14-3-3 σ en el presente trabajo.

Por otra parte, en nuestro estudio se observó que numerosas figuras mitóticas, algunas de ellas de morfología bizarra, células neoplásicas infiltrativas, células neoplásicas en el interior de vasos linfáticos, así como las

metástasis a linfonodos regionales y a bazo presentaron una generalizada expresión de la proteína 14-3-3 σ . Diferentes evidencias apoyan una posible función supresora de tumores de la proteína 14-3-3 σ . En primer lugar, la proteína 14-3-3 σ es la única isoforma de la familia 14-3-3 cuya transcripción se produce tras un daño del ADN (Hermeking *et al.*, 1997; Chan *et al.*, 1999). En segundo lugar, su expresión induce el arresto de la fase G2/M debido al secuestro de la cdc2-ciclina-B1, lo que permite la interrupción momentánea del ciclo celular y la puesta en marcha de los mecanismos de reparación del ADN (Hermeking *et al.*, 1997). Por último, su expresión se ve silenciada en diferentes tipos de cáncer humano, principalmente por su inactivación epigenética a través de la metilación del ADN (Hermeking, 2003; Lodygin y Hermeking, 2006). Por tanto, el hecho de que en nuestro estudio se hayan observado abundantes células neoplásicas positivas, incluidas células en mitosis, no concuerda con una de las funciones más importante propuestas para la proteína 14-3-3 σ .

Sin embargo, varios autores han obtenido resultados que podrían explicar la sobre-expresión de la proteína 14-3-3 σ detectada en las neoplasias mamarias caninas de nuestra serie, así como su expresión en invasiones vasculares y metástasis. Se ha observado que altos niveles de la proteína 14-3-3 σ inducen quimiorresistencia y atenúan las señales proapoptóticas que se originan en las células tumorales (Neupane y Korc, 2008). Además, se ha comprobado que la proteína 14-3-3 σ puede unirse momentáneamente a las proteínas BAX y CDK1, retrasando la cascada de señales que generan la apoptosis (Samuel *et al.*, 2001; Subramanian *et al.*, 2001; Tsuruta *et al.*, 2004). Podría ocurrir que, durante la carcinogénesis se produjera una población clonal de células cuya sobre-expresión de la proteína 14-3-3 σ bloqueara en su totalidad los mecanismos proapoptóticos, permitiendo así una replicación indefinida de las células neoplásicas.

Por otra parte, Zhang *et al.* (2004) mostraron que el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1) incrementa la expresión de la proteína 14-3-3 σ así como la progresión del ciclo celular en una línea celular de carcinoma de mama humano. Estos efectos producidos por la proteína IGF1 fueron independientes de la proteína p53. Las manipulaciones llevadas a

cabo para reducir la expresión de la proteína 14-3-3 σ indujeron una disminución de los niveles de IGF1, demostrando que, al menos en líneas celulares de carcinoma de mama humano, una interacción positiva entre la proteína 14-3-3 σ y la progresión del ciclo celular mediada por la proteína IGF1 (Zhang *et al.*, 2004). El papel de la proteína IGF1 ha sido escasamente estudiado en la especie canina y se cree que pudiera tener un rol similar al desarrollado en humanos (Mol *et al.*, 1997). Esta hipótesis se debe al hecho de que los progestágenos inducen la secreción de la hormona del crecimiento (GH) en la glándula mamaria (Mol *et al.*, 1999). La GH puede ejercer efectos proliferativos directos a nivel local así como inducir la síntesis de la proteína IGF1 (Mol *et al.*, 1997). De hecho, en la especie canina, los homogeneizados de tumores de mama malignos han demostrado poseer mayores niveles de expresión de IGF1 que los de tumores benignos (Queiroga *et al.*, 2008). Por tanto, podría sugerirse una interacción entre estas dos moléculas, 14-3-3 σ y IGF1, que promoviera la carcinogénesis en los tumores de mama caninos.

Por último, se ha observado que la proteína 14-3-3 σ juega un papel importante en los mecanismos de transición epitelial-mesenquimal, involucrados en los procesos de invasión del tejido estromal (Sureban *et al.*, 2011). Así mismo, también muy recientemente, en un estudio realizado sobre 1500 proteínas expresadas en líneas celulares de tumores de mama de rata, la única proteína marcadamente incrementada en la línea celular de elevado poder metastásico fue la proteína 14-3-3 σ (Dabbous *et al.*, 2011), hallazgos que concuerdan con los resultados de la presente Tesis Doctoral.

5.4. RELEVANCIA CLÍNICA DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA 14-3-3 σ EN LOS TEJIDOS NEOPLÁSICOS MAMARIOS CANINOS

Los tumores de mama representan el tumor más frecuente en la mujer, con más de un millón de nuevos casos y 370.000 muertes anualmente en todo el mundo (Zurita *et al.*, 2010). De manera similar, los tumores de mama de la especie canina representan el tumor más frecuente de la especie canina, representando el 70% de los tumores de esta especie (Merlo *et al.*, 2008).

Hasta la fecha, el tratamiento de esta patología es eminentemente quirúrgico, representando los casos más avanzados un reto terapéutico para el veterinario oncólogo. Por tanto, la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas es un campo de investigación en auge (Morris, 2010).

Diversos trabajos han descrito varias líneas celulares tumorales, una de ellas de origen mamario, que sobre-expresan la proteína 14-3-3 σ y que son resistentes a varios agentes quimioterápicos. En estos trabajos se bloqueó la expresión de la proteína 14-3-3 σ en dichas líneas celulares observando que su sensibilidad a la doxorrubicina aumentaba (Sinha *et al.*, 1999 Liu *et al.*, 2006). Por tanto, estos investigadores han sugerido que esta proteína debería de estudiarse como una nueva diana terapéutica. Esta línea de pensamiento también ha sido propuesta por otros autores (Huang *et al.*, 2004; Neupane *et al.*, 2008).

Aunque los resultados en el presente trabajo se limitan a documentar la expresión de la proteína 14-3-3 σ en las neoplasias de mama en la especie canina, el hecho de que dicha proteína se sobre-exprese en este tipo tumoral así como en casos con invasión vascular y metástasis, es decir, en casos avanzados de la enfermedad neoplásica, sería interesante, cuanto menos, considerar a la proteína 14-3-3 σ como una posible diana terapéutica. No obstante, se necesitan más estudios que corroboren los resultados del presente trabajo, así como la investigación de la expresión de esta proteína en líneas celulares de tumor de mama canino, con el objeto de caracterizar sus mecanismos de acción en las neoplasias mamarias caninas.

Primera. Las técnicas de detección inmunohistoquímica y de Western blot de la proteína 14-3-3 σ en tejidos caninos han sido estandarizadas y permiten, con fiabilidad, documentar su expresión, tanto en tejidos fijados en formol y embebidos en parafina como en tejidos frescos conservados a -80°C, utilizando anticuerpos comerciales desarrollados frente a la proteína 14-3-3 σ humana.

Segunda. La detección mediante Western blot de una proteína de 30 kDa, utilizando dos anticuerpos comerciales específicos frente a la proteína 14-3-3 σ de origen humano, valida y demuestra la especificidad de estos anticuerpos para detectar la proteína 14-3-3 σ en tejidos caninos.

Tercera. En la especie canina, la proteína 14-3-3 σ presenta altos niveles de expresión en las células epiteliales de epidermis, anexos cutáneos, urotelio, conductos de próstata y glándula salival y en las células mioepiteliales de la glándula salival, no expresándose en estómago, intestino, hígado, páncreas, glándulas endocrinas, testículos, ovarios, tejido nervioso y tejido linfoide.

Cuarta. En la glándula mamaria canina normal, la proteína 14-3-3 σ se expresa de manera constante e intensa en las células mioepiteliales, mientras que su expresión en las células epiteliales es débil y ocasional.

Quinta. El 97% de las neoplasias mamarias caninas analizadas expresaron la proteína 14-3-3 σ . En las células mioepiteliales, esta expresión disminuye progresivamente desde las formas pre-existentes hacia las formas fusiformes y estrelladas. La expresión de la proteína 14-3-3 σ en células epiteliales fue más frecuente e intensa en las neoplasias mamarias malignas que en las neoplasias benignas, las displasias y la glándula mamaria normal.

Sexta. La proteína 14-3-3 σ presenta altos niveles de expresión en las células epiteliales neoplásicas con carácter infiltrativo, embólico y metastásico, lo que sugiere un papel de esta proteína en la adquisición de un comportamiento biológico más agresivo en las neoplasias mamarias caninas.

Séptima. La proteína 14-3-3 σ y la proteína p63 se co-expresan en las células mioepiteliales de la glándula mamaria canina normal y neoplásica. Esta co-expresión permite identificar un grupo de neoplasias malignas de origen mioepitelial no detectable con técnicas histoquímicas de rutina como la hematoxilina-eosina.

Las proteínas 14-3-3 son una familia de polipéptidos ácidos de 20-33 kDa que, espontáneamente, se ensamblan como dímeros. Estas proteínas están ampliamente expresadas en las células eucariotas y se les relaciona con diversas funciones biológicas tales como la transducción de señales, el control del ciclo celular, la apoptosis, la transcripción, la respuesta al estrés y la transformación maligna.

De las siete isoformas descritas, la proteína 14-3-3 σ , también llamada estratifina o “marcador epitelial mamario humano-1” se localiza, en la especie humana, en diferentes tipos de células de origen epitelial, y se le ha relacionado con el desarrollo de cáncer. Así, se han observado alteraciones en la expresión de la proteína 14-3-3 σ en una amplia variedad de neoplasias, habiéndose asociado con malignidad tanto niveles elevados como disminuidos de la misma.

En este trabajo hemos investigado la expresión y el patrón de distribución de la proteína 14-3-3 σ mediante técnicas inmunohistoquímicas y Western blot, en tejidos normales y neoplasias mamarias de la especie canina. Hemos estandarizado las técnicas inmunohistoquímicas y de Western blot empleando dos anticuerpos comerciales frente a esta proteína.

En los tejidos normales caninos, se demostró la expresión inmunohistoquímica y por Western blot de la proteína 14-3-3 σ en varios tejidos epiteliales, observándose pequeñas diferencias con respecto al patrón de distribución descritos para la especie humana. Así, la proteína 14-3-3 σ presentó altos niveles de expresión en las células epiteliales de epidermis, anexos cutáneos, urotelio, conductos de próstata y glándula salival y en las células mioepiteliales de la glándula salival, no expresándose en estómago, intestino, hígado, páncreas, glándulas endocrinas, testículos, ovarios, tejido nervioso y tejido linfoide.

En la glándula mamaria canina normal, la proteína 14-3-3 σ se expresó de manera constante e intensa en las células mioepiteliales, mientras que su expresión en las células epiteliales fue débil y ocasional.

En las neoplasias mamarias de la especie canina, la proteína 14-3-3 σ se expresó en el 97% de los tumores examinados, localizándose no sólo en las células mioepiteliales si no también en una alta proporción de células epiteliales. En las células mioepiteliales, esta expresión disminuyó progresivamente desde las formas pre-existentes hacia las formas fusiformes y estrelladas, mientras que la expresión en las células epiteliales fue más frecuente e intensa en las neoplasias mamarias malignas que en las neoplasias benignas, las displasias y la glándula mamaria normal ($P < 0.001$). Además, la proteína 14-3-3 σ presentó altos niveles de expresión en las células epiteliales neoplásicas con carácter infiltrativo, embólico y metastásico, lo que sugiere un papel de esta proteína en la adquisición de un comportamiento biológico más agresivo en las neoplasias mamarias caninas.

Por último, el estudio de la co-expresión de las proteínas 14-3-3 σ y p63 (un marcador específico de células mioepiteliales), mediante una técnica de doble inmunotinción, en tejidos mamarios normales y neoplasias mamarias malignas, permitió identificar un grupo de neoplasias malignas de origen mioepitelial no detectable con técnicas histoquímicas de rutina como la hematoxilina-eosina.

14-3-3 proteins are a family of abundant, widely expressed in all eukaryotic cells 20-33 kDa acidic polypeptides that spontaneously self-assemble as dimmers. They are expressed in all eukaryotic cells, are highly conserved in protein sequence and function from yeast to mammals and are involved in several biological functions such as signal transduction, cell-cycle control, apoptosis, transcription, stress responses and malignant transformation.

Among the seven 14-3-3 isoforms, the 14-3-3 σ protein, also called stratifin or “human mammary epithelial marker 1”, which is localized in normal human tissues exclusively in various epithelial cell types, it has been especially linked with cancer development. Alteration of 14-3-3 σ protein has been observed in a wide variety of human cancers, with both decreasing and increasing 14-3-3 σ protein levels being associated with development of malignancy.

In this work we aimed to investigate the expression and the distribution pattern of 14-3-3 σ protein by immunohistochemical and Western blot analysis in normal tissues and mammary tumors of canine species. We have standardized the immunohistochemical and Western blot techniques using two commercial antibodies against this protein.

In normal canine tissue samples, immunohistochemical and Western blot expression of 14-3-3 σ protein was demonstrated in several epithelial tissues with some minor differences of distribution pattern compared with human normal tissues. The 14-3-3 σ protein was highly expressed in the epithelial cells from epidermis, cutaneous anexa, urothelium, prostatic and salivary gland ducts and myoepithelial cells of the salivary gland, no immunodetection was observed in stomach, intestine, liver, pancreas, endocrine glands, testicle, ovary, nervous and lymphoid tissues.

In normal canine mammary gland, the 14-3-3 σ protein was consistently and highly expressed in the myoepithelial cells, whereas the expression in the epithelial cells was weak and occasional.

In the canine mammary neoplasms, the 14-3-3 σ protein was expressed in the 97% of the examined tumours, presented not only in the myoepithelial cells but also in a high proportion of the epithelial cells. Expression levels were elevated and reduced in neoplastic epithelial and myoepithelial cells, respectively ($P < 0.001$). In addition, intense expression of 14-3-3 σ was also detected in neoplastic epithelial cells infiltrating lymph vessels and lymph nodes and suggests a possible role for this protein in the malignant transformation of canine mammary neoplasms.

Finally, the assessment of the co-expression of 14-3-3 σ and the myoepithelial cells-specific marker p63, using a double immunostaining, in both normal and neoplastic mammary tissue samples, allowed to identify the myoepithelial origin of a group of malignant neoplasms, which was not always identified by routine histochemical techniques such as hematoxylin-eosin.

Al Dr. Antonio Espinosa de los Monteros y Zayas, director de esta tesis, que me abrió las puertas del Área de Anatomía Patológica de esta Universidad y que creyó sin lugar a dudas que sería capaz de finalizar el presente trabajo. Agradezco su tolerancia al comprender mi inquietud por el trabajo, así como, su constante presencia en el despacho, hecho digno de mención y reconocimiento, y que ha permitido que resolviera todas las dudas que han surgido durante la elaboración de esta tesis. Le agradezco las meticulosas correcciones de todos los trabajos científicos que hasta ahora hemos realizado juntos. Su buen hacer, personal y profesional, está reflejado en el desarrollo y elaboración de esta tesis doctoral.

Al Dr. Pedro Herráez Thomas, co-director de esta tesis, por su incombustible empeño en colaborar y por la excelencia de su ayuda. Sus ideas y criterios han aportado un valor añadido, tanto a este trabajo como a otros en los que he tenido la oportunidad y el honor de participar a su lado.

A ambos, por su gran paciencia y esfuerzo durante la corrección de esta tesis.

Al Dr. Francisco Rodríguez Guisado, gracias por avisarme siempre para ver el diagnóstico y enseñar de una manera sencilla sus imponderables conocimientos de Anatomía Patológica.

A los tres. Merecen mi respeto y admiración como extraordinarios docentes e investigadores. Ellos han conducido mi formación en Anatomía Patológica a pesar de sus múltiples ocupaciones profesionales y personales y me han enseñado lo que del complicado mundo de la Patología Animal sé hasta ahora. Su bibliografía y recursos han estado siempre a mi disposición. Así mismo, les agradezco su preocupación personal y anímica durante los duros momentos que he pasado.

A la Dra. Marisa Ana Andrada Borzollino, por su inagotable capacidad de trabajo que se contagia a quien está a su lado. Le agradezco su dedicación a la enseñanza así como el tiempo que ha dedicado en mostrarme cualquier hallazgo de necropsia o lesión histológica y que han enriquecido mi formación.

Le agradezco profundamente sus constantes muestras de cariño que también estuvieron presentes cuando más lo necesité.

A la Dra. María José Caballero. Gracias por animarme a concluir el trabajo empezado. La colaboración que hemos tenido en el trabajo ha permitido impregnarme de la gran calidad científica que como investigadora posee.

Al Dr. Miguel Rivero Santana por facilitarme la entrada en el grupo de los alumnos internos y que sin duda fue el comienzo de mi interés por el área de la Anatomía y Anatomía Patológica. Por todo ello, y sobre todo, por su amistad.

A la Dra. Juana Martín de Las Mulas. Gracias por aceptarme como alumno colaborador del Departamento de Anatomía Patológica Comparadas de la Universidad de Córdoba durante mi época de estudiante de intercambio, por su colaboración desinteresada y por su entusiasmo por la investigación.

Al Dr. Antonio Fernández Rodríguez, por su apoyo e interés en que esta tesis viera la luz.

A Don Oscar Quesada Canales. Cuando se dice de alguien, “lo quiero como a un hermano”, deja patente el estrecho lazo que existe entre dos personas. Eso ocurre en este caso. Considero esta tesis tanto mía como tuya, por todos los conocimientos que me has aportado y por prestarme ayuda científica o personal todas y cada una de las veces que la he necesitado. Por todo ello, tienes en mí a un amigo para toda la vida.

A Mónica Betancor. Mi compañera y amiga. Agradezco tu amistad y la ayuda profesional y personal que siempre me has brindado. Tienes todo mi respeto y admiración como persona e investigadora.

A Gustavo por su colaboración y amistad. A Héctor, Manolo, Ayoze, Mariña, Ana y Eva, por aceptar al nuevo becario como a uno más del grupo. Ellos han sido para mí, un ejemplo de amistad y trabajo en equipo.

A Esteban Pérez García y a José Déniz Fleitas, por su amistad. A José Déniz agradezco el haberme facilitado todo lo necesario para la realización de los Western blot de esta tesis. Por todo ello y más, muchas gracias amigos.

A Águeda, Ani, Pedro y Jose por ayudarme en el inicio de mi formación técnica. A los miembros del grupo de investigación de cetáceos del IUSA por sus muestras de apoyo. Gracias a Mercedes por facilitar la burocracia necesaria para la tramitación de esta tesis. A Lita y Fela por alegrar con su presencia las mañanas en la facultad.

A Don Miguel García Bello, estadístico de la Unidad Investigadora del Hospital Dr. Negrín, por su disponibilidad y el tratamiento estadístico de los datos de esta tesis.

A las clínicas veterinarias *La Heredad*, *Benartemi*, *Jaira*, *Albea* y *Vegueta* por facilitarme la muestras de neoplasias frescas.

A mi hermano, el Dr. Luis Suárez Bonnet. Gracias por todas las clases de inglés que me diste cuando era pequeño y que han servido para que entendiera los artículos científicos. Agradezco tu amor y apoyo durante todo este tiempo.

A mi hermana, la Dra. Elena Suárez Bonnet. Gracias por toda la ayuda que me has prestado en la realización de esta tesis. Gracias por tus clases de inglés y tu gran interés por que concluyera este trabajo. Eres la luz de mi vida.

A mi madre por darme la vida, sin nada a cambio.

A los familiares que se han preocupado por mí durante todo este tiempo, y me siguen dando su cariño y atenciones. En especial a Tía Tere que no ha dejado nunca de interesarse por mí.

Al Dr. Pablo Lupiola Gómez, por su gran corazón, sus constantes muestras de apoyo, afecto y por los momentos culturales que hemos compartido.

A la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria por la concesión de la Beca de Doctorado que me ha sustentado durante estos años.

A Idaira por ser mi mejor amiga, la persona que mejor me ha comprendido, por todos los momentos que hemos compartido y por sus ánimos para que concluyera esta tesis.

A mis amigos Ravi, Vikesh, Adán e Idaira, por su amistad y por estar conmigo en los momentos más duros de mi vida.

Por último, me resta escribir palabras de agradecimiento hacia mi padre, Don Esteban Luis Suárez López. Sin embargo, no existen suficientes palabras para ello. Y es que, lo que siento hacia ti no es gratitud, es mucho más que eso. Has impreso en mí un sello que sólo un caballero de espíritu científico, valiosísimos conocimientos, estoicos principios morales, trabajador infatigable y padre ejemplar podría transmitir. Hasta mi último aliento, viviré siempre tratando de hacer honor a tu nombre. Te quiero mucho Papá.

A

Abd El-Maqsoud, N.M., Tawfik, E.R. (2010). Loss of Maspin Expression in Bladder Cancer: Its Relationship with p53 and Clinicopathological Parameters. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute* **22**(1):1-12.

Abd El-Rehim, D.M., Pinder, S.E., Paish, C.E., Bell, J., Blamey, R.W., Robertson, J.F., Nicholson, R.I., Ellis, I.O. (2004). Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *Journal of Pathology* **203**(2):661-671.

Akahira, J., Sugihashi, Y., Suzuki, T., Ito K., Niikura, H., Moriya, T., Nitta, M., Okamura, H., Inoue, S., Sasano, H., Okamura, K., Yaegashi, N. (2004). Decreased expression of 14-3-3 sigma is associated with advanced disease in human epithelial ovarian cancer: its correlation with aberrant DNA methylation. *Clinical Cancer Research* **10**(8): 2687-2693.

Allen, S.W., Prasse, K.W., Mahaffey, E.A. (1986). Cytologic differentiation of benign from malignant canine mammary tumors. *Veterinary Pathology* **6**:649-655.

Allred, D.C., Harvey, J.M., Berardo, M., Clark, G.M. (1998). Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Modern Pathology* **11**(2):155-168.

Amorim, I., Lopes, C.C., Faustino, A.M., Pereira, P.D. (2010). Immunohistochemical expression of caveolin-1 in normal and neoplastic canine mammary tissue. *Journal of Comparative Pathology* **143**(1):39-44.

Andersen, A.C., Rosenblatt, L.S. (1969). The effect of Whole-Body X-Irradiation on the median lifespan of female dogs (Beagle). *Radiation Research* **39**:177-200.

Antuofermo, E., Miller, M.A., Pirino, S., Xie J., Badve, S., Mohammed S.I. (2007). Spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs--a model of breast cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **11**:2247-2256.

Aprelikova, O., Pace, A.J., Fang, B., Koller, B.H., Liu, E.T. (2001). BRCA1 is a selective co-activator of 14-3-3 sigma gene transcription in mouse embryonic stem cells. *Journal of Biological Chemistry* **276**:25647-25650.

Arai, K., Nakano, H., Shibutani, M., Naoi, M., Matsuda, H. Expression of class II beta-tubulin by proliferative myoepithelial cells in canine mammary mixed tumors. *Veterinary Pathology* (2003). **40**(6):670-6.

B

Bailey, C.M., Khalkhali-Ellis, Z., Seftor, E.A., Hendrix, M.J. (2006). Biological functions of maspin. *Journal of Cellular Physiology* **209**(3):617-624.

Barak, V., Goike, H., Panaretakis, K.W., Einarsson, R. (2004). Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. *Clinical Biochemistry* **37**(7):529-540.

Baulieu, E.E., Mester, J. (1989). Steroid hormone receptor. In: De Groot, L.J. ed. *Endocrinology* vol 1. Philadelphia: W.B. Saunders.

Bearss, J. J., Schulman, F.Y., Carter, D. (2011). Histologic, Immunohistochemical and Clinical Features of 27 Mammary Tumors in 18 Male Dogs. *Veterinary Pathology* [Epub ahead of print].

Benazzi, C., Preziosi, R., Sarli, G, Marceto, P.S. (1995). Considerations on histological grading of canine and feline mammary tumours and survival. 13th European Congress on Veterinary Pathology. ESVP. Edinburg, Scotland,

Bender, A.P., Dorn, R.C., Schneider, R. (1984). An epidemiological study of canine multiple primary neoplasia involving the female and male reproductive systems. *Preventive Veterinary Medicine* **2**:715-731.

Benjamin, S.A, Lee, A.C., Saunders, W.J. (1999). Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in Beagles. *Veterinary Pathology* **36**:423-436.

Berdichevsky, A., Viswanathan, M., Horvitz, H.R., Guarente, L. (2006). *C. elegans* SIR-2.1 interacts with 14-3-3 proteins to activate DAF-16 and extend life span. *Cell* **125**(6):1165-1177.

Bertagnolli, A.C, Cassali G.D., Genelhu M.C., Costa F.A., Oliveira J.F., Gonçalves P.B. (2009). Immunohistochemical expression of p63 and deltaNp63 in mixed tumors of canine mammary glands and its relation with p53 expression. *Veterinary Pathology* **46**(3):407-415

Bhatia, K., Siraj, A.K., Hussain, A., Bu, R., Gutiérrez, M.I. (2003). The tumor suppressor gene 14-3-3 sigma is commonly methylated in normal and malignant lymphoid cells. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **12**(2):165-169.

Bhawal, U.K., Tsukinoki, K., Sasahira, T., Sato, F., Mori, Y., Muto, N., Sugiyama, M., Kuniyasu, H. (2007). Methylation and intratumoural heterogeneity of 14-3-3 sigma in oral cancer. *Oncology Reports* **18**(4):817-824.

Bhawal, U.K., Sugiyama, M., Nomura, Y., Kuniyasu, H., Tsukinoki, K. (2008). Loss of 14-3-3 sigma protein expression and presence of human papillomavirus type 16 E6 in oral squamous cell carcinoma. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery* **134**(10):1055-1059.

Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development* **16**:6-21.

Bird, R.C., Deinnocentes, P., Lenz, S., Thacker, E.E., Curiel, D.T., Smith, B.F. (2008). An allogeneic hybrid-cell fusion vaccine against canine mammary cancer. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **123**(3-4):289-304.

Blanpain, C., Fuchs, E. (2007). p63: revving up epithelial stem-cell potential. *Nature Cell Biology* **9**(7):731-733.

Blomm, H.J.G., Richardson, W.W. (1957). Histological grading and prognosis in breast cancer. A study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *British Journal of Cancer* **11**:359-377.

Bostock, D.E. (1975). The prognosis following the surgical excision of canine mammary neoplasms. *European Journal of Cancer* **11**:389-396.

Bostock, D.E. (1986). Canine and Feline mammary neoplasms. *British Veterinary Journal* **142**:506-515.

Bostock, D.E., Moriarty J., Crocker, J. (1992). Correlation between histologic diagnosis mean nucleolar organizer region count and prognosis in canine mammary tumors. *Veterinary Pathology* **29**:381-385.

Bristow, R. G., Hill, R.P. (2008). Hypoxia and metabolism: hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nature Reviews Cancer* **8**:180-192.

Brodey, R.S., Fidler, I.J., Howson, A.E. (1966). The relationship of estrus cycle irregularity, pseudo-pregnancy, and pregnancy to the development of canine mammary neoplasms. *Journal of the American Animal Hospital Association* **149**:1047–1049.

Brodey, R.S., Goldschmidt, M.H., Roszel, J.R. (1983). Canine mammary gland neoplasms. *Journal of the American Animal Hospital Association* **19**:61–90.

Bronden, L.B., Nielsen, S.S., Toft, N., Kristensen, A.T. (2010). Data from the Danish veterinary cancer registry on the occurrence and distribution of neoplasms in dogs in Denmark. *Veterinary Record* **166**:586–590.

C

Calli, C., Calli, A., Pinar, E., Oncel, S., Tatar, B. (2011). Prognostic significance of p63, p53 and ki67 expression in laryngeal basaloid squamous cell carcinomas. *B-ENT* **7**(1):37-42.

Chan, T.A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1999). 14-3-3 sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* **401**:616–620.

Chan, T.A., Hwang, P.M., Hermeking, H., Kinzler, K.W., Vogelstein B. (2000). Cooperative effects of genes controlling the G(2)/M checkpoint. *Genes & Development* **14**:1584-1588.

Chang, S.C., Chang, C.C., Chang, T.J., Wong, M.L. (2005). Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association* **227**(10):1625-1629.

Chang, C. C., Tsai, M.H., Liao, J.W., Chan, J.P., Wong, M.L., Chang, S.C. (2009). Evaluation of hormone receptor expression for use in predicting survival of female dogs with malignant mammary gland tumors. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **235**:391–396.

Cheng, L., Pan, C.X., Zhang, J.T., Zhang, S., Kinch, M.S., Li, L., Baldrige, L.A., Wade, C., Hu, Z., Koch, M.O., Ulbright, T.M., Eble, J.N. (2004). Loss of 14-3-3 sigma in prostate cancer and its precursors. *Clinical Cancer Research* **10**(9):3064-8.

Chu, P., Wu, E., Weiss, L.M. (2000). Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases. *Modern Pathology* **13**(9):962-972.

Cleary, M.P., Grossmann, M.E. (2009). Minireview: obesity and breast cancer: the estrogen connection. *Endocrinology* **150**:2537–2542.

Cohen, D., Reif, J.S., Brodey R.S. (1974). Epidemiological analysis of the most prevalent sites and types of canine neoplasia observed in a veterinary hospital. *Cancer Research* **34**:2859–2868.

Collins, L.C., Schnitt, S.J. Breast. (2007). In: Histology for pathologists. 3thed. Stacey E. Mills. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business. 530 Walnut Street. Philadelphia, PA 19106 USA.

Concannon, P.W., Spraker, T.R., Casey, H.W., Hansel, W. (1981). Gross and histopathologic effects of medroxyprogesterone acetate and progesterone on the mammary gland of adult beagle bitches. *Fertility and Sterility* **36**:373–387.

Cserni, G., Bianchi, S., Vezzosi, V., Peterse, H., Sapino, A., Arisio, R., Reiner-Concin, A., Regitnig, P., Bellocq, J.P., Marin, C., Bori, R., Penuela, J.M., Iturriagoitia, A.C. (2006). The value of cytokeratin immunohistochemistry in the evaluation of axillary sentinel lymph nodes in patients with lobular breast carcinoma. *Journal of Clinical Pathology* **59**(5):518-522.

Cuzick, J., Decensi, A., Arun, B., Brown, P.H., Castiglione, M., Dunn, B., Forbes, J.F., Glaus, A., Howell, A., von Minckwitz, G., Vogel, V., Zwierzina, H. (2011). Preventive therapy for breast cancer: a consensus statement. *The Lancet Oncology* [Epub ahead of print].

D

Dabbous, M.Kh., Jefferson, M.M., Haney, L., Thomas, E.L. (2011). Biomarkers of metastatic potential in cultured adenocarcinoma clones. *Clinical & Experimental Metastasis* **28**(2):101-11.

da Costa, A., Oliveira, J.T., Gärtner, F., Kohn, B., Gruber, A.D., Klopffleisch R. (2010). Potential markers for detection of circulating canine mammary tumor cells in the peripheral blood. *The Veterinary Journal* [Epub ahead of print]

de Boer, M., van Dijck, J.A., Bult, P., Borm, G.F., Tjan-Heijnen, V.C. (2010). Breast cancer prognosis and occult lymph node metastases, isolated tumor cells, and micrometastases. *Journal of the National Cancer Institute* **102**(6):410-425.

de Moraes Schenka, N.G., Schenka, A.A., de Souza Queiroz, L., de Almeida Matsura M., Alvarenga M., Vassallo, J. (2006). p63 and CD10: reliable markers in discriminating benign sclerosing lesions from tubular carcinoma of the breast? *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* **14**(1):71-77.

de Moraes Schenka, N.G., Schenka, A.A., de Souza Queiroz, L., de Almeida Matsura, M., Vassallo, J., Alvarenga, M. (2008). Use of p63 and CD10 in the differential diagnosis of papillary neoplasms of the breast. *Breast Journal* **14**(1):68-75.

Dellambra, E., Patrone, M., Sparatore, B., Negri, A., Ceciliani, F., Bondanza, S., Molina, F., Cancedda, F.D., De Luca, M. (1995). Stratifin, a keratinocyte specific 14-3-3 protein, harbors a pleckstrin homology (PH) domain and enhances protein kinase C activity. *Journal of Cell Science* **108**(11):3569-3579.

Dellambra, E., Golisano, O., Bondanza, S., Siviero, E., Lacal, P., Molinari, M., D'Atri, S., De Luca M. (2000). Downregulation of 14-3-3 sigma prevents clonal evolution and leads to immortalization of primary human keratinocytes. *Journal of Cell Biology* **149**:1117-1130.

Dellman, H.D. (1993). *Histología Veterinaria*. Segunda edición. Ed. Acribia, Zaragoza.

Destexhe, E., Lespagnard, L., Degeyter, M., Heymann, R., Coignoul, F. (1993). Immunohistochemical identification of myoepithelial, epithelial, and connective tissue cells in canine mammary tumors. *Veterinary Pathology* **30**(2):146-154.

Destexhe E, Vanmanshoven P, Coignoul F. (1995). Comparison of argyrophilic nucleolar organizer regions by counting and image analysis in canine mammary tumors. *American Journal of Veterinary Research* **56**(2):185-7.

Deugnier, M.A., Teulie`re, J., Faraldo, M.M., Thiery J.P., Glukhova M.A. (2002). The importance of being myoepithelial cell. *Breast Cancer Research* **4**:224-230.

Dillon RL, Brown ST, Ling C, Shioda T, Muller WJ. An EGR2/CITED1 transcription factor complex and the 14-3-3sigma tumor suppressor are involved in regulating ErbB2 expression in a transgenic-mouse model of human breast cancer. (2007). *Molecular and Cellular Biology*, **27**(24):8648-8657.

Dim, D.C., Jiang, F., Qiu, Q., Li, T., Darwin, P., Rodgers, W.H., Peng, H.Q. (2011). The usefulness of S100P, mesothelin, fascin, prostate stem cell antigen, and 14-3-3 sigma in diagnosing pancreatic adenocarcinoma in cytological specimens obtained by endoscopic ultrasound guided fine-needle aspiration *Diagnostic Cytopathology*. Apr 28. doi: 10.1002/dc.21684. [Epub ahead of print].

DiRenzo, J., Signoretti, S., Nakamura, N., Rivera-Gonzalez, R., Sellers, W., Loda, M., Brown, M. (2002). Growth factor requirements and basal phenotype of an immortalized mammary epithelial cell line. *Cancer Research* **62**:89–98.

Dorn, C.R., Taylor, D.O, Schneider, R., Hibbard, H.H, Klauber, M.R. (1968). Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California, II: cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *Journal of the National Cancer Institute* **40**:307–318.

Dorn, C.R, Schneider, R. (1976). Inbreeding and canine mammary cancer: a retrospective study. *Journal of the National Cancer Institute* **57**(3):545-548.

E

Eden, A., Gaudet, F., Waghamare, A., Jaenisch, R. (2003). Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* **300**:455.

Egenvall, A., Bonnett, B.N., Ohagen, P., Olson, P., Hedhammer, A., von Euler, H. (2005). Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995–2002. *Preventive Veterinary Medicine* **69**:109–127.

Ellenport, C.R. (2008). Aparato urogenital de los carnivoros. In: Anatomía de los Animales Domésticos. 5ª ed. Sisson, S., Grossman, J.D.. Masson. Barcelona. España

Elling, H., Ungemach, F.R. (1983). Simultaneous occurrence of receptors for estradiol, progesterone, and dihydrotestosterone in canine mammary tumors. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **105**(3):231-237.

Ellis, I.O., Pinder, S.E., Lee, A.H.S. (2007) Tumors of the breast. In: Diagnostic Histopathology of Tumors. Ed. Fletcher CDM. Churchill Livingstone. Elsevier.

Else, R., Hannant, D. (1979). Some epidemiological aspects of mammary neoplasia in the bitch. *Veterinary Record* **104**:296-304.

Espinosa de los Monteros A., Fernández A., Herráez P., Rodríguez F. (2004). Piel y anejos cutáneos. En: *Gázquez A. y Blanco A. Tratado de Histología Veterinaria*, pp. 401-420. Ed. Masson, S.A. Barcelona.

Espinosa de los Monteros, A., Millán, M.Y., Ordás, J., Carrasco, L., Reymundo, C., Martín de las Mulas, J. (2002). Immunolocalization of the smooth muscle-specific protein calponin in complex and mixed tumors of the mammary gland of the dog: assessment of the morphogenetic role of the myoepithelium. *Veterinary Pathology* **39**:247-256.

Espinosa de los Monteros, A., Hellmén, E., Ramírez, G.A., Herráez, P., Rodríguez, F., Ordás, J., Millán, Y., Lara, A., Martín de las Mulas, J. (2003). Lipid-rich carcinomas of the mammary gland in seven dogs: clinicopathologic and immunohistochemical features. *Veterinary Pathology* **40**(6):718-723.

Espinosa de los Monteros, A., Millán, M.Y., Ramírez, G.A., Ordás J., Reymundo, C., Martín de las Mulas, J. (2005). Expression of maspin in mammary gland tumors of the dog. *Veterinary Pathology* **42**:250-257.

Estrela-Lima, A., Araújo, M.S., Costa-Neto, J.M., Teixeira-Carvalho, A., Barrouin-Melo, S.M., Cardoso, S.V., Martins-Filho, O.A., Serakides, R., Cassali, G.D. (2010). Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. *BMC Cancer* **10**: 256.

F

Ferguson, R.H. (1985). Canine mammary gland tumors. *Small Animal Practice* **15**:501-511.

Ferguson, A.T., Evron, E., Umbricht, C.B., Pandita, T.K., Chan, T.A., Hermeking, H., Marks, J.R., Lambers, A.R., Futreal, P.A., Stampfer, M.R., Sukumar, S. (2000). High frequency of hypermethylation at the 14-3-3 sigma locus leads to gene silencing in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **97**:6049-6054.

Ferreira, E., Gobbi, H., Saraiva B.S., Cassali, G.D. (2010). Columnar cell lesions of the canine mammary gland: pathological features and immunophenotypic analysis. *BMC Cancer* **10**:61.

Ferreira, E., Gobbi, H., Saraiva B.S., Cassali, G.D. (2011). Histological and Immunohistochemical Identification of Atypical Ductal Mammary Hyperplasia as a Preneoplastic Marker in Dogs. *Veterinary Pathology* [Epub ahead of print].

Ferretti, G., Felici, A., Papaldo, P., Fabi, A., Cognetti, F. (2007). HER2/neu role in breast cancer: from a prognostic foe to a predictive friend. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* **19**:56–62.

Fidler, I.J., Brodey, R.S. (1967a). A necropsy study of canine malignant mammary neoplasms. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **151**(6):710-715.

Fidler IJ, Brodey RS. (1967b). The biological behavior of canine mammary neoplasms. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **151**(10):1311-1318.

Franks, L.M., Teich, M.N. (1997). Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. *Oxford Medical Publications*, pp. 482. Oxford University Press.

G

Gama, A., Alves, A., Gartner, F., Schmitt, F. (2003). p63: a novel myoepithelial cell marker in canine mammary tissues. *Veterinary Pathology* **40**(4):412-420.

Gama, A., Gärtner, F., Alves, A., Schmitt, F. (2009). Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in canine mammary tissues. *Research in Veterinary Science* **87**:432–437.

Gama, A., Alves, A., Schmitt, F. (2010). Expression and prognostic significance of CK19 in canine malignant mammary tumours. *Veterinary Journal* **184**(1):45-51.

Gardino, A.K., Smerdon, S.J., Yaffe, M.B. (2006). Structural determinants of 14-3-3 binding specificities and regulation of subcellular localization of 14-3-3-ligand complexes: a comparison of the X-ray crystal structures of all human 14-3-3 isoforms. *Seminars in Cancer Biology* **16**(3):173-182.

Gärtner, F., Geraldes, M., Cassali, G., Rema, A., Schmitt, F. (1999) DNA measurement and immunohistochemical characterization of epithelial and mesenchymal cells in canine mixed mammary tumours: putative evidence for a common histogenesis. *Veterinary Journal* **158**(1):39-47.

Gasco, M., Bell, A.K., Heath, V., Sullivan, A., Smith, P., Hiller, L., Yulug, I., Numico, G., Merlano, M., Farrell, P.J., Tavassoli, M., Gusterson, B., Crook, T. (2002a). Epigenetic inactivation of 14-3-3 sigma in oral carcinoma: association with p16 (INK4a) silencing and human papillomavirus negativity. *Cancer Research* **62**(7): 2072-2076.

Gasco, M., Sullivan, A., Repellin, C., Brooks, L., Farrell, P.J., Tidy, J.A., Dunne, B., Gusterson, B., Evans, D.J., Crook, T. (2002b). Coincident inactivation of 14-3-3sigma and p16INK4a is an early event in vulval squamous neoplasia. *Oncogene* **21**(12):1876-1881.

Gasco, M., Shami, S., Crook, T. (2002c). The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Research* **4**:70-76.

Gaudet, F., Hodgson, J.G., Eden, A, Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Gray, J.W., Leonhardt, H., Jaenisch, R. (2003). Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* **300**:489-492.

Geil, R.G., Lamar, J.K. (1977). FDA studies of estrogen, progesterons, and estrogen/progesterone combinations in the dog and monkey. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **3**:179-193.

Geraldes, M., Gärtner, F., Schmitt, F. (2000). Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. *Veterinary Record* **146**(14):403-406.

Geyer, F., Marchio, C., Reis-Filho, J. (2009). The role of molecular analysis in breast cancer. *Pathology* **41**:77-88.

Ghahary, A., Karimi-Busheri, F., Marcoux, Y., Li Y., Tredget, E.E., Taghi Kilani R, Li L., Zheng J., Karami, A., Keller, B.O., Weinfeld, M. (2004). Keratinocyte-releasable stratifin functions as a potent collagenase-stimulating factor in fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology* **122**:1188-1197.

Ghahary, A., Marcoux, Y., Karimi-Busheri, F., Li, Y., Tredget, E.E., Kilani, R.T., Lam, E., Weinfeld, M. (2005). Differentiated keratinocyte-releasable stratifin (14-3-3 σ) stimulates MMP-1 expression in dermal fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology* **124**:170-177.

Gilbertson, S.R., Kurzman, I.D., Zachrau, R.E., Hurvitz Al, Black, M.M. (1983). Canine mammary epithelial neoplasms: Biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Veterinary Pathology* **20**:127-142.

Giles, R.C., Kwapien, R.P., Geil, R.G., Casey, H.W. (1978). Mammary nodules in beagle dogs administered investigational oral contraceptive steroids. *Journal of the National Cancer Institute* **60**:1351-1364.

Goldschmidt, M.H., Shofer, F.S., Smelstoys, J.A. (2001). Neoplastic lesions of the mammary gland. In: Pathobiology of The Aging Dog, ed. Mohr U, pp. 168-178. Iowa State University Press, Ames, IA.

Graf, M., Brobeil, A., Sturm, K., Steger, K., Wimmer, M. (2011). 14-3-3 beta in the healthy and diseased male reproductive system. *Human Reproduction* **26**(1):59-66.

Griffey, S.M., Madewell, B.R., Dairkee, S.H., Hunt, J.E., Naydan, D.K., Higgins, R.J. (1993). Immunohistochemical reactivity of basal and luminal epithelium-specific cytokeratin antibodies within normal and neoplastic canine mammary glands. *Veterinary Pathology* **30**(2):155-161.

Guil-Luna S, Sánchez-Céspedes R, Millán Y, De Andrés FJ, Rollón E, Domingo V, Guscetti F, Martín de Las Mulas J. (2011). Aglepristone decreases proliferation in progesterone receptor-positive canine mammary carcinomas. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **25**(3):518-523.

Guweidhi, A., Kleeff, J., Giese, N., El Fitori, J., Ketterer, K, Giese, T., Büchler, M.W.Korc, M., Friess, H. (2004). Enhanced expression of 14-3-3 sigma in pancreatic cancer and its role in cell cycle regulation and apoptosis. *Carcinogenesis* **25**:1575-1585.

Guyton, A.C. (2008). Endocrinología y reproducción. In: Tratado de Fisiología Médica. 11ª ed. Guyton A.C., Hall, J.E. Elsevier. Barcelona. España.

H

Hampe, J.F., Misdorp, W. (1974). Tumours and dysplasias of the mammary gland. In: Bulletin of the World Health Organization. International Histological Classification of tumours of domestic animals **50**:111-133.

Hankinson, S.E, Willett, W.C., Manson J.E. (1998). Plasma sex steroid hormone levels and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Journal of the National Cancer Institute* **90**:1292-1299.

Harlow, E., Lane, D. (1988). Immunoblotting. In: Harlow E, Lane D, eds. Antibodies. A laboratory manual. New York Cold Spring Harbour Laboratory 471-510, pp. 53-135.

Hayashi, E., Kuramitsu, Y., Fujimoto, M., Zhang, X., Tanaka, T., Uchida, K., Fukuda, T., Furumoto, H., Ueyama, Y., Nakamura, K. (2009). Proteomic profiling of differential display analysis for human oral squamous cell carcinoma: 14-3-3 σ Protein is upregulated in human oral squamous cell carcinoma and dependent on the differentiation level. *Proteomics - Clinical Application* **3**(11):1338-1347.

Hellmén, E., Lindgren A. (1989a). The accuracy of cytology in diagnosis and DNA analysis of canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology* **101**:443-449.

Hellmén E, Lindgren A. The expression of intermediate filaments in canine mammary glands and their tumors. (1989b). *Veterinary Pathology* **26**(5):420-428.

Hellmén, E., Bergstrom, R, Holmberg, L. (1993). Prognostic factors in canine mammary gland tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Veterinary Pathology* **30**:20-27.

Herman, J. G., Baylin, S.B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *TheNew England Journal of Medicine* **349**(21):2042-2054.

Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T.C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1997). 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Molecular Cell* **1**:3-11.

Hermeking, H. (2003). The 14-3-3 cancer connection. *Nature reviews cancer* **3**:931-943.

Hermeking, H., Benzinger, A. (2006). 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. *Seminars in Cancer Biology* **16**(3): 183-192.

Hermo, G.A., Turic, E., Angelico, D., Scursoni, A.M., Gomez, D.E., Gobello, C., Alonso, D.F. (2011). Effect of adjuvant perioperative desmopressin in locally advanced canine mammary carcinoma and its relation to histologic grade. *Journal of the American Animal Hospital Association* **47**(1):21-27.

Hirayama, K., Yokota, H., Onai, R., Kobayashi, T., Kumata, T., Kihara, K., Okamoto, M., Sako, T., Nakade, T., Izumisawa, Y., Taniyama, H. (2002). Detection of matrix metalloproteinases in canine mammary tumours: analysis by immunohistochemistry and zymography. *Journal of Comparative Pathology* **127**:249-256.

Hondermarck, H., Dollé, L., El Yazidi-Belkoura, I., Vercoutter-Edouart, A.S., Adriaenssens, E., Lemoine, J. (2002). Functional proteomics of breast cancer for signal pathway profiling and target discovery. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* **7**(4):395-405.

Horie-Inoue, K., Inoue, S. (2006). Epigenetic and proteolytic inactivation of 14-3-3sigma in breast and prostate cancers. *Seminars in Cancer Biology* **16**(3): 235-239.

Hsu, W. L., Huang, H.M., Liao, J.W., Wong, M.L., Chang, S.C. (2009). Increased survival in dogs with malignant mammary tumours overexpressing HER-2 protein and detection of a silent single nucleotide polymorphism in the canine HER-2 gene. *Veterinary Journal* **180**:116-123.

Huang, D., Liu, X., Plymate, S.R., Idowu, M., Grimes, M., Best, A.M., McKinney, J.L., Ware, J.L. (2004). Proteomic identification of 14-3-3 sigma as a common component of the androgen receptor and the epidermal growth factor receptor signaling pathways of the human prostate epithelial cell line M12. *Oncogene* **23**(41): 6881-6889.

Hungermann, D., Buerger, H., Oehlschlegel, C., Herbst, H., Boecker, W. (2005). Adenomyoepithelial tumours and myoepithelial carcinomas of the breast--a spectrum of monophasic and biphasic tumours dominated by immature myoepithelial cells. *BMC Cancer* **5**:92.

Hursting, S.D., Nunez N.P., Varticovski L., Vinson C. (2007). The obesity-cancer link: lessons learned from a fatless mouse. *Cancer Research* **67**(6):2391-2393.

I

Iacobuzio-Donahue, C.A, Maitra A., Olsen, M., Lowe, A.W., van Heek, N.T., Rosty, C., Walter, K., Sato, N., Parker, A., Ashfaq, R., Jaffee, E., Ryu, B., Jones, J., Eshleman, J.R., Yeo CJ, Cameron, J.L., Kern, S.E., Hruban, RH, Brown, P.O., Goggins, M. (2003). Exploration of global gene expression patterns in pancreatic adenocarcinoma using cDNA microarrays. *American Journal of Pathology* **162**:1151–1162.

Ichimura, T., Isobe, T., Okuyama, T., Takahashi, N., Araki, K., Kuwano, R., Takahashi, Y. (1988). Molecular cloning of cDNA coding for brain-specific 14-3-3 protein, a protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**: 7084-7088.

Ivanova, T., Petrenko, A., Gritsko, T., Vinokourova, S., Eshilev, E., Kobzeva, V., Kissel'jov, F., Kissel'jova, N. (2002). Methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta 2 gene in cervical cancer. *BMC Cancer* **2**:4.

Iwata, N., Yamamoto, H., Sasaki, S., Itoh, F., Suzuki, H., Kikuchi, T., Kaneto, H., Iku, S., Ozeki, I., Karino, Y., Satoh, T., Toyota, J., Satoh, M., Endo, T., Imai, K. (2000). Frequent hypermethylation of CpG islands and loss of expression of the 14-3-3sigma gene in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **19**:5298–5302.

J

Jaenisch, R., Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics* **33**:245-254.

Jeronimo, C., Monteiro, P., Henrique, R., Dinis-Ribeiro, M., Costa, I., Costa, V.L., Filipe, L., Carvalho, A.L., Hoque, M.O., Pais, I., Leal, C., Teixeira, M.R., Sidransky, D. (2008). Quantitative hypermethylation of a small panel of genes augments the diagnostic accuracy in fine-needle aspirate washings of breast lesions. *Breast Cancer Research and Treatment* **109**:27–34.

Jing, F., Jun, L., Yong, Z., Wang, Y., Fei, X., Zhang, J., Hu, L. (2008). Multigene methylation in serum of sporadic Chinese female breast cancer patients as a prognostic biomarker. *Oncology* **75**(1-2):60-66.

Jones, P.A., Baylin, S.B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews Genetics* **3**:415-428.

K

Kaneuchi, M., Sasaki, M., Tanaka, Y., Shiina, H., Verma M, Ebina, Y., Nomura, E., Yamamoto, R., Sakuragi, N., Dahiya, R. (2004). Expression and methylation status of 14-3-3 sigma gene can characterize the different histological features of ovarian cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **316**:1156–1162.

Kawahara, A., Harada, H., Yokoyama, T., Kage, M. (2005). p63 Expression of clear myoepithelial cells in epithelial-myoepithelial carcinoma of the salivary gland: a useful marker for naked myoepithelial cells in cytology. *Cancer* **105**(4):240-245.

Khalid, S., Hwang D., Babichev Y., Kolli R., Altamentova, S., Koren, S., Goodwin, P.J., Ennis, M., Pollak, M., Sonenberg, N., Fantus, I.G. (2010). Evidence for a tumor promoting effect of high-fat diet independent of insulin resistance in HER2/Neu mammary carcinogenesis. *Breast Cancer Research and Treatment* **122**(3):647-59.

Kilani, R.T., Medina, A., Aitken, A., Jalili, R.B., Carr, M., Ghahary, A. (2008). Identification of different isoforms of 14-3-3 protein family in human dermal and epidermal layers. *Molecular and Cellular Biochemistry* **314**(1-2):161-9.

Kim, J. H., Yu, C.H., Yhee, J.Y., Im, K.S., Sur, J.H. (2010). Lymphocyte infiltration, expression of interleukin (IL) -1, IL-6 and expression of mutated breast cancer susceptibility gene-1 correlate with malignancy of canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology* **142**(2-3):177-186.

Kinne, D.W., Ashikari, R., Butler, A., Menendez-Botet, C., Rosen, P.P., Schwartz, M. (1981). Estrogen receptor protein in breast cancer as a predictor of recurrence. *Cancer* **47**(10):2364-2367.

Klopfleisch, R., Gruber, A.D. (2009). Differential expression of cell cycle regulators p21, p27 and p53 in metastasizing canine mammary adenocarcinomas versus normal mammary glands. *Research in Veterinary Science* **87**:91–96.

Klopfleisch, R., Klose P., Gruber, A.D. (2010a). The combined expression pattern of BMP2, LTBP4, and DERL1 discriminates malignant from benign canine mammary tumors. *Veterinary Pathology* **47**:446–454.

Klopfleisch, R., Hvid, H., Klose, P., da Costa, A., Gruber, A.D. (2010b). Insulin receptor is expressed in normal canine mammary gland and benign adenomas but decreased in metastatic canine mammary carcinomas similar to human breast cancer. *Veterinary and Comparative Oncology* **8**(4):293-301.

Klopfleisch, R., Schutze, M., Gruber, A.D. (2010c). Loss of p27 expression in canine mammary tumors and their metastases. *Research in Veterinary Science* **88**(2):300-303.

Klopfleisch, R., Klose, P., Weise, C., Bondzio, A., Multhaup, G., Einspanier, R., Gruber, A.D. (2010d). Proteome of metastatic canine mammary carcinomas: similarities to and differences from human breast cancer. *Journal of Proteome Research* **9**(12):6380-6391.

Klopfleisch, R., von Euler, H., Sarli, G., Pinho, S.S., Gärtner, F. Gruber, A.D. (2011). Molecular Carcinogenesis of canine mammary tumors: News from an old disease. *Veterinary Pathology* **48**(1):98-116.

Knoop, A.S., Rasmussen, B.B. (2007). Prognostic and predictive factors for endocrine treatment in breast carcinoma. *Ugeskrift for Læger* **169**(36):2997-2999.

Koker, M.M., Kleer, C.G. (2004). p63 expression in breast cancer: a highly sensitive and specific marker of metaplastic carcinoma. *American Journal of Surgical Pathology* **28**(11):1506-1512

Korsching, E., Packeisen, J., Liedtke, C., Hungermann, D., Wülfing, P., van Diest, P.J., Brandt, B., Boecker, W., Buerger, H. (2005). The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? *Journal of Pathology* **206**:451-457.

Kumaraguruparan, R., Prathiba, D., Nagini, S. (2006). Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. *Research in Veterinary Science* **81**(2):218-224.

Kunze, E., Wendt, M., Schlott, T. (2006). Promoter hypermethylation of the 14-3-3 sigma, SYK and CAGE-1 genes is related to the various phenotypes of urinary bladder carcinomas and associated with progression of transitional cell carcinomas. *International Journal of Molecular Medicine* **18**(4):547-557.

Kunze, E., Krassenkova, I., Fayyazi, A. (2008). Tumor-associated neoexpression of the pS2 peptide and MUC5AC mucin in primary adenocarcinomas and signet ring cell carcinomas of the urinary bladder. *Histology & Histopathology* **23**(5):539-548.

Kuramitsu, Y., Baron, B., Yoshino, S., Zhang, X., Tanaka, T., Yashiro, M., Hirakawa, K., Oka, M., Nakamura, K. (2010). Proteomic differential display analysis shows up-regulation of 14-3-3 sigma protein in human scirrhous-type gastric carcinoma cells. *Anticancer Research* **30**(11):4459-4465.

Kurzman, I.D, Gilbertson, S.R. (1986). Prognostic factors in canine mammary tumors. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)* **1**:25.

Kwapien, R.P., Giles, R.C., Geil, R.G., Casey, H.W. (1980). Malignant mammary tumors in beagle dogs dosed with investigational oral contraceptives. *Journal of the National Cancer Institute* **65**:137-144.

L

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259):680-685.

Lagadic, M., Estrada, M. (1990). Tumeurs mammaires de la chienne: criteres du pronostic histologique et interet d'un grading. *Recueil de Médecine Vétérinaire Special Cancerologie* **166**:1035-1042.

Lakhani, S.R., O'Hare, M.J. (2001). The mammary myoepithelial cell—Cinderella or ugly sister? *Breast Cancer Research* **3**:1-4.

Lana, S.E., Rutteman, G.R., Withrow, S.J. (2007). Tumors of the mammary gland. In: Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology, pp. 619-636, SJ. Withrow and D.M. Vail, Editors. 7thed. Saunders, Elsevier. Sto Louis, MO, EEUU.

Langenbach, A., McManus, P.M., Hendrick, M.J., Shofer, F.S., Sorenmo, K.U. (2001). Sensitivity and specificity of methods of assessing the regional lymph nodes for evidence of metastasis in dogs and cats with solid tumors. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **218**(9):1424-1428.

- Laronga, C., Yang, H.Y., Neal, C., Lee, M.H. (2000). Association of the cyclin-dependent kinases and 14-3-3 sigma negatively regulates cell cycle progression. *Journal of Biological Chemistry* **275**:23106-23112.
- Lee, M.H., Lozano, G. (2006). Regulation of the p53-MDM2 pathway by 14-3-3 sigma and other proteins. *Seminars in Cancer Biology* **16**(3):225-234.
- Leffers, H., Madsen, P., Rasmussen, H.H. Honoré, B., Andersen, A.H., Walbum, E., Vandekerckhove, J., Celis, J.E. (1993). Molecular cloning and expression of the transformation sensitive epithelial marker stratifin. A member of a protein family that has been involved in the protein kinase C signaling pathway. *Journal of Molecular Biology* **231**:982-998.
- Leibl, S., Gogg-Kammerer, M., Sommersacher, A., Denk, H., Moinfar, F. (2005). Metaplastic breast carcinomas: are they of myoepithelial differentiation? Immunohistochemical profile of the sarcomatoid subtype using novel myoepithelial markers. *American Journal of Surgical Pathology* **29**:347-353.
- Li, D.J., Deng, G., Xiao, Z.Q., Yao, H.X., Li, C., Peng F., Li, M.Y., Zhang, P.F., Chen, Y.H., Chen, Z.C. (2009a). Identificating 14-3-3 sigma as a lymph node metastasis-related protein in human lung squamous carcinoma. *Cancer Letters* **279**(1):65-73.
- Li, E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature Reviews Genetics* **3**:662-673.
- Li, Z., Meng, Z.H., Chandrasekaran, R., Kuo, W.L., Collins, C.C., Gray, J.W., Dairkee, S.H. (2002). Biallelic inactivation of the thyroid hormone receptor beta1 gene in early stage breast cancer. *Cancer Research* **62**:1939-1943.
- Li, Z., Liu, J.Y., Zhang, J.T. (2009b). 14-3-3sigma, the double-edged sword of human cancers. *American Journal of Translational Research* **1**(4): 326-340.
- Liang, S., Xu, Y., Shen, G., Zhao, X., Zhou, J., Li, X., Gong, F., Ling, B., Fang, L., Huang, C., Wei Y. (2008). Gene expression and methylation status of 14-3-3sigma in human renal carcinoma tissues. *IUBMB Life*. **60**(8):534-540.
- Liu, Y., Liu, H., Han, B., Zhang, J.T. (2006). Identification of 14-3-3sigma as a contributor to drug resistance in human breast cancer cells using functional proteomic analysis. *Cancer Research*. **66**(6):3248-3255.

- Liu, Y., Tian, R.F., Li, Y.M., Liu, W.P., Cao, L., Yang, X.L., Cao, W.D., Zhang, X. (2010). The expression of seven 14-3-3 isoforms in human meningioma. *Brain Research* **1336**:98-102.
- Lodygin D, Yazdi AS, Sander CA, Herzinger T, Hermeking H. (2003). Analysis of 14-3-3sigma expression in hyperproliferative skin diseases reveals selective loss associated with CpG-methylation in basal cell carcinoma. *Oncogene* **22**(35):5519-5524.
- Lodygin, D., Diebold, J., Hermeking, H. (2004). Prostate cancer is characterized by epigenetic silencing of 14-3-3 sigma expression. *Oncogene* **23**:9034-9041.
- Lodygin, D., Hermeking, H. (2006). Epigenetic silencing of 14-3-3 sigma in cancer. *Seminars in Cancer Biology* **16**:214-224.
- Logsdon, C.D., Simeone, D.M., Binkley, C., Arumugam, T., Greenson, J.K., Giordano, T.J., Misek, D.E., Hanash, S. (2003). Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer. *Cancer Research* **63**:2649-2657.
- Löhr, C.V., Teifke, J.P., Failing, K., Weiss, E. (1997). Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors by the standardized AgNOR method with postfixation and immunohistologic detection of Ki-67 and PCNA. *Veterinary Pathology* **34**(3):212-221.
- Lombardi, P., Florio, S., Pagnini, U., Crispino, A., Avallone, L. (1999). Ovarian function suppression with a GnRH analogue: D-ser(But[t])[6]-Arzgly[10]-LHRH (Goserelin) in hormone dependent canine mammary cancer. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **22**(1):56-61.
- Lowe, S.W., Cepero, E., Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature* **432**:307-315.
- Luo, J., Feng, J., Lu, J., Wang, Y., Tang, X., Xie, F., Li, W. (2009). Aberrant methylation profile of 14-3-3 sigma and its reduced transcription/expression levels in Chinese sporadic female breast carcinogenesis. *Medical Oncology* **27**(3):791-797.
- Lu, Q., Xin Y., Ye, F., Foulks, G., Li, Q. (2011). 14-3-3{sigma} Controls Corneal Epithelium Homeostasis and Wound Healing. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **52**(5):2389-2396.

M

Madewell, B.R., Theilen, G.H. (1987). Tumors of the mammary gland. In: Theilen GH., Madewell BR., eds. *Veterinary cancer medicine*. Lea & Febiger, pp. 327-344. Philadelphia.

MacEwen, E.G., Patnaik, A.K., Harvey, H.J., Panko, W.B. (1982). Estrogen receptors in canine mammary tumors. *Cancer Research* **42**(6):2255-2259.

Manzel, O., Wurn, S., Ueberschär, S., Hoppen, H.O. (1995). Estrogen and progesterone receptor in histologic sections of canine mammary tumours in correlation to histologic type. 13th European Congress of Veterinary Pathology, Edimburgh.

Marangos, P.J., Zomzely-Neurath, C., York, C. (1976). Determination and characterization of neuron specific protein (NSP) associated enolase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **68**(4):1309-13016.

Marconato, L., Romanelli, G., Stefanello, D., Giacoboni, C., Bonfanti, U., Bettini, G., Finotello, R., Verganti, S., Valenti, P., Ciaramella, L., Zini, E. (2009). Prognostic factors for dogs with mammary inflammatory carcinoma: 43 cases (2003-2008). *Journal of the American Veterinary Medical Association* **235**(8):967-972.

Martín de las Mulas, J., Ordás, J, Millán, Y., Fernández-Soria, V., Ramón y Cajal, S. (2003). Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Breast Cancer Research and Treatment* **80**(3):363-367.

Martín de las Mulas, J., Reymundo, C., Espinosa de los Monteros, A., Millán, Y., Ordás, J. (2004). Calponin expression and myoepithelial cell differentiation in canine, feline and human mammary simple carcinomas. *Veterinary and Comparative Oncology* **2**:24-35.

Martín de las Mulas, J., Millán, Y., Dios, R. (2005). A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Veterinary Pathology* **42**(2):200-212.

Martin, P.M., Cotard, M., Mialot, J.P., André, F., Raynaud, J.P. (1984). Animal models for hormone-dependent human breast cancer. Relationship between steroid receptor profiles in canine and feline mammary tumors and survival rate. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **12**(1):13-7.

Martínez-Galán, J., Torres, B., Del Moral, R., Muñoz-Gámez, J.A., Martín-Oliva, D., Villalobos, M., Núñez, M.I., Luna, J.D., Oliver, F.J., de Almodóvar, J.M. (2008). Quantitative detection of methylated ESR1 and 14-3-3-sigma gene promoters in serum as candidate biomarkers for diagnosis of breast cancer and evaluation of treatment efficacy. *Cancer Biology and Therapy* **7**(6):958-965.

Maruya, S., Kies, M.S., Williams, M., Myers, J.N., Weber, R.S., Batsakis, J.G., El-Naggar, A.K. (2005). Differential expression of p63 isotypes (DeltaN and TA) in salivary gland neoplasms: biological and diagnostic implications. *Human Pathology* **36**(7):821-827.

Masood, S. (2005). Prognostic/predictive factors in breast cancer. *Clinics in Laboratory Medicine* **25**(4):809-825.

Matos, A.J., Faustino, A.M., Lopes, C., Rutteman, G.R., Gärtner, F. (2006). Detection of lymph node micrometastases in malignant mammary tumours in dogs by cytokeratin immunostaining. *Veterinary Record* **158**(18):626-630.

Mauriac, L., Durand, M., Chauvergne, J., David, M., Wafflart, J. (1989). Cancers of the breast at metastatic high-risk: prediction of survival by steroidal receptors. *Bulletin du Cancer* **76**(1):33-41.

Medina, A., Ghaffari, A., Kilani, R.T., Ghahary, A. (2007). The role of stratifin in fibroblast-keratinocyte interaction. *Molecular and Cellular Biochemistry* **305**:255-264.

Merlo, D.F., Rossi, L., Pellegrino, C., Ceppi, M., Cardellino U, Capurro C, Ratto A, Sambucco PL, Sestito V, Tanara G, Bocchini V. (2008). Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **22**(4):976-984.

Mhawech, P., Benz, A., Cerato, C., Greloz, V., Assaly, M., Desmond, J.C., Koeffler, H.P., Lodygin, D., Hermeking, H., Herrmann, F., Schwaller, J. (2005a). Downregulation of 14-3-3 sigma in ovary, prostate and endometrial carcinomas is associated with CpG island methylation. *Modern Pathology* **18**(3):340-348.

- Mhawech, P., Greloz, V., Assaly, M., Herrmann, F. (2005b). Immunohistochemical expression of 14-3-3 sigma protein in human urological and gynecological tumors using a multi-tumor microarray analysis. *Pathology International* **55**:77–82.
- Mhawech, P. (2005c) 14-3-3 proteins--an update. *Cell Research* **15**(4):228-236.
- Millanta, F., Calandrella, M., Bari, G., Niccolini, M, Vannozzi, I., Poli, A. (2005). Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Research in Veterinary Science* **79**(3):225-232.
- Mills, A.A., Zheng, B., Wang, X.J., Vogel, H., Roop, D.R., Bradley, A. (1999). p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* **398**(6729):708-713.
- Misdorp, W., Hart A.A.M. (1976). Prognostic Factors in canine mammary cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **56**:779-786.
- Misdorp, W., Hart, A.A.M. (1979a). Canine mammary cancer. I. Prognosis. *Journal of Small Animal Practice* **20**:385-394.
- Misdorp, W., Hart, A.A.M. (1979b). Canine mammary cancer. II. Therapy and causes of death. *Journal of Small Animal Practice* **20**:395-404.
- Misdorp, W. (1988). Canine mammary gland tumors: Protective effect of late ovariectomy and stimulating effect of progestins. *Veterinary Quarterly* **10**:26–33.
- Misdorp, W., Else, R.W., Hellmén, E., Lipscomb, T.P. (1999). Histological classification of the mammary tumours of the dog and the cat. In: Shulman, F.I. (Ed.), World Health Organization International Histologic Classification of Tumours of Domestic Animals, 2nd series, vol. VII. Armed Forces Institute of Pathology, pp.16–29. Washington, DC, USA.
- Misdorp, W. Tumors of the Mammary Gland. (2002). In: Tumors in Domestic Animals. DJ. Meuten (Ed.). Iowa State Press, Ames, Iowa. 4thed., Chapter 12, pp. 575-606.
- Mitchell, L., de la Iglesia, F.A., Wenkoff, M.S. (1974). Mammary tumors in dogs: survey of clinical and pathological characteristics. *Canadian Veterinary Journal* **15**:131–138.
- Moe, L. (2001). Population-based incidence of mammary tumors in some dog breeds. *Journal of reproduction and Fertility Supplement* **57**:439–443.

Mol, J.A., Selman, P.J., Sprang, E.P., van Neck, J.W., Oosterlaken-Dijksterhuis, M.A. (1997). The role of progestins, insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding proteins in the normal and neoplastic mammary gland of the bitch: a review. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* **51**:339-344.

Mol, J.A., Lantinga-van Leeuwen I.S., van Garderen E., Selman P.J., Oosterlaken-Dijksterhuis, M.A., Schalken, J.A., Rijnberk, A. (1999). Mammary growth hormone and tumorigenesis--lessons from the dog. *Veterinary Quarterly* **21**(4):111-115.

Monlux, A.W., Roszel, L.f., MacVean, D.W., Palmer, T.W. (1977). Classification of epithelial canine mammary tumors in a defined population. *Veterinary Pathology* **14**:194-217.

Monteiro-Riviere, N.A., Stinson, A.W. (1998). Integument. In: Dellmann H.D., Eurell, J. (eds), *Textbook of Veterinary Histology*. Williams & Wilkins, MD, pp. 303-332.

Monteiro-Riviere, N.A. (2006). Integument. In: Dellmann's. Eurell, J., Frappier B.L. (eds), *Textbook of Veterinary Histology*. Blackwell Publishing, pp. 320-349.

Moolgavkar, S. (1980a). Multistage models for carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute* **65**(2):215-216.

Moolgavkar, S.H., Day, N.E., Stevens, R.G. (1980b). Two-stage model for carcinogenesis: Epidemiology of breast cancer in females. *Journal of the National Cancer Institute* **65**(3):559-569.

Moore, B.E., Perez, V.J. (1967). Specific acidic proteins of the nervous system. In: *Physiological and biochemical aspects of nervous integration*. In: *Physiological and biochemical aspects of nervous integration*. Carlson FD, ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, pp. 343-359.

Morales, J.L., (2003). Pelvis, Órganos Genitales, Mamas. In: *Anatomía clínica del perro y el gato*. pp. 157-178. 2ª ed. Morales, J.L. Córdoba. España.

Moreira, J.M., Gromov, P., Celis, J.E. (2004). Expression of the tumor suppressor protein 14-3-3 sigma is down-regulated in invasive transitional cell carcinomas of the urinary bladder undergoing epithelial-to-mesenchymal transition. *Molecular and Cellular Proteomics* **3**(4):410-419.

Moreira, J.M., Ohlsson, G., Rank, F.E., Celis, J.E. (2005). Down-regulation of the tumoursuppressor protein 14-3-3 sigma is a sporadic event in cancer of the breast. *Molecular and Cellular Proteomics* **4**(4):555-569.

Morris, J.S., Dobson, J.M., Bostock, D.E. (1993). Use of tamoxifen in the control of canine mammary neoplasia. *Veterinary Record* **133**(22):539-542.

Morris, J.S., Dobson, J.M., Bostock, D.E., O'Farrell, E. (1998) Effect of ovariohysterectomy in bitches with mammary neoplasms. *Veterinary Record* **142**(24):656-658.

Morris, J.S., Nixon, C., King, O.J., Morgan, I.M., Philbey, A.W. (2009). Expression of TopBP1 in canine mammary neoplasia in relation to histological type, Ki67, ERalpha and p53. *Veterinary Journal* **179**(3):422-429.

Morris, J.S. (2010). Improving the diagnosis and treatment of canine mammary tumours: Immunohistochemical markers as prognostic tools. *Veterinary Journal* **184**(1):3-4.

Moulton, J.E., Rosenblatt, L.S., Goldman, M. (1986). Mammary tumors in a colony of beagle dogs. *Veterinary Pathology* **23**:741-749.

Moulton, J.E., Taylor, D.O., Doro, C.R., Andersen, A.C. (1970). Canine mammary tumours. *Veterinary Pathology* **7**:289-320.

Mouser, P., Miller, M.A., Antuofermo, E., Badve, S.S., Mohammed, S.I. (2010). Prevalence and classification of spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs without clinical mammary disease. *Veterinary Pathology* **47**(2):275-84.

Mühlmann, G., Ofner, D., Zitt, M., Müller, H.M., Maier, H., Moser, P., Schmid, K.W., Zitt, M., Amberger, A. 14-3-3 sigma and p53 expression in gastric cancer and its clinical applications. (2010). *Disease Markers* **29**(1):21-29.

Murakami, Y., Tateyama, S., Rungtipipat, A., Uchida, K., Yamaguchi, R. (2000). Immunohistochemical analysis of cyclin A, cyclin D1 and P53 in mammary tumors, squamous cell carcinomas and basal cell tumors of dogs and cats. *Journal of Veterinary Medical Science* **62**:743-750.

Muslin, A.J., Tanner, J.W., Allen, P.M., Shaw, A.S. (1996). Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* **84**:889-897.

N

Nacht, M., Ferguson, A.T., Zhang, W., Petroziello, J.M., Cook, B.P., Gao, Y.H., Maguire, S., Riley, D., Coppola, G., Landes, G.M., Madden, S.L., Sukumar, S. (1999). Combining serial analysis of gene expression and array technologies to identify genes differentially expressed in breast cancer. *Cancer Research* **59**:5464–5470.

Nacht, M., Ferguson, A.T., Zhang, W., Petroziello, J.M., Cook, B.P., Gao, Y.H., Maguire, S., Riley, D., Coppola, G., Landes, G.M., Madden, S.L., Sukumar, S. (1999). Combining serial analysis of gene expression and array technologies to identify genes differentially expressed in breast cancer. *Cancer Research* **59**:5464–5470.

Nakajima, T., Shimooka, H., Weixa, P., Segawa, A., Motegi, A., Jian, Z., Masuda, N., Ide, M., Sano, T., Oyama, T., Tsukagoshi, H., Hamanaka, K., Maeda, M. (2003). Immunohistochemical demonstration of 14-3-3 sigma protein in normal human tissues and lung cancers, and the preponderance of its strong expression in epithelial cells of squamous cell lineage. *Pathology International* **53**:353-360.

Nakayama, H., Sano, T., Motegi, A., Oyama, T., Nakajima, T. (2005). Increasing 14-3-3 sigma expression with declining estrogen receptor alpha and estrogen-responsive finger protein expression defines malignant progression of endometrial carcinoma. *Pathology International* **55**(11):707-715.

Nalepa, G., Harper, J.W. (2002). Efp: a ring of independence? *Nature Medicine*. **8**(7):661-662.

Nassar, A., Sookhan, N., Santisteban, M., Bryant, S.C., Boughey, J.C., Giorgadze, T., Degnim, A. (2010). Diagnostic utility of snail in metaplastic breast carcinoma. *Diagnostic Pathology* **5**:76.

Negrin, A., Gaitero, L., Añor, S. (2009). Presumptive caudal cerebellar artery infarct in a dog: clinical and MRI findings. *Journal of Small Animal Practice* **50**(11):615-618.

Neupane, D., Korc, M. (2008). 14-3-3 sigma Modulates pancreatic cancer cell survival and invasiveness. *Clinical Cancer Research* **14**(23):7614–7623.

Nicolas, M.M., Wu, Y., Middleton, L.P., Gilcrease, M.Z. (2007). Loss of myoepithelium is variable in solid papillary carcinoma of the breast. *Histopathology* **51**(5):657-665.

Nieto, A., Peña, L., Pérez-Alenza, M.D., Sánchez, M.A., Flores, J.M., Castaño, M. (2000). Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Veterinary Pathology* **37**(3):239-247.

Nunez, N.P., Perkins, S.N., Smith, N.C., Berrigan, D., Berendes, D.M., Varticovski, L., Barrett, J.C., Hursting, S.D. (2008). Obesity accelerates mouse mammary tumor growth in the absence of ovarian hormones. *Nutrition and Cancer* **60**(4):534-541.

O

O'Hare, M.J., Ormerod, M.G., Monaghan, P., Lane, E.B., Gusterson, B.A. (1991). Characterization in vitro of luminal and myoepithelial cells isolated from the human mammary gland by cell sorting. *Differentiation* **46**:209-221.

Okada, H., Nishijima, Y., Yoshino, T., Grone, A., Capen, C.C., Rosol, T.J. (1997). Immunohistochemical localization of parathyroid hormone-related protein in canine mammary tumors. *Veterinary Pathology* **34**(4):356-359.

Okumura, H., Kita, Y., Yokomakura, N., Uchikado, Y., Setoyama, T., Sakurai, H., Omoto, I., Matsumoto, M., Owaki, T., Ishigami, S., Natsugoe, S. (2010). Nuclear expression of 14-3-3 sigma is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Research* **30**(12):5175-5179.

Ordás, J. (2009). Valor predictivo-pronóstico de la expresión de proteína HER-2 en tumores de mama caninos y felinos y su relación con la hormonodependencia de las neoplasias. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.

Osada, H., Tatematsu, Y., Yatabe, Y., Nakagawa, T., Konishi, H., Harano, T., Tezel, E., Takada, M., Takahashi, T. (2002). Frequent and histological type-specific inactivation of 14-3-3sigma in human lung cancers. *Oncogene* **21**(15):2418-2424.

Owens, L.N. (1980). Classification of Tumors in Domestic Animal, 1st ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

P

Page, M.J., Amess, B., Townsend, R.R., Parekh, R., Herath, A., Brusten, L., Zvelebil, M.J., Stein, R.C., Waterfield, M.D., Davies, S.C., O'Hare, M.J. (1999). Proteomic definition of normal human luminal and myoepithelial breast cells purified from reduction mammoplasties. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **96**:12589–12594.

Parodi, A.L., Misdorp, W., Mialot, J.P., Mialot, M., Hart, A.A.M., Hurtrel, M., Salomon, J.C. (1983). Intratumoral BCO and *Corynebacterium parvum* therapy of canine mammary tumors before radical mastectomy. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **15**:172-177.

Patani, N., Jiang, W., Mansel, R., Newbold, R., Mokbel, K. (2009). The mRNA expression of SATB1 and SATB2 in human breast cancer. *Cancer Cell International* **9**:18.

Patsikas, M.N., Dessiris, A. (1996). The lymph drainage of the mammary glands in the bitch: a lymphographic study. Part I: The 1st, 2nd, 4th and 5th mammary glands. *Anatomia, Histologia, Embryologia* **25**:131–138.

Patsikas, M.N., Dessiris, A. (1996). The lymph drainage of the mammary glands in the bitch: a lymphographic study, part II: the 3rd mammary gland. *Anatomia, Histologia, Embryologia* **25**:139–143.

Patsikas, M.N., Karayannopoulou, M., Kaldrymidoy, E., Papazoglou, L.G., Papadopoulou P.L., Tzegas S.I., Tziris N.E., Kaitzis, D.G., Dimitriadis, A.S., Dessiris A.K. (2006). The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: a lymphographic study. *Anatomia, Histologia, Embryologia* **35**:228–234.

Pavan Kumar, P., Purbey, P.K., Sinha, C.K., Notani, D., Limaye, A, Jayani, RS, Galande, S. (2006). Phosphorylation of SATB1, a global gene regulator, acts as a molecular switch regulating its transcriptional activity in vivo. *Molecular Cell* **22**(2):231–243.

Pei, H.P., Ge, H., Jiang, R., Zhu, H. (2010). Expression and clinical significance of 14-3-3 sigma and heat shock protein 27 in colorectal cancer. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*. Mar;**13**(3):213-215.

Pellegrini, G., Dellambra, E., Golisano, O., Martinelli, E., Fantozzi, I., Bondanza, S., Ponzin, D., McKeon, F., De Luca, M. (2001). p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **98**:3156-3161.

Peña, L., Nieto, A., Pérez-Alenza, D., Cuesta, P., Castaño, M. (1998). Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *Journal of Veterinary Investigation* **10**:237-246.

Peoc'h, K., Schröder, H.C., Laplanche, J., Ramljak, S., Müller, W.E. (2001). Determination of 14-3-3 protein levels in cerebrospinal fluid from Creutzfeldt-Jakob patients by a highly sensitive capture assay. *Neuroscience Letters* **301**(3):167-170.

Perathoner, A., Pirkebner, D., Brandacher, G., Spizzo, G., Stadlmann, S., Obrist, P., Margreiter, R., Amberger, A. (2005). 14-3-3 sigma expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients. *Clinical Cancer Research* **11**: 3274–3279.

Pereira, C.T., Rahal, S.C., de Carvalho Balieiro, J.C., Ribeiro, A.A. (2003). Lymphatic drainage on healthy and neoplastic mammary glands in female dogs: can it really be altered? *Anatomia, Histologia, Embryologia* **32**:282–290.

Pereira, C.T., Luiz Navarro Marques, F., Williams, J., Wladimir De Martin, B., Primo Bombonato, P. (2008). ^{99m}Tc-labeled dextran for mammary lymphoscintigraphy in dogs. *Veterinary Radiology & Ultrasound* **49**:487–491.

Pereira, P.D., Lopes, C.C., Matos, A.J., Cortez, P.P., Gärtner, F., Medeiros, R., Lopes, C. (2010). Caveolin-1 in diagnosis and prognosis of canine mammary tumours: comparison of evaluation systems. *Journal of Comparative Pathology* **143**(2-3):87-93.

Perez Alenza, D., Rutteman, G.R., Pena, L. (1998) .Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **12**:132–139.

Pérez-Martínez, C., García-Iglesias, M.J., Durán-Navarrete, A.J., Espinosa-Alvarez, J., García-Fernández, R.A., Lorenzana-Robles, N., Fernández-Pérez, S., García-Marín, J.F. (2005). Histopathological and immunohistochemical characteristics of two canine lipid-rich mammary carcinomas. *Journal of Veterinary Medicine Series A-Physiology Pathology Clinical Medic* **52**(2):61-66.

Petitjean, A., Cavard, C., Shi, H., Tribollet, V., Hainaut, P. (2005). Caron de Fromentel C. The expression of TA and DeltaNp63 are regulated by different mechanisms in liver cells. *Oncogene* **24**:512–519.

Philibert, J.C., Snyder, P.W., Glickman, N., Glickman, L.T., Knapp, D.W., Waters, D.J. (2003). Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **17**(1):102-106.

Polyak, K., Hu, M. (2005). Do myoepithelial cells hold the key for breast tumor progression? *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* **10**:231– 247.

Pozuelo Rubio, M., Geraghty, K.M., Wong, B.H., Wood, N.T., Campbell, D.G., Morrice, N., Mackintosh, C. (2004). 14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation, and trafficking. *Biochemical Journal* **379**:395–408.

Prasad, G.L., Valverius, E.M., McDuffie, E., Cooper, H.L. (1992). Complementary DNA cloning of a novel epithelial cell marker protein, HME1, that may be down-regulated in neoplastic mammary cells. *Cell Growth & Differentiation* **3**:507–513.

Priester, W.A., Mantel, N. (1971). Occurrence of tumors in domestic animals: data from 12 United States and Canadian Colleges of Veterinary Medicine. *Journal of the National Cancer Institute* **47**:1333–1344.

Q

Qi, W., Martinez, J.D. (2003). Reduction of 14-3-3 proteins correlates with increased sensitivity to killing of human lung cancer cells by ionizing radiation. *Radiation Research* **160**(2):217-223.

Qi, W., Liu, X., Qiao, D., Martinez, J.D. (2005). Isoform-specific expression of 14-3-3 proteins in human lung cancer tissues. *International Journal of Cancer* **113**:359-363.

Queiroga, F.L., Alves, A. Pires I, Seixas, F. Pires M, Lopes, C. (2001). The pronostic value of angiogenesis and proliferative index in canine mammary tumours. Proceedings 19th Meeting ESVP Thessaloniki-Greece.

Queiroga, F.L., Pérez-Alenza, M.D., Silvan, G., Peña, L., Lopes, C.S., Illera, J.C. (2008). Crosstalk between GH/IGF-I axis and steroid hormones (progesterone, 17beta-

estradiol) in canine mammary tumours. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **110**(1-2):76-82.

R

Rakha, E.A., Putti, T.C., Abd El-Rehim, D.M., Paish, C., Green, A.R., Powe, D.G., Lee, A.H., Robertson, J.F., Ellis, I.O. (2006). Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. *The Journal of Pathology* **208**(4):495-506.

Ramalho, L.N., Ribeiro-Silva, A., Cassali, G.D., Zucoloto, S. (2006). The expression of p63 and cytokeratin 5 in mixed tumors of the canine mammary gland provides new insights into the histogenesis of these neoplasms. *Veterinary Pathology* **43**(4):424-429.

Ramos-Vara, J.A. Technical aspects of immunohistochemistry. (2005). *Veterinary Pathology* **42**(4): 405-426.

Ramos-Vara, J.A., Kiupel, M., Baszler, T., Bliven, L., Brodersen, B., Chelack, B., Czub, S., Del Piero, F., Dial, S., Ehrhart, E.J., Graham, T., Manning, L., Paulsen, D., Valli, V.E., West, K. (2008). American association of veterinary laboratory diagnosticians subcommittee on standardization of immunohistochemistry suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **20**:393-413.

Ravi, D., Chen, Y., Karia, B., Brown, A., Gu, T.T., Li, J., Carey, M.S, Hennessy, BT, Bishop, A.J. (2011). 14-3-3 σ expression effects G2/M response to oxygen and correlates with ovarian cancer metastasis. *PLoS One* **6**(1):e15864.

Rehm, S., Stanislaus, D.J., Williams, A.M. (2007). Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. *Birth Defects Research: Part B, Developmental and Reproductive Toxicology* **80**:233-245.

Reis-Filho, J.S., Simpson, P.T., Martins, A., Preto, A., Gärtner, F., Schmitt, F.C. (2003). Distribution of p63, cytokeratins 5/6 and cytokeratin 14 in 51 normal and 400 neoplastic human tissue samples using TARP-4 multi-tumor tissue microarray. *Virchows Arch* **443**(2):122-132.

Ressel, L., Millanta, F., Caleri, E., Innocenti, V.M., Poli, A. (2009). Reduced PTEN protein expression and its prognostic implications in canine and feline mammary tumors. *Veterinary Pathology* **46**(5):860-868.

Richards, H.G., McNeil, P.E., Thompson, H., Reid S.W.J. (2001). An epidemiological analysis of a canine-biopsies database compiled by a diagnostic histopathology service. *Preventive Veterinary Medicine* **51**:125-136.

Rivera, P., von Euler, H. (2011). Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors. *Veterinary Pathology* **48**(1):132-146.

Rodo, A., Malicka, E. (2008). Immunohistochemical expression of protein p53 in neoplasms of the mammary gland in bitches. *Polish Journal of Veterinary Sciences* **11**(2):89-95.

Rohaly, G., Chemnitz, J., Dehde, S., Nunez, A.M., Heukeshoven J, Deppert W, Dornreiter, I. (2005). A novel human p53 isoform is an essential element of the ATR-intra-S phase checkpoint. *Cell* **122**:21-32.

Rosai, J. (1996). Ackerman's surgical pathology (8thed.). Sto Louis: Mosby, 2:1565-1660.

Roseboom, P.H., Weller, J.L., Babila, T., Aitken, A., Sellers, L.A., Moffett, J.R., Namboodiri, M.A., Klein, D.C. (1994). Cloning and characterization of the epsilon and zeta isoforms of the 14-3-3 proteins. *DNA and Cell Biology* **13**(6):629-640.

Rosner, M., Hengstschläger, M. (2006). 14-3-3 proteins are involved in the regulation of mammalian cell proliferation. *Amino Acids* **30**(1):105-109.

Roth, D., Morgan, A., Martin, H., Jones, D., Martens, G.J., Aitken, A., Burgoyne, R.D. (1994). Characterization of 14-3-3 proteins in adrenal chromaffin cells and demonstration of isoform-specific phospholipid binding. *Biochemical Journal* **301**(1):305-310.

Rutteman, G.R., Withrow, S.J., MacEwen, E.G. (2001). Tumors of the mammary gland. In: Small Animal Clinical Oncology. Withrow, S.J., MacEwen, E.G., 3rd ed, pp. 455-477. WB Saunders, Philadelphia. USA.

S

- Saba, C.F., Rogers, K.S., Newman, S.J., Mauldin, G.E., Vail, D.M. (2007). Mammary gland tumors in male dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **21**(5):1056-1059.
- Samuel, T., Weber, H.O., Rauch, P., Verdoodt, B., Eppel, J.T., McShea, A., Hermeking, H., Funk, J.O. (2001). The G2/M regulator 14-3-3sigma prevents apoptosis through sequestration of Bax. *Journal of Biological Chemistry* **276**:45201-45206.
- Sánchez-Céspedes, R., Millán, Y., Guil-Luna, S., García-Monterde, J., Reymundo, C., Espinosa de Los Monteros, A., Martín de Las Mulas, J. (2011). Myoepithelial Cell Layer Integrity in Canine Mammary Carcinoma. *Journal of Comparative Pathology* **145**:25-30.
- Sandoval, J. (2003). In: Tratado de Anatomía Veterinaria, tomo IV. Ed. José Sandoval Juárez. Imprenta sorles. Leon. España.
- Sano, T., Shimooka, H., Weixa, P., Segawa, A., Jian, Z., Motegi, A., Nakayama, H., Oyama, T., Nakajima, T. (2004). Immunohistochemical expression of 14-3-3 sigma protein in various histological subtypes of uterine cervical cancers. *Pathology International* **54**(10):743-750.
- Santos, M., Marcos, R., Faustino, A.M. (2010). Histological Study of Canine Mammary Gland During the Oestrous Cycle. *Reproduction in Domestic Animals* **45**:146-154.
- Saraiva, A.L., Gärtner, F., Pires, M.A. (2008). Expression of p63 normal canine skin and primary cutaneous glandular carcinomas. *Veterinary Journal* **177**(1):136-140.
- Sartin, E.A., Barnes, S., Toivio-Kinnucan, M., Wright, J.C., Wolfe, L.G. (1993). Heterogenic properties of clonal cell lines derived from canine mammary carcinomas and sensitivity to tamoxifen and doxorubicin. *Anticancer Research* **13**(1):229-236.
- Sato, N., Maitra, A., Fukushima, N., van Heek N.T., Matsubayashi, H., Iacobuzio-Donahue, C.A., Rosty, C., Goggins, M. (2003). Frequent hypomethylation of multiple genes overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Research* **63**:4158-4166.

Sautet, J.Y., Ruberte, J., López, C. (1992). Lymphatic system of the mammary gland in the dog: An approach to the surgical treatment of malignant mammary tumors. *Canine practice* **17**:30-33.

Scanziani, E., Caniatti, M., Sen, S., Erba, E., Cairoli, F., Battocchio, M. (1991). Flow cytometric analysis of cellular DNA content in paraffin wax-embedded specimens of canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology* **105**(1):75-82.

Scarff, R.W., Torloni, H. (1968). Histological typing of breast tumors. In: International classification of tumors Vol 2. Geneva: World Health Organization, pp. 13-20.

Schafer K.A., Kelly G., Schrader R., Griffith W.C., Muggenburg B.A., Tierney L.A., Lechner J.F., Janovitz E.B., Hahn F.F. (1998). A canine model of familial mammary gland neoplasia. *Veterinary Pathology* **35**:168–177.

Schneider, R., Dorn, C.R., Taylor, D.O.N. (1969). Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *Journal of the National Cancer Institute* **43**:1249–1261.

Schneider, R. (1970). Comparison of age, sex and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer* **26**:419–426.

Seethala, R.R., LiVolsi, V.A., Zhang, P.J., Pasha, T.L., Baloch, Z.W. (2005). Comparison of p63 and p73 expression in benign and malignant salivary gland lesions. *Head & Neck* **27**(8):696-702.

Seixas, F., Pires, M.A., Lopes, C.A. (2008). Complex carcinomas of the mammary gland in cats: pathological and immunohistochemical features. *Veterinary Journal* **176**(2):210-215.

Selman, P.J, Van Garderen, E., Mol, J.A, Van der Ingh, T.S. (1995). Comparison of the histological changes in the dog after treatment with the progestins medroxyprogesterone acetate and proligestone. *Veterinary Quarterly* **17**:128–133.

Sfacteria, A., Bertani, C., Costantino, G., Del Bue, M., Paiardini, M., Cervasi, B., Piedimonte, A., De Vico, G. (2003). Cyclin D1 expression in pre-cancerous and cancerous lesions of the canine mammary gland. *Journal of Comparative Pathology* **128**:245–251.

Shankardas J, Senchyna M, Dimitrijevič SD. Presence and distribution of 14-3-3 proteins in human ocular surface tissues. (2008). *Molecular Vision* **14**:2604-2615.

Shiba-Ishii, A., Kano J., Morishita, Y., Sato, Y., Minami, Y., Noguchi, M. (2011). High expression of stratifin is a universal abnormality during the course of malignant progression of early-stage lung adenocarcinoma. *International Journal of Cancer*. [Epub ahead of print].

Shofer, F.S., Sonnenschein, E.G., Goldschmidt, M.H., Laster, L.L., Glickman, L.T. (1989). Histopathologic and dietary prognostic factors for canine mammary carcinoma. *Breast Cancer Research and Treatment* **13**:49-60.

Shoji, M., Kawamoto, S., Setoguchi, Y., Mochizuki, K., Honjoh, T., Kato, M., Hashizume, S., Hanagiri, T., Yoshimatsu, T., Nakanishi, K. (1994). The 14-3-3 protein as the antigen for lung cancer-associated human monoclonal antibody AE6F4. *Human Antibodies and Hybridomas* **5**(3-4):123-130.

Simooka, H., Oyama, T., Sano, T., Horiguchi, J., Nakajima, T. (2004). Immunohistochemical analysis of 14-3-3 sigma and related proteins in hyperplastic and neoplastic breast lesions, with particular reference to early carcinogenesis. *Pathology International* **54**:595-602.

Simon, D., Schoenrock, D., Nolte, I., Baumgärtner, W., Barron, R., Mischke, R. (2009). Cytologic examination of fine-needle aspirates from mammary gland tumors in the dog: diagnostic accuracy with comparison to histopathology and association with postoperative outcome. *Veterinary Clinical Pathology* **38**(4):521-528.

Simpson, P.T., Gale, T., Reis-Filho, J.S., Jones, C., Parry, s., Steele, D., Cossu, A., budroni, M., Palmieri, G., Lakhani, S.R. (2004). Distribution and significance of 14-3-3-sigma, a novel myoepithelial marker, in normal, benign, and malignant breast tissue. *Journal of Pathology* **202**(3):274-285.

Sinha, P., Hütter, G., Köttgen, E., Dietel, M., Schadendorf, D., Lage, H. (1999). Increased expression of epidermal fatty acid binding protein, cofilin, and 14-3-3-sigma (stratifin) detected by two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry and microsequencing of drug-resistant human adenocarcinoma of the pancreas. *Electrophoresis* **20**(14):2952-2960.

Sitek, B., Sipos, B., Alkatout, I., Poschmann, G., Stephan, C., Schulenburg, T., Marcus, K., Lüttges, J., Dittert, D.D., Baretton, G., Schmiegel, W., Hahn, S.A., Klöppel, G., Meyer, H.E., Stühler, K. (2009). Analysis of the pancreatic tumor progression by a quantitative proteomic approach and immunohistochemical validation. *Journal of Proteome Research* **8**(4):1647–1656.

Snizek, J.C., Matheny, K.E., Burkey, B.B., Netterville, J.L., Pietenpol, J.A. (2002). Expression of p63 and 14-3-3 sigma in normal and hyperdifferentiated mucosa of the upper aerodigestive tract. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* **126**(6):598–601.

Sonnenschein, E.G., Glickman, L.T., Goldschmidt, M.H., McKee, L.J. (1991). Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study. *American Journal of Epidemiology* **133**:694–703.

Sorenmo, K.U., Shofer, F.S., Goldschmidt, M.H. (2000). Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **14**(3):266-70.

Sorenmo, K.U. (2003). Canine mammary gland tumors. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* **33**:573–596.

Sorenmo, K.U., Kristiansen, V.M., Cofone, M.A., Shofer, F.S., Breen, A.M., Langeland, M., Mongil, C.M., Grondahl, A.M., Teige, J., Goldschmidt, M.H. (2009). Canine mammary gland tumors; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Veterinary and Comparative Oncology* **7**:162–172.

Sorenmo, K.U., Rasotto, R., Zappulli, V., Goldschmidt, M.H. (2011). Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Veterinary Pathology* **48**(1):85-97.

Souza CH de, M., Toledo-Piza, E., Amorin, R., Barboza, A., Tobias, K.M. (2009). Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment. *Canadian Veterinary Journal* **50**(5):506-510.

Stefanou, D., Batistatou, A., Nonni, A., Arkoumani, E., Agnantis, N.J. (2004). p63 expression in benign and malignant breast lesions. *Histology and Histopathology* **19**(2):465-471.

- Steinacker, P., Schwarz, P., Reim, K., Brechlin, P., Jahn, O., Kratzin, H., Aitken, A., Wiltfang, J., Aguzzi, A., Bahn, E., Baxter, H.C., Brose, N., Otto, M. (2005). Unchanged survival rates of 14-3-3 gamma knockout mice after inoculation with pathological prion protein. *Molecular and Cellular Biology* **25**(4):1339-1346.
- Stockhaus, C., Kohn, B., Rudolph, R., Brunnberg, L., Giger, U. (1999). Correlation of haemostatic abnormalities with tumour stage and characteristics in dogs with mammary carcinoma. *Journal of Small Animal Practice* **40**(7):326-31.
- Stovring, M., Moe, L., Glattre, E. (1997). A population based case-control study of canine mammary tumors and clinical use of medroxyprogesterone acetate. *APMIS* **105**:590-596.
- Stratmann, N., Failing, K., Richter, A., Wehrend, A. (2008). Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy. *Veterinary Surgery* **37**(1):82-86.
- Stricker, T.P., Kumar, V. (2010). Neoplasias. In: Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional. Ed. Elsevier. Saunders.
- Subramanian, R.R., Masters, S.C., Zhang, H., Fu, H. (2001). Functional conservation of 14-3-3 isoforms in inhibiting bad-induced apoptosis. *Experimental Cell Research* **271**(1):142-151.
- Sureban, S.M., May, R., Lightfoot, S.A., Hoskins, A.B., Lerner, M., Brackett, D.J., Postier, R.G., Ramanujam, R., Mohammed, A., Rao, C.V., Wyche, J.H., Anant, S., Houchen, C.W. (2011). DCAMKL-1 regulates epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cells through a miR-200a-dependent mechanism. *Cancer Research* **71**(6):2328-2338.
- Suzuki, A., Watanabe, H., Mizutani, T., Sato, T., Ohta, Y., Iguchi, T. (2006). Global gene expression in mouse vaginae exposed to diethylstilbestrol at different ages. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)* **231**(5):632-640.
- Suzuki T., Urano, T., Miki, Y., Moriya, T., Akahira, J., Ishida, T., Horie, K., Inoue, S., Sasano, H. (2007). Nuclear cyclin B1 in human breast carcinoma as a potent prognostic factor. *Cancer Science* **98**(5):644-651.

T

Takai, D., Jones, P.A. (2002). Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **99**:3740-3745.

Tanaka, K., Hatada, T., Kobayashi, M., Mohri, Y, Tonouchi, H., Miki, C., Nobori, T., Kusunoki, M. (2004). The clinical implication of 14-3-3 sigma expression in primary gastrointestinal malignancy. *International Journal of Oncology* **25**(6):1591-1597.

Tateyama, S., Uchida, K., Hidaka, T., Hirao, M., Yamaguchi, R. (2001). Expression of bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) in myoepithelial cells in canine mammary gland tumors. *Veterinary Pathology* **38**(6):703-709.

Tavares, W.L., Lavalle, G.E., Figueiredo, M.S., Souza, A.G., Bertagnolli, A.C., Viana, F.A., Paes, P.R., Carneiro, R.A., Cavalcanti, G.A., Melo, M.M., Cassali, G.D. (2010). Evaluation of adverse effects in tamoxifen exposed healthy female dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica* **52**:67.

Taylor, G.N., Shabestari, L., Williams, J., Mays, C.W., Angus, W., McFarland, S. (1976). Mammary neoplasia in a closed Beagle colony. *Cancer Research* **36**:2740-2743.

Taylor-Papadimitriou, J., Lane, E.B. (1987). Keratin expression in the mammary gland. In: Neville, M.C., Daniel, C.W. (Eds.), *The Mammary Gland: Development, Regulation and Function*. Plenum, New York, USA, pp. 181-215.

Teske, E., Rutteman, G.R., vd Ingh, T.S., van Noort, R., Misdorp, W. (1998). Liposome-encapsulated muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine (L-MTP-PE): a randomized clinical trial in dogs with mammary carcinoma. *Anticancer Research* **18**(2A):1015-1019.

Thamm, D.H., Rose, B., Kow, K., Humbert, M., Mansfield, C.D., Moussy, A, Hermine, O, Dubreuil, P. (2011). Masitinib as a chemosensitizer of canine tumor cell lines: A proof of concept study. *Veterinary Journal* Feb 17. [Epub ahead of print].

Tokugawa, T., Sugihara, H., Tani, T., Hattori, T. (2002). Modes of silencing of p16 in development of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Research* **62**:4938-4944.

Toyo-oka, K., Shionoya, A., Gambello, M.J., Cardoso, C., Leventer, R., Ward, H.L., Ayala, R., Tsai, L.H., Dobyns, W., Ledbetter, D., Hirotsune, S., Wynshaw-Boris, A. (2003). 14-3-3epsilon is important for neuronal migration by binding to NUDEL: a molecular explanation for Miller-Dieker syndrome. *Nature Genetics* **34**(3):274-285.

Tse, G.M., Tan, P.H., Lui, P.C., Gilks, CB, Poon, C.S., Ma, T.K., Law, B.K., Lam, W.W. (2007). The role of immunohistochemistry for smooth-muscle actin, p63, CD10 and cytokeratin 14 in the differential diagnosis of papillary lesions of the breast. *Journal of Clinical Pathology* **60**(3):315-320.

Tsuruta, F., Sunayama, J., Mori, Y., Hattori, S., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., Yoshioka, K., Masuyama, N., Gotoh, Y. (2004). JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO Journal* **23**(8):1889-1899.

Turashvili, G., Hayes, M., Gilks, B., Watson, P., Aparicio, S. (2008). Are columnar cell lesions the earliest histologically detectable non-obligate precursor of breast cancer? *Virchows Arch* **452**(6):589-598.

Tymchuk, C.N., Tessler, S.B., Barnard, R.J. (2001). Changes in sex hormonebinding globulin, insulin, and serum lipids in postmenopausal women on a low-fat high-fiber diet combined with exercise. *Nutrition and Cancer* **38**:158-162.

Tzivion, G., Shen, Y.H., Zhu, J. (2001). 14-3-3 proteins; bringing new definitions to scaffolding. *Oncogene* **20**(44):6331-6338.

Tzivion, G., Avruch, J. (2002). 14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **277**(5):3061-3064.

Tzivion, G., Gupta, V.S., Kaplun, L., Balan, V. (2006). 14-3-3 proteins as potential oncogenes. *Seminars in Cancer Biology* **16**:203-213.

U

Uchida, D., Begum, N.M., Almofti, A., Kawamata, H., Yoshida, H., Sato, M. (2004). Frequent downregulation of 14-3-3 sigma protein and hypermethylation of 14-3-3 sigma gene in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *British Journal of Cancer* **91**(6):1131-1138.

Umahara, T., Uchihara, T., Nakamura, A., Iwamoto, T. (2009). Isoform-dependent immunolocalization of 14-3-3 proteins in developing rat cerebellum. *Brain Research* **1253**:15-26.

Umbricht, C.B., Evron, E., Gabrielson, E., Ferguson, A., Marks, J., Sukumar, S. (2001). Hypermethylation of 14-3-3 sigma (stratifin) is an early event in breast cancer. *Oncogene* **20**:3348–3353.

Urano, T., Saito T., Tsukui, T, Fujita, M., Hosoi T, Muramatsu M., Ouchi, Y., Inoue, S. (2002). Efp targets 14-3-3 sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth. *Nature* **417**(6891):871-875.

Urano, T., Takahashi, S., Suzuki, T., Fujimura, T., Fujita, M., Kumagai, J., Horie-Inoue, K., Sasano, H., Kitamura, T., Ouchi, Y., Inoue, S. (2004). 14-3-3 sigma is down-regulated in human prostate cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **319**(3):795-800.

V

Vail, D.M., MacEwen, E.G. (2000). Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Investigation* **18**:781–792.

Van Everbroeck, B.R., Boons, J., Cras, P. (2005). 14-3-3 {gamma}-isoform detection distinguishes sporadic Creutzfeldt-Jakob disease from other dementias. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* **76**(1):100-102.

Vayssade, M., Haddada, H, Faridoni-Laurens, L., Tourpin, S., Valent, A., Benard, J., Ahomadegbe, J.C. (2005). P73 functionally replaces p53 in Adriamycin-treated, p53-deficient breast cancer cells. *International Journal of Cancer* **116**:860–869.

Vercoutter-Edouart, A.S., Lemoine, J., Le Bourhis, X., Louis, H., Boilly, B., Nurcombe, V., Révillion, F., Peyrat, J.P., Hondermarck, H. (2001). Proteomic analysis reveals that 14-3-3 sigma is down-regulated in human breast cancer cells. *Cancer Research* **61**(1):76–80.

Villaret, D.B., Wang, T., Dillon, D., Xu, J., Sivam, D., Cheever, M.A., Reed, S.G. (2000). Identification of genes overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma using a combination of complementary DNA subtraction and microarray analysis. *Laryngoscope* **110**:374–381.

Vogelstein, B., Lane, D., Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* **408**:307–310.

Vogelstein, B., Kinzler, K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine* **10**(8):789-799.

Vos, J.H., van den Ingh, T.S., Misdorp, W., Molenbeek, R.F., van Mil, F.N., Rutteman, G.R., Ivanyi, D., Ramaekers, F.C. (1993a). Immunohistochemistry with keratin, vimentin, desmin, and alpha-smooth muscle actin monoclonal antibodies in canine mammary gland: benign mammary tumours and duct ectasias. *The Veterinary quarterly* **15**(3):89-95.

Vos, J.H., van den Ingh, T.S., Misdorp, W., Molenbeek, R.F., van Mil, F.N., Rutteman, G.R., Ivanyi, D., Ramaekers, F.C. (1993b). Immunohistochemistry with keratin, vimentin, desmin, and alpha-smooth muscle actin monoclonal antibodies in canine mammary gland: malignant mammary tumours. *The Veterinary quarterly* **15**(3):96-102.

Vousden, K.H., Prives, C. (2009). Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell* **137**:413–431.

W

Wang, B., Yang, H., Liu, Y.C., Jelinek, T., Zhang, L., Ruoslahti, E., Fu, H. (1999). Isolation of high-affinity peptide antagonists of 14-3-3 proteins by phage display. *Biochemistry* **38**(38):12499-12504.

Wang, Z., Tropè, C.G., Suo, Z, Trøen, G., Yang, G., Nesland, J.M., Holm, R. (2008). The clinicopathological and prognostic impact of 14-3-3 sigma expression on vulvar squamous cell carcinomas. *BMC Cancer* **8**:308.

Watanabe, M., Chen, I.Y., Ishikura, Y., Nakagawa, T., Mochizuki, M., Nishimura, R., Sasaki, N., Sugano, S. (2009). Tumor cell growth inhibition and cell differentiation analysis in a canine mammary tumor cell line (MCM-B2) treated with four chemical reagents. *Journal of Veterinary Medical Science* **71**:1413-1417.

Webster, J.D., Dennis, M.M., Dervisis, N., Heller, J., Bacon, N.J., Bergman, P.J., Bienzle, D., Cassali, G., Castagnaro, M., Cullen, J., Esplin, D.G., Peña L., Goldschmidt, M.H., Hahn, K.A., Henry CJ, Hellmén, E., Kamstock D., Kirpensteijn, J,

Kitchell, B.E., Amorim, R.L, Lenz, S.D., Lipscomb, T.P., McEntee, M, McGill, L.D., McKnight, C.A., McManus, P.M., Moore, A.S., Moore, PF, Moroff SD, Nakayama, H., Northrup, N.C., Sarli G, Scase T, Sorenmo, K., Schulman, F.Y., Shoieb, A.M., Smedley R.C., Spangler, W.L., Teske, E., Thamm, D.H., Valli V.E., Vernau W., Euler H., Withrow SJ, Weisbrode SE, Yager, J., Kiupel, M. (2011). Recommended Guidelines for the Conduct and Evaluation of Prognostic Studies in Veterinary Oncology. *Veterinary Pathology* **48**:7-18.

Westfall, M.D., Mays, D.J., Sniezek, J.C., Pietenpol, J.A. (2003). The Delta Np63 alpha phosphoprotein binds the p21 and 14-3-3 sigma promoters in vivo and has transcriptional repressor activity that is reduced by Hay-Wells syndrome-derived mutations. *Molecular Cell Biology* **23**:2264–2276.

Whitley, E.M., Bird, A.C., Zucker, K.E., Wolfe, L.G. (1995). Modulation by canine interferon-gamma of major histocompatibility complex and tumor-associated antigen expression in canine mammary tumor and melanoma cell lines. *Anticancer Research* **15**(3):923-929.

Wilker, E., Yaffe, M.B. (2004). 14-3-3 Proteins-a focus on cancer and human disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **37**(3):633-642.

Wilker, E.W., van Vugt, M.A., Artim, S.A., Huang, P.H., Petersen, C.P., Reinhardt, H.C., Feng, Y., Sharp, P.A., Sonenberg, N., White, F.M., Yaffe, M.B. (2007). 14-3-3 sigma controls mitotic translation to facilitate cytokinesis. *Nature* **446**(7133):329-32.

Wiltfang, J., Otto, M., Baxter, H.C., Bodemer, M., Steinacker, P., Bahn, E., Zerr I, Kornhuber, J., Kretzschmar, H.A., Poser, S., R  ther, E., Aitken, A. (1999). Isoform pattern of 14-3-3 proteins in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Journal of Neurochemistry* **73**(6):2485-2490.

Wu, A.H., Pike, M.C., Stram, D.O. (1999) Meta-analysis: dietary fat intake, serum estrogen levels, and the risk of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **91**:529–534.

X

Xavier, F.C., Takiya, C.M., Reis, S.R., Ramalho, L.M. (2009). p63 Immunoexpression in lip carcinogenesis. *Journal of Molecular Histology* **40**(2):131-137.

Xiao, G., Lu, Q., Li C., Wang, W., Chen, Y, Xiao, Z. (2010). Comparative proteome analysis of human adenocarcinoma. *Medical Oncology* **27**(2):346-356.

Xing, H., Zhang, S., Weinheimer, C., Kovacs, A., Muslin, A.J. (2000). 14-3-3 proteins block apoptosis and differentially regulate MAPK cascades. *EMBO Journal* **19**(3):349-358.

Y

Yamada, Y., Sato, R., Kobayashi, S., Hankanga, C., Inanami, O., Kuwabara, M., Momota, Y., Tomizawa, N., Yasuda, J. (2008). The antiproliferative effect of bovine lactoferrin on canine mammary gland tumor cells. *The Journal of Veterinary Medical Science* **70**(5):443-448.

Yamagami, T., Kobayashi, T., Takahashi, K., Sugiyama, M. (1996a). Influence of ovariectomy at the time of mastectomy on the prognosis for canine malignant mammary tumours. *Journal of Small Animal Practice* **37**:462-464.

Yamagami, T., Kobayashi, T., Takahashi, K., Sugiyama M. (1996b). Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. *Journal of Veterinary Medicine Science* **58**(11):1079-1083.

Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M.D., Dötsch ,V., Andrews, N.C., Caput, D., McKeon, F. (1998). p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Molecular Cell* **2**(3):305-316.

Yang, A., McKeon, F. (2000). p63 and p73: p53 mimics, menaces and more. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **1**(3):199-207.

Yang HY, Wen YY, Chen CH, Lozano G, Lee MH. (2003). 14-3-3 sigma positively regulates p53 and suppresses tumor growth. *Molecular and Cellular Biology* **23**(20):7096-7107.

Yang, H., Zhang, Y., Zhao, R., Wen, Y.Y., Fournier, K., Wu, H.B., Yang, H.Y., Diaz, J., Laronga, C., Lee, M.H. (2006a). Negative cell cycle regulator 14-3-3sigma stabilizes p27 Kip1 by inhibiting the activity of PKB/Akt. *Oncogene* **25**(33):4585-4594.

Yang, W.Y., Liu, C.H., Chang, C.J., Lee, C.C., Chang, K.J., Lin, C.T. (2006b). Proliferative activity, apoptosis and expression of oestrogen receptor and Bcl-2 oncoprotein in canine mammary gland tumours. *Journal of Comparative Pathology* **134**:70–79.

Yatabe, Y., Osada, H., Tatematsu, Y., Mitsudomi, T., Takahashi, T. (2002). Decreased expression of 14-3-3sigma in neuroendocrine tumors is independent of origin and malignant potential. *Oncogene* **21**(54):8310-8319.

Yu, C.H., Song G.S., Yhee, J.Y., Kim, J.H., Im, K.S., Nho, W.G., Lee, J.H., Sur, J.H. (2011). Histopathological and Immunohistochemical Comparison of the Brain of Human Patients with Alzheimer's Disease and the Brain of Aged Dogs with Cognitive Dysfunction. *Journal of Comparative Pathology* [Epub ahead of print].

Z

Zaidan Dagli, M.L. (2008). The search for suitable prognostic markers for canine mammary tumors: A promising outlook. *Veterinary Journal* **177**(1):3-5.

Zhang, Y., Karas, M., Zhao, H., Yakar, S., LeRoith, D. (2004). 14-3-3sigma mediation of cell cycle progression is p53-independent in response to insulin-like growth factor-I receptor activation. *Journal of Biological Chemistry* **279**(33):34353-34360.

Zuckerman, V., Wolyniec, K., Sionov, R.V., Haupt, S., Haupt, Y. (2009). Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. *The Journal of Pathology* **219**(1):3-15.

Zurita, M., Lara, P.C., del Moral, R., Torres, B., Linares-Fernández, J.L., Arrabal, S.R., Martínez-Galán J, Oliver FJ, Ruiz de Almodóvar JM. (2010). Hypermethylated 14-3-3-sigma and ESR1 gene promoters in serum as candidate biomarkers for the diagnosis and treatment efficacy of breast cancer metastasis. *BMC Cancer* **10**:217.

You will travel far, my little Kal-El. But we will never leave you... even in the face of our deaths.

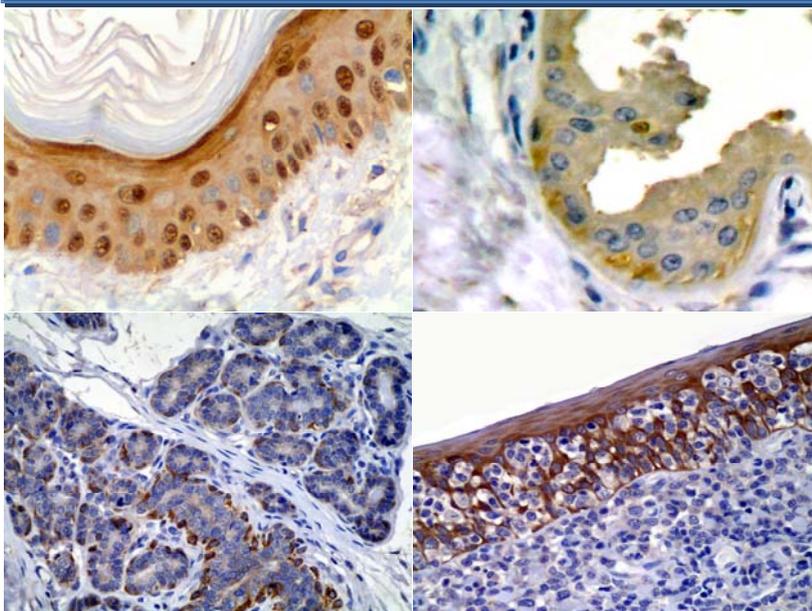
You will make my strength your own.

See my life through your eyes, as your life will be seen through mine.

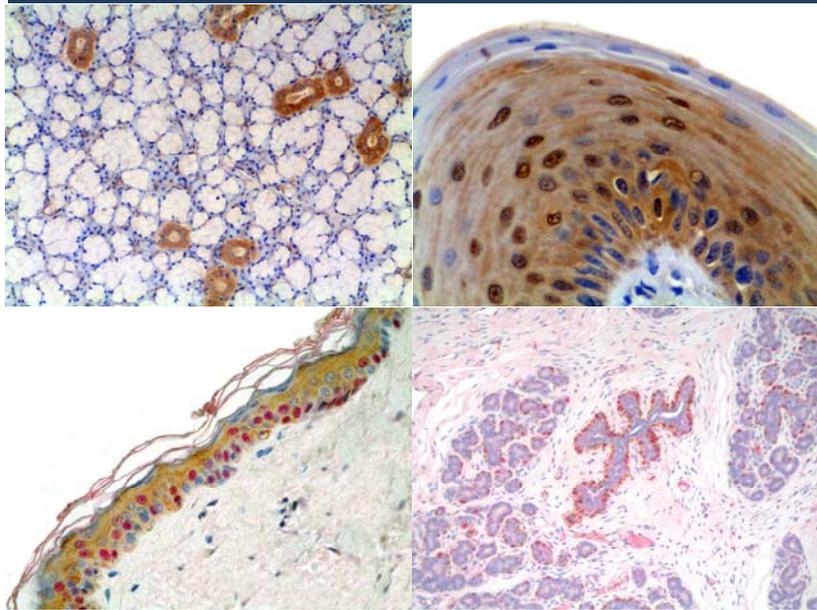
The son becomes the father, and the father...the son.

Esta tesis está dedicada a Mi Padre,
Don Esteban Luis Suárez López,
cuya vida ha estado dedicada abnegadamente, a la educación de sus hijos y
al cuidado de su esposa.

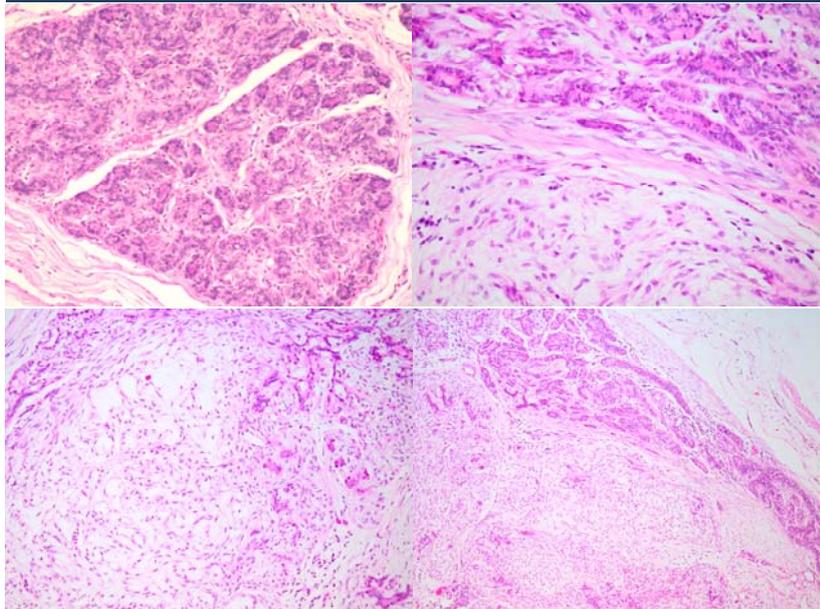
ÍNDICE



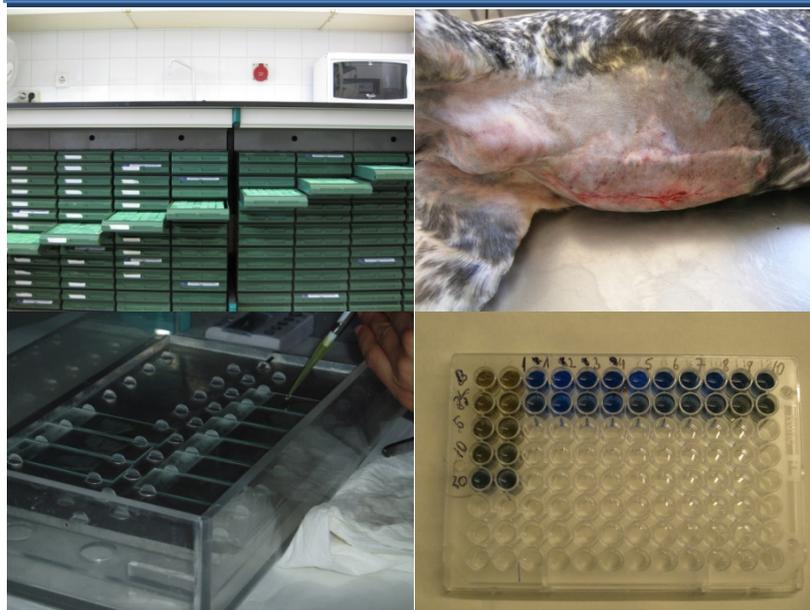
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



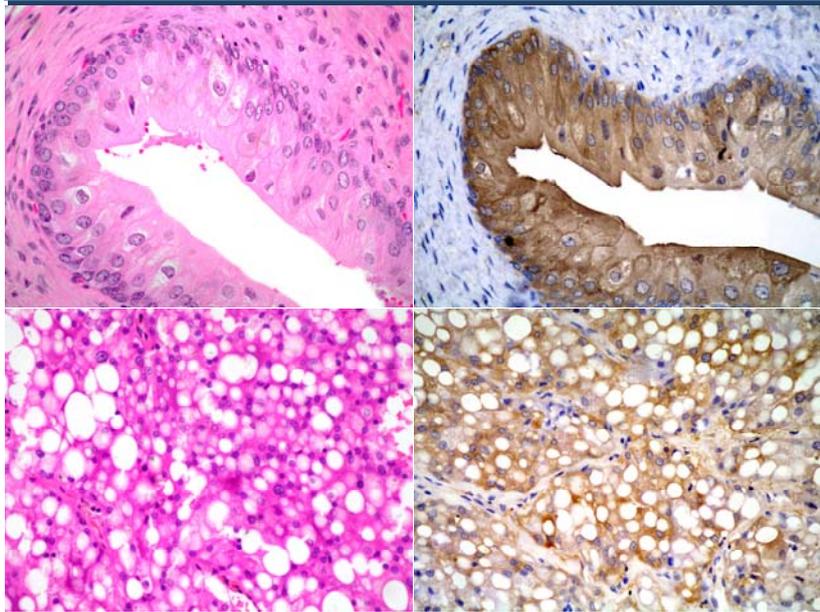
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



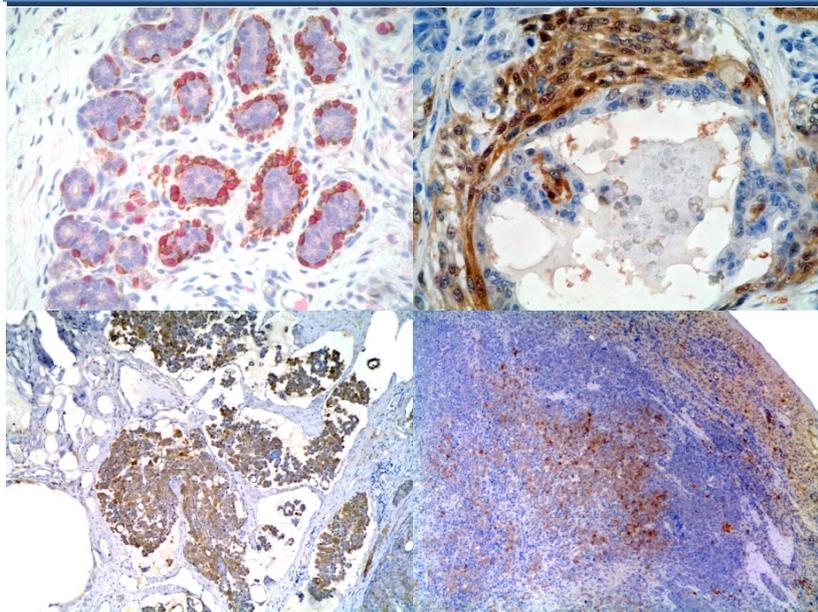
3. MATERIAL Y MÉTODOS



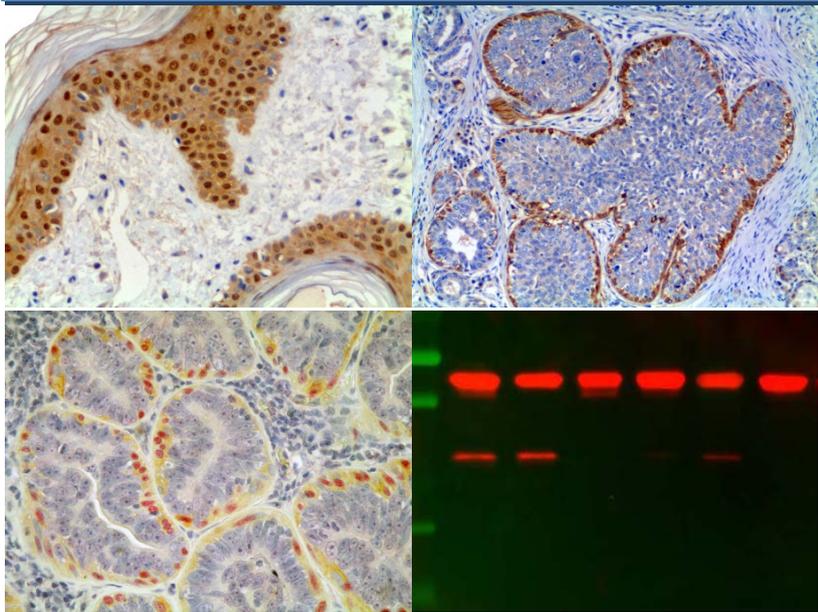
4. RESULTADOS



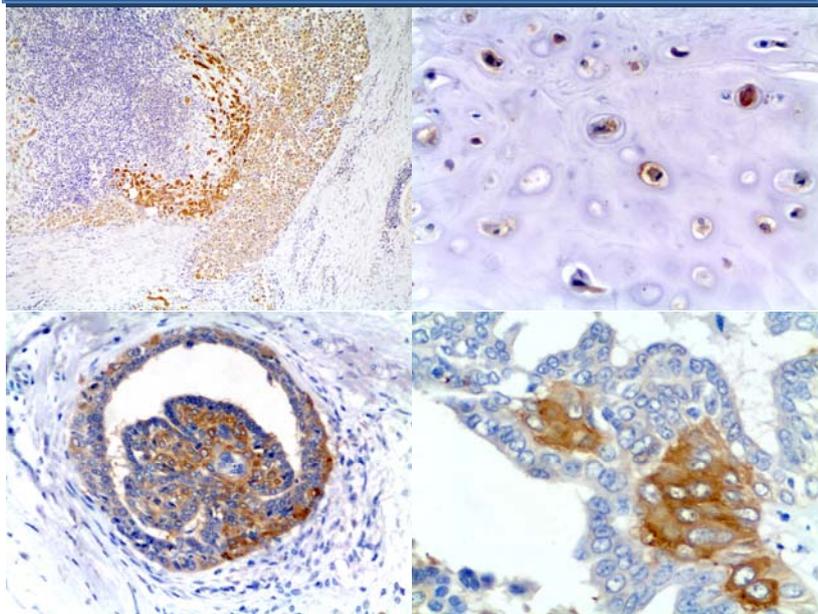
5. DISCUSIÓN



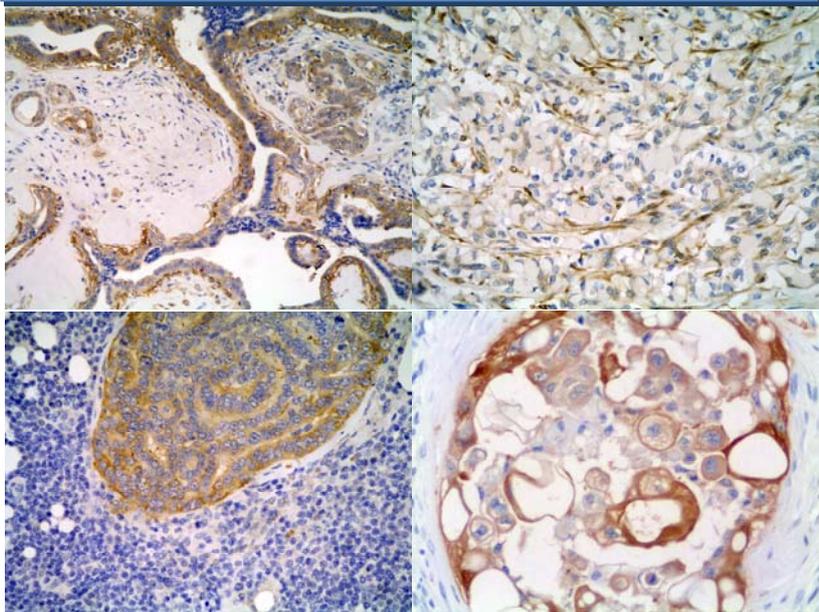
6. CONCLUSIONES



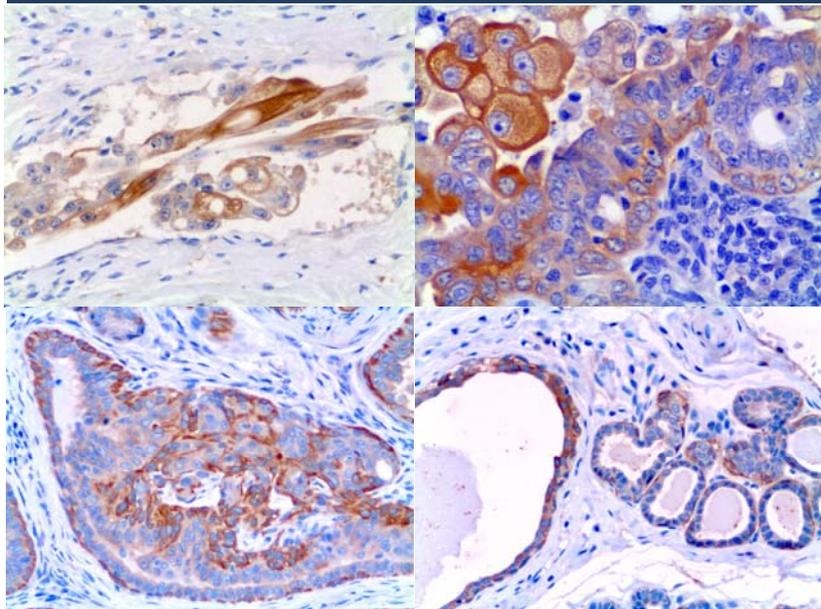
7. RESUMEN / SUMMARY



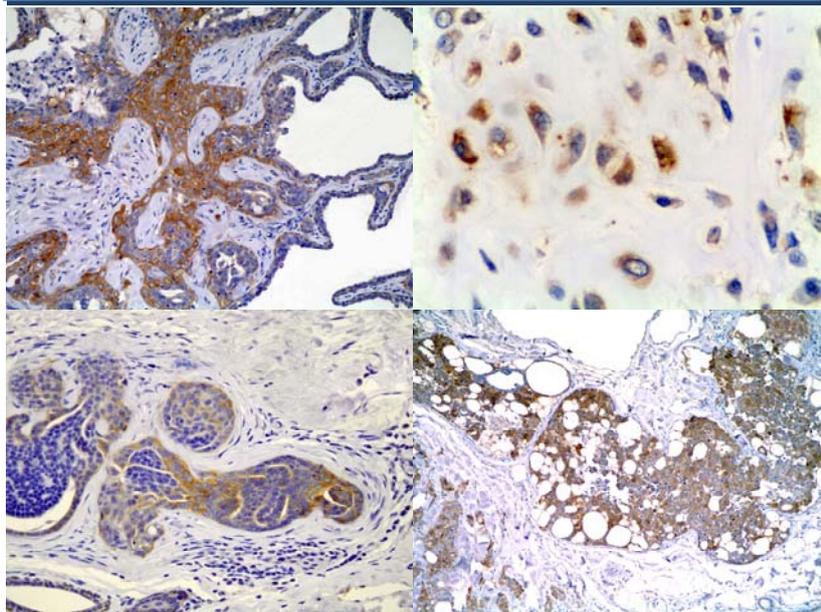
8. AGRADECIMIENTOS



9. BIBLIOGRAFÍA



10. ANEXO I





UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA



Anexo I

D^a MARÍA SORAYA DÉNIZ SUÁREZ, SECRETARIA DEL INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

CERTIFICA

Que el Consejo de Doctores del Departamento en su sesión de fecha 10 de mayo de 2011 tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada: **“EXPRESIÓN DE LA PROTEINA 14-3-3 σ EN TEJIDOS NORMALES Y NEOPLASIAS MAMARIAS DE LA ESPECIE CANINA”**, presentada por el doctorando Don Alejandro Suárez Bonnet, dirigida por el Doctor Don Antonio Espinosa de los Monteros y Zayas y el Doctor Don Pedro Manuel Herráez Thomas.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 73.2 del reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a once de mayo de dos mil once.



Anexo II

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Departamento: Instituto Universitario de Sanidad Animal Y Seguridad Alimentaria.

Programa de Doctorado: Sanidad Animal.

Título de la Tesis

“EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA 14-3-3 σ EN TEJIDOS NORMALES Y NEOPLASIAS MAMARIAS DE LA ESPECIE CANINA”.

Tesis Doctoral presentada por Don Alejandro Suárez Bonnet.

Dirigida por el Dr. Don Antonio Espinosa de los Monteros y Zayas y co-dirigida por el Dr. Don Pedro Manuel Herráez Thomas.

El Director

El Co-Director

El Doctorando

Las Palmas de Gran Canaria, a 10 de mayo de 2011.



Contents lists available at ScienceDirect

The Veterinary Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tvj

Expression of 14-3-3 σ protein in normal and neoplastic canine mammary gland

Alejandro Suárez-Bonnet^{a,*}, Pedro Herráez^a, Juana Martín de las Mulas^b, Francisco Rodríguez^a, José M. Déniz^c, Antonio Espinosa de los Monteros^a

^a Unit of Histology and Animal Pathology, Institute for Animal Health, Veterinary School, University of Las Palmas de Gran Canaria, 35413 Las Palmas, Spain

^b Department of Comparative Pathology, Veterinary School, University of Córdoba, Campus de Rabanales, 14014 Córdoba, Spain

^c Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, University of Las Palmas de Gran Canaria, 35016 Las Palmas, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 12 December 2010

Available online xxx

Keywords:

14-3-3 σ protein
Canine mammary tumours
Immunohistochemistry
Myoepithelial cells

ABSTRACT

14-3-3 σ protein is a negative cell cycle regulator, with both reduced and elevated levels associated with cancer in humans. This study assessed the expression of this protein in canine mammary tissues using immunohistochemistry and Western blotting. 14-3-3 σ was detected in 97% of the mammary tissue samples examined and was found in both myoepithelial (MECs) and epithelial (ECs) cells. Expression levels were elevated and reduced in neoplastic ECs and MECs, respectively ($P < 0.001$). Intense expression of 14-3-3 σ was detected in neoplastic ECs infiltrating blood vessels and lymph nodes and suggests a possible role for this protein in the malignant transformation of mammary neoplasms. Moreover, double immunostaining for 14-3-3 σ and the MEC-specific marker p63, confirmed that 14-3-3 σ is a highly sensitive marker of MECs since all p63-positive cells were also positive for 14-3-3 σ . However, this protein is not exclusive to MECs as ECs also labelled positively.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

The 14-3-3 protein family comprises seven isoforms (β , ϵ , η , γ , τ , σ and ζ) of 28–33 kDa proteins that are highly conserved and ubiquitously expressed (Tzivion et al., 2006). 14-3-3 isoforms interact with >200 proteins involved in numerous cell functions (Pozuelo Rubio et al., 2004) such as modulating signal transduction, the cell cycle, apoptosis, transcription, stress responses, and malignant transformation (Tzivion et al., 2006). The ability of 14-3-3 proteins to bind and regulate several oncogenic as well as various tumour suppressor gene products suggests they may have a potential role in tumorigenesis (Tzivion et al., 2006).

Of the 14-3-3 protein family, the σ isoform, also termed stratifin or human mammary epithelial marker (HME) 1, has been most directly linked to tumour development (Prasad et al., 1992; Ferguson et al., 2000; Wang et al., 2008). The expression of this isoform is mediated by p53 in response to DNA injury with the protein inhibiting mitosis by sequestering the cdc2–cyclin B1 complex in the cytoplasm and inhibiting its nuclear localisation (Hermeking et al., 1997; Chan et al., 1999). Both up-regulation of 14-3-3 σ expression (Shoji et al., 1994; Villaret et al., 2000; Guweidhi et al., 2004; Perathoner et al., 2005; Qi et al., 2005; Neupane and Korc, 2008; Wang et al., 2008) and down-regulation (Iwata et al., 2000; Vercoutter-Edouart et al., 2001; Lodygin et al., 2004; Moreira et al., 2004; Uchida et al., 2004; Mhawech et al., 2005; Bhawal

et al., 2008) have been described in tumours (Qi et al., 2005; Wang et al., 2008), and the protein also appears to specifically label epithelial cells (ECs) in normal canine tissue (Suárez-Bonnet et al., 2010).

In human breast cancer, 14-3-3 σ is predominantly down-regulated by CpG methylation (Ferguson et al., 2000; Umbricht et al., 2001; Jeronimo et al., 2008; Luo et al., 2009), and it has been proposed that it acts as both a tumour suppressor and a prognostic indicator (Simooka et al., 2004; Simpson et al., 2004). The protein is also a useful marker of myoepithelial cells (MECs) in normal mammary tissue as well as in benign and malignant breast tumours (Simpson et al., 2004; Leibl et al., 2005).

Canine mammary tumours (CMT) are the most common neoplasm of the bitch with approximately 40–50% exhibiting metastatic potential (Sorenmo, 2003). These tumours demonstrate significant morphological heterogeneity and, in addition to ECs, frequently present pleomorphic MECs (Misdorp et al., 1999). Given such protean morphology, proteins in addition to putative tumour suppressors, such as p63 and maspin, have been proposed as markers of MEC in both humans and dogs (Gama et al., 2003; Simpson et al., 2004; Espinosa de los Monteros et al., 2005; Leibl et al., 2005). Although there is no current consensus as to which is the most specific and sensitive marker, p63 protein appears to be the most reliable marker of MECs.

The objectives of this study were to examine the expression of 14-3-3 σ protein in normal, dysplastic and neoplastic canine mammary tissue, and to assess the capacity of this protein to act as marker of MECs.

* Corresponding author. Tel.: +34 928 451095.

E-mail address: asuarez@becarios.ulpgc.es (A. Suárez-Bonnet).

Materials and methods

Case selection

Eighty-two mammary tissue samples (4 normal; 16 and 62 exhibiting benign and malignant neoplasms, respectively), obtained from 82 dogs at either surgery or necropsy, were retrieved from the archives of the Institute of Animal Health at The University of Las Palmas de Gran Canaria. All samples had been fixed in 10% neutral buffered formalin and embedded in paraffin wax.

Haematoxylin and eosin stained sections were categorised by histopathological examination by three veterinary pathologists (PH, FR and AE) according to the World Health Organisation criteria (Misidorp et al., 1999). Normal and dysplastic mammary tissue (including epitheliosis, adenosis and duct ectasia), were found adjacent to neoplastic tissue in 49 and 23 of the samples, respectively (Table 1). Sections of lymph node were available for histopathological assessment in 19 dogs.

Immunohistochemical examinations

Tissue sections were labelled for 14-3-3 σ protein using a murine monoclonal antibody raised against recombinant 14-3-3 σ of human origin (clone 5D7, Santa Cruz Biotechnology). Tissue sections, 4 mm thick, were placed on Vectabond-coated slides (Sigma Diagnostics), de-paraffinated, rehydrated in a graded series of alcohol, and incubated with 3% hydrogen peroxidase in methanol for 30 min. The sections were then subjected to high-temperature antigen retrieval by placing in citrate buffer (pH 6.2) in a water bath at 95 °C for 25 min.

After cooling, the slides were covered with 10% normal rabbit serum in PBS for 30 min before incubation with the primary antibody diluted 1:50 for 18 h at 4 °C. The sections were then incubated with a 1:20 dilution of biotin-labelled rabbit anti-mouse secondary antibody (Dako) for 30 min followed by avidin–biotin–peroxidase complex (Dako) for 1 h. DAB chromogen (Sigma Diagnostics) diluted 1:10 in 0.05 M Tris containing 0.3% hydrogen peroxide, was applied to the slides for 1–2 min at 20–22 °C. Slides were then counterstained with Harris's haematoxylin. Use of normal human and canine skin samples and replacement of primary antibody with PBS, were used as positive and negative controls, respectively. Canine skin, visible in 65 of the mammary tissue sections under test, served as internal positive controls (Suárez-Bonnet et al., 2010).

Positive labelling, as indicated by brown cytoplasmic staining, was independently and semi-quantitatively scored by two of the authors (ASB and AE) by estimating the percentage (1, <5%; 2, 5–25%; 3, 25–50%; 4, >50%) and staining intensity (0, negative; +, weak; ++, moderate; +++, intense) of positive cells. A total score, ranging from 0 to 12, was calculated from these two parameters. Any statistical

significance in differences between the numbers of positively staining ECs and MECs in normal, dysplastic and neoplastic mammary tissues was assessed using the Mann–Whitney test and $P \leq 0.05$ was considered significant (Simpson et al., 2004; Sitek et al., 2009). All statistical tests were carried out using the SPSS program (version 12.0, SPSS Inc.).

Thirty-five samples that labelled positive for 14-3-3 σ were double-immunostained according to the manufacturer's protocol (EnVision Doublestain System, Dako) to determine if these cells were MECs. In addition to the 14-3-3 σ monoclonal antibody, as used above, a p63 monoclonal antibody (clone 4A4, Santa Cruz Biotechnology) at a 1:100 dilution was used. DAB was used as the chromogen for 14-3-3 σ as above and fast red as the indicator for p63. Normal canine skin served as a positive control for both antibodies. Negative controls were created by replacing the primary antibodies in each case with PBS.

Western blotting

Homogenates of 12 of the mammary tumours (1 benign; 11 malignant) and of two lymph nodes (one containing metastases and one without) were analysed by Western blotting. Samples were homogenised in 0.1% Triton X-100 plus protease inhibitors in 25 mM Tris (pH 7.5) using a dispersing instrument (Ultra Turrax, Rose Scientific Ltd.) and cell debris was removed by centrifugation. The Bradford method (BioRad) was used to determine protein concentrations. SDS–PAGE was used to extract 60–80 μ g of proteins prior to gels being transferred to nitrocellulose membranes (Pall Life Sciences). Protein transfer was confirmed by Ponceau Red staining (Sigma Diagnostics). The membranes were then 'blocked' with 5% powdered milk in Tris buffered saline Tween 20 (TBS-T) for 1 h at room temperature and then incubated with anti-14-3-3 σ antibody (clone 5D7, Santa Cruz Biotechnology) following the manufacturer's instructions.

After rinsing in TBS-T, the membranes were incubated with the appropriate secondary antibody for 1 h at room temperature. Finally, the blots were rinsed and visualised using Immun-Star WesternC and BioRad Chemi-Doc imaging system (BioRad).

Results

Immunohistochemical examinations

Table 1 summarises immunohistochemical labelling for 14-3-3 σ protein in the mammary tissue samples analysed. The protein

Table 1
Details of 14-3-3 σ protein expression in epithelial and myoepithelial cells in normal, dysplastic and neoplastic canine mammary tissue.

Histological diagnosis	No. of cases	Intensity of immunolabelling				Proportion of cells immunolabelling positively			
		–	+	++	+++	1 (<5%)	2 (5–25%)	3 (25–50%)	4 (>50%)
<i>Epithelial cells</i>									
Normal mammary gland	53	41	12	0	0	12	0	0	0
Mammary hyperplasia/dysplasia	23	15	4	3	1	4	2	2	0
<i>Benign tumours</i>									
Simple adenoma	6	2	4	0	0	3	1	0	0
Complex adenoma	6	0	4	2	0	0	5	1	0
Fibroadenoma	4	4	0	0	0	0	0	0	0
<i>Malignant tumours</i>									
Simple tubulopapillary carcinoma	18	3	4	7	4	1	3	7	4
Simple solid carcinoma	15	1	1	4	9	1	1	4	8
Complex carcinoma	15	3	8	3	1	7	1	3	1
Carcinoma in benign tumour	8	0	2	2	4	0	3	2	3
Carcinosarcoma	2	0	0	0	2	0	0	0	2
Anaplastic carcinoma	1	0	0	0	1	0	0	1	0
Lipid rich carcinoma	3	0	0	1	2	0	0	0	3
<i>Myoepithelial cells</i>									
Normal mammary gland	53	0	0	0	53	0	0	0	53
Mammary hyperplasia/dysplasia	23	2	1	6	14	0	0	14	7
<i>Benign tumours</i>									
Simple adenoma	6	0	0	1	5	0	1	2	3
Complex adenoma	6	0	1	2	3	1	4	0	1
Fibroadenoma	4	0	0	0	4	0	0	1	3
<i>Malignant tumours</i>									
Simple tubulopapillary carcinoma	18	5	2	4	7	2	1	6	4
Simple solid carcinoma	15	9	5	0	1	6	0	0	0
Complex carcinoma	15	0	3	4	8	0	10	2	3
Carcinoma in benign tumour	8	0	4	3	1	1	5	2	0
Carcinosarcoma	2	0	0	0	2	1	1	0	0
Anaplastic carcinoma	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Lipid rich carcinoma	3	1	0	1	1	2	0	0	0

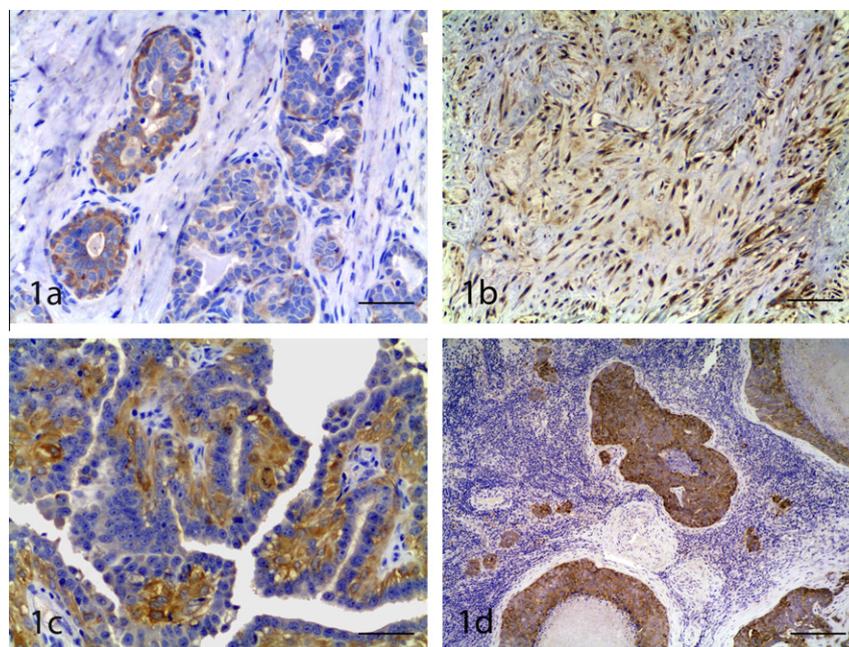


Fig. 1. Photomicrographs illustrating the immunohistochemical expression of 14-3-3 σ protein in: (a) normal canine mammary gland with positive labelling of myoepithelial cells (MECs) and no labelling of epithelial cells (ECs) adjacent to a glandular structure to the left of the image where ECs and MECs stain positively with intensity/proportion scores of +/1 and +++/4, respectively (scale bar, 50 μ m); (b) a complex canine mammary adenoma with intense staining of fusiform MECs and where ECs and MECs have intensity/proportion scores of +/2 and +++/4, respectively (scale bar, 100 μ m); (c) a simple canine tubulopapillary carcinoma exhibiting intense labelling of hypertrophic MECs. ECs and MECs have intensity/proportion scores of –/0 and +++/4, respectively (scale bar, 50 μ m); (d) a metastatic canine mammary tumour in a lymph node demonstrating intense staining of the neoplastic cells. ECs and MECs have intensity/proportion scores of +++/4 and –/0, respectively (scale bar, 250 μ m). Immunohistochemical labelling with haematoxylin counterstain.

was observed in the cytoplasm of all peri-ductular and peri-acinar MECs in normal mammary tissue. Isolated alveolar and ductular ECs were also positive in 12 cases (Fig. 1a). No differences were found in 14-3-3 σ expression in mammary tissue from the dogs that did not have tumours and in mammary tissue adjacent to where lesions were observed. Dysplastic lesions, such as adenosis and duct ectasia, exhibited 14-3-3 σ MEC immunostaining similar to that of normal mammary tissue. In four cases of mammary epitheliosis there was moderate to intense cytoplasmic staining in proliferating ECs. No labelling was detected in endothelial cells, fibroblasts, myofibroblasts, adipocytes or neurons.

All benign mammary tumours demonstrated 14-3-3 σ expression in normal, hypertrophic, fusiform, stellate and rounded forms of MECs (Table 1 and Fig. 1b). The fusiform, stellate and rounded MECs tended to have less intense cytoplasmic staining than the other forms. In 10 cases (62%), varying proportions of ECs were positive with varying degrees of cytoplasmic staining. Positive labelling was detected in 60 (96%) of malignant tumours with positive MECs and ECs found in 55 (88%) and 46 (74%) of these neoplasms, respectively.

Positively staining MECs exhibited varying degrees of de-differentiation (Fig. 1c) and occasional chondrocytes within tumours were also 14-3-3 σ positive. Increased numbers and intensity of cytoplasmic labelling of luminal ECs was a feature of tubulopapillary growths with subjacent, more intensely staining layers of MECs. In simple tubulopapillary carcinomas, non-neoplastic areas featured 14-3-3 σ positive MECs, while adjacent neoplastic ECs demonstrated moderate to intense staining. In most samples where tumour infiltration was detected, ECs were positive and, in general, cells undergoing mitosis exhibited moderate to intense cytoplasmic immunolabelling. In only two malignant tumours (one simple solid and one simple tubulopapillary carcinoma) were no positively staining cells observed.

Vascular invasion was evident in 15 carcinomas: 4 simple tubulopapillary; 8 simple solid; 2 lipid-rich, and 1 anaplastic.

Individual or groups (solid nests and tubular structures) of neoplastic cells were detected in lymphatics. Unequivocal 14-3-3 σ labelling was observed in 14/15 of such tumours and no cell staining was found in the remaining case. There was a significant difference in the expression of 14-3-3 σ between malignant MECs and ECs ($P \leq 0.001$; Table 2). Metastases to regional lymph nodes were detected in 13 carcinomas: 3 simple tubulopapillary; 6 simple solid; 2 lipid-rich; 1 anaplastic, and 1 complex. In 12 cases, moderate to intense labelling was observed in the metastatic cells (Fig. 1d) and when well differentiated (typically simple tubulopapillary growths), positive staining of both MECs and ECs could be discerned, although immunolabelling of the MECs was more intense.

Dual labelling for 14-3-3 σ and p63 was carried out in normal mammary tissue ($n = 2$), as well as in complex carcinomas ($n = 7$), simple tubulopapillary carcinomas ($n = 7$), simple solid carcinomas ($n = 15$), carcinomas in benign mixed tumours ($n = 3$) and carcinosarcomas ($n = 1$). Four cell types were identified based on this double immunostaining protocol: 14-3-3 σ +/p63 + cells

Table 2

Details of statistical analysis of 14-3-3 σ expression in epithelial (ECs) and myoepithelial (MECs) cells in normal, dysplastic and neoplastic canine mammary tissue. The mean \pm SD and median (P_{25} – P_{75}) semi-quantitative immunohistochemical (IHC) scores are presented for MECs and ECs in each case. NMG, normal mammary gland; MD, mammary dysplasia; BT, benign tumours; MT, malignant tumours.

Tissue sample	IHC score – MECs	IHC score – ECs	P value
NMG	12 \pm 0	0.32 \pm 0.67	<0.001
	12 (12–12)	0 (0–1)	
MD	7.9 \pm 3	1.1 \pm 2.2	<0.001
	9 (6–9)	0 (0–2)	
BT	8.3 \pm 4.1	1.4 \pm 1.7	<0.001
	8 (4–12)	1 (0–2)	
MT	3.9 \pm 4	6.1 \pm 4.6	<0.001
	3 (0–6)	6 (2–12)	

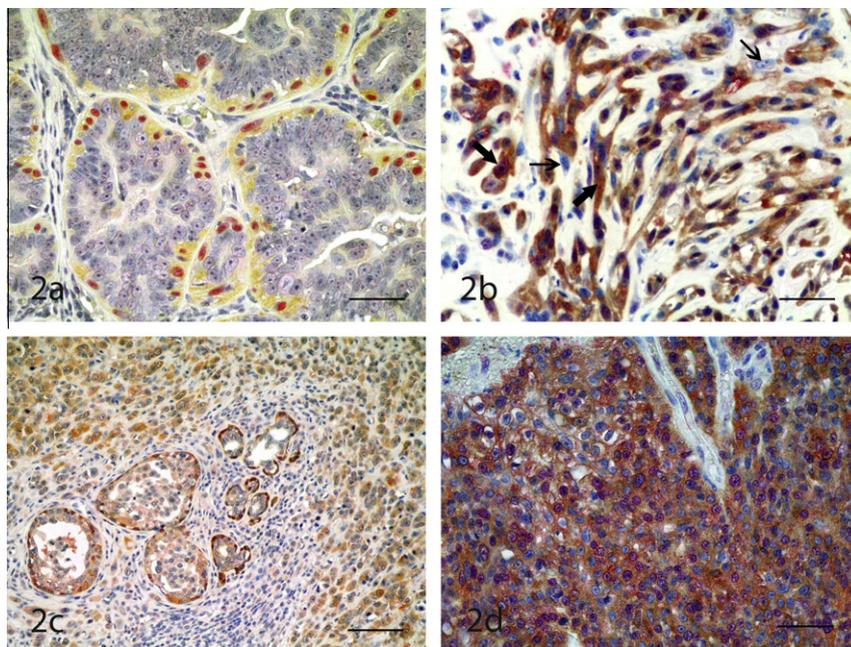


Fig. 2. Photomicrographs illustrating the immunohistochemical expression of both 14-3-3 σ and p63 proteins in: (a) a simple canine tubulopapillary carcinoma where 14-3-3 σ +/p63 + myoepithelial cells (MECs) surround 14-3-3 σ -/p63 - epithelial cells (ECs) (scale bar, 50 μ m); (b) a complex canine carcinoma demonstrating a region of 14-3-3 σ +/p63 + spindle- and stellate-shaped MECs (thick arrows). 14-3-3 σ -/p63 - cells also noted (thin arrows) (scale bar, 50 μ m); (c) an anaplastic carcinomatous area in a canine mammary tumour surrounding entrapped ductal structures. All infiltrating neoplastic cells are 14-3-3 σ +/p63 - ECs. Concomitant 14-3-3 σ and p63 expression is observed in the central glandular structures (scale bar, 100 μ m); (d) a simple solid canine carcinoma where abundant 14-3-3 σ +/p63 + cells indicates it is of myoepithelial origin. 14-3-3 σ +/p63 - cells are also observed (scale bar, 50 μ m). Cytoplasmic labelling for 14-3-3 σ protein is brown and nuclear p63 staining is red. Immunohistochemical labelling with haematoxylin counterstain.

(+/+); 14-3-3 σ +/p63 - cells (+/-); 14-3-3 σ -/p63 + cells (-/+); and 14-3-3 σ -/p63 - cells (-/-).

In normal mammary tissue, +/+ cells corresponded to MECs surrounding alveoli and ducts, while ECs and mesenchymal cells were -/-. In three simple tubulopapillary carcinomas, +/+ cells formed a monolayer around neoplastic -/- ECs (Fig. 2a). The remaining four simple tubulopapillary tumours and all of the complex carcinomas demonstrated three cell populations: +/+ MECs, +/- and -/- cells (Fig. 2b and c). The latter two cell types were identified morphologically as either ECs or MECs. Carcinomas within benign tumours exhibited the same three cell types and chondroblasts within tumours were either +/-, -/+ or -/-. The carcinosarcoma examined contained +/- cells in its carcinomatous regions and -/- cells sarcomatous areas. A diffuse population of +/+ cells was observed in 9/15 simple solid carcinomas (Fig. 2d), while the six remaining cases contained a diffuse, homogeneous population of +/- cells. In eight cases where lymphatic and/or vascular invasion was noted, neoplastic emboli consisted predominantly of +/- cells with occasional isolated +/+ cells.

Western blotting

The anti-human 14-3-3 σ monoclonal antibody recognised the 37 kDa polypeptide in all of the canine mammary tumours and in the single lymph node sample containing a metastasis that was examined (Fig. 1d). No immunolabelling was found in a lymph node from a dog with a simple tubulopapillary carcinoma that did not contain metastases (Fig. 3).

Discussion

Although the role of 14-3-3 σ in human breast carcinoma has been investigated (Prasad et al., 1992; Ferguson et al., 2000; Umbricht et al., 2001; Vercoutter-Edouart et al., 2001; Simooka et al., 2004; Simpson et al., 2004; Leibl et al., 2005; Mhaweck

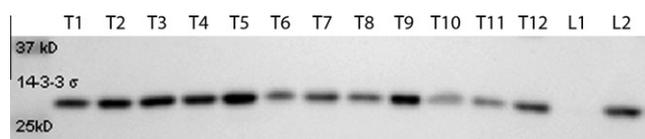


Fig. 3. Western blot illustrating 14-3-3 σ homogenates derived from canine mammary tumours and a metastatic lesion within a draining lymph node. Protein bands corresponding to 12 primary tumours (T1-T12) and the metastatic neoplasm (L2) react positively with anti-human 14-3-3 σ monoclonal antibody. L2 corresponds to the immunohistochemical sample shown in Fig. 1d. L1 represents lymph node where no tumour was observed microscopically and was negative for 14-3-3 σ protein.

et al., 2005; Moreira et al., 2005; Jeronimo et al., 2008; Martínez-Galán et al., 2008; Luo et al., 2009), most of these studies have focussed on the epigenetic silencing of the 14-3-3 σ gene. Few immunohistochemical studies have assessed if modifications in 14-3-3 σ protein expression occur in neoplastic mammary tissue (Simooka et al., 2004; Simpson et al., 2004; Mhaweck et al., 2005; Moreira et al., 2005), and, to the authors' knowledge, this is the first immunohistochemical study of this protein in canine mammary tumours.

In the normal human mammary gland, 14-3-3 σ protein has been detected immunohistochemically in both MECs and ECs, with cytoplasmic staining being typically more intense in the former cell type (Simooka et al., 2004; Mhaweck et al., 2005; Moreira et al., 2005). The fact that Simpson et al. (2004) reported that only MECs stained positively for this protein may reflect differences in the immunohistochemical techniques and antibodies used in that study. Our results support the findings of previous studies in both humans and dogs indicating that 14-3-3 σ protein is particularly expressed by MECs in normal and dysplastic mammary tissue, while ECs occasionally label positively for this antigen (Mhaweck et al., 2005; Moreira et al., 2005; Suárez-Bonnet et al., 2010).

We observed 14-3-3 σ protein in 78 (97%) of the tumours examined. Positive labelling was observed in the myoepithelium of 100% of benign and 77% of malignant tumours, and in the ECs of 62% of benign and of 88% of malignant neoplasms, respectively. Our immunohistochemical findings were supported by Western blotting in that all tissue samples containing primary tumours, and the lymph node containing metastases, demonstrated intense 14-3-3 σ expression. Furthermore, the identification of a specific 30 kDa protein band in the Western blots highlighted the degree of cross-reactivity between the human and canine protein, justifying the use of the monoclonal antibody in this study (Ramos-Vara et al., 2008). In contrast to our results, the absence of 14-3-3 σ has been reported in a large percentage of human breast tumours (Simooka et al., 2004; Simpson et al., 2004; Mhawech et al., 2005).

This discrepancy could be explained by the fact that most human breast carcinomas originate from luminal epithelial cells, and consistently exhibit an epithelial phenotype in terms of their expression of cytokeratin and other markers (Taylor-Papadimitriou and Lane, 1987; Lakhani and O'Hare, 2001). Furthermore, where 14-3-3 σ was not detected in human breast carcinomas, the constituent ECs were used as controls (Prasad et al., 1992; Nacht et al., 1999; Ferguson et al., 2000), were derived from cultures of unsorted normal epithelium, and were predominantly myoepithelial in phenotype (O'Hare et al., 1991; Page et al., 1999; DiRenzo et al., 2002). Consequently, the expression of molecules preferentially expressed in MECs appeared to be down-regulated in breast carcinomas when compared to ECs.

Given that canine mammary tumours are frequently characterised by MEC proliferation (Misdorp et al., 1999), antigens preferentially expressed in such cells do not appear to be down-regulated. Other putative tumour suppressor genes, such as p63 and maspin, are selectively expressed in mammary MECs and despite their description as tumour suppressors, have been detected in 90% (Gama et al., 2003) and 98% (Espinosa de los Monteros et al., 2005) of canine mammary neoplasms, respectively. The frequently reported absence of 14-3-3 σ protein in human breast tumours (Ferguson et al., 2000; Umbricht et al., 2001; Simooka et al., 2004; Mhawech et al., 2005), has been questioned by Moreira et al. (2005) who found that only 9/105 primary breast carcinomas demonstrated reduced expression of this antigen. These contrasting findings highlight the fact that the true role of this gene and its protein product in human breast cancer remains to be elucidated.

The 14-3-3 σ protein has been described as a valuable myoepithelial marker in human mammary tissue (Simpson et al., 2004; Leibl et al., 2005). In our study, double immunostaining of tissues for 14-3-3 σ and the MEC specific marker p63, confirmed that 14-3-3 σ is a highly sensitive marker of MECs since all p63 positive cells were also positive for 14-3-3 σ . In nine simple solid carcinomas, co-expression of 14-3-3 σ and p63 indicated that the myoepithelial component of these tumours was not always identified by routine histopathology, as has previously been highlighted using various MEC markers (Gama et al., 2003; Martín de las Mulas et al., 2004; Espinosa de los Monteros et al., 2005).

In consequence, we recommend the inclusion of 14-3-3 σ , in the immunohistochemical investigation of both normal and neoplastic canine mammary tissues. Interestingly, there is conflicting evidence as to whether or not the Δ Np63 isoform of p63 suppresses 14-3-3 σ protein expression (Westfall et al., 2003; Moreira et al., 2004, 2005). Although the antibody used in our study labels both isoforms of p63, the distinct populations of cells identified by double immunostaining, and the lack of +/- chondroblasts could be due to a specific p63 isoform as studies have demonstrated an antagonistic interaction between the 14-3-3 σ and p63 gene products during cell differentiation (Sniezek et al., 2002). The co-expression of Δ Np63 and 14-3-3 σ in canine mammary tissue thus merits further investigation.

Our study has identified a neoplastic EC population that is p63-negative but strongly expresses 14-3-3 σ protein, clearly indicating that 14-3-3 σ is not an exclusive MEC marker. These findings are inconsistent with the purported role of 14-3-3 σ as a tumour suppressor (Moreira et al., 2004), although deregulation of 14-3-3 σ expression has been observed in a wide variety of human cancers with both reduced (Iwata et al., 2000; Vercoutter-Edouart et al., 2001; Lodygin et al., 2004; Moreira et al., 2004; Uchida et al., 2004; Mhawech et al., 2005; Bhawal et al., 2008) and elevated (Shoji et al., 1994; Villaret et al., 2000; Guweidhi et al., 2004; Perathoner et al., 2005; Qi et al., 2005; Neupane and Korc, 2008; Wang et al., 2008) levels of 14-3-3 σ expression. Furthermore, intense expression of this protein was associated with mitotic figures and with neoplastic infiltrations and emboli in our study.

A previous finding that supports our results is the fact that concomitant over-expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and 14-3-3 σ have been observed in human pancreatic cancer (Neupane and Korc, 2008). These authors linked 14-3-3 σ with enhanced cell motility and a dramatic increase in epidermal growth factor-stimulated invasiveness (Neupane and Korc, 2008). Given that over-expression of EGFR has also been reported in canine mammary tumours (Gama et al., 2009), similar interaction with 14-3-3 σ may be a feature of this form of neoplasia in the dog.

The fact that 14-3-3 σ is secreted into the extracellular milieu suggests this protein may have a role in autocrine or paracrine signalling (Ghahary et al., 2004, 2005; Medina et al., 2007), a hypothesis supported by the finding that, on its secretion by keratinocytes, matrix metalloproteinase (MMP) expression is activated in dermal fibroblasts (Ghahary et al., 2004, 2005; Medina et al., 2007). Moreover, fibroblasts treated with exogenous recombinant 14-3-3 σ produce increased amounts of MMPs. Given the ability of MMPs to degrade collagen and promote tumour invasion in dogs (Hirayama et al., 2002), secreted 14-3-3 σ may play a key role in enhancing the spread of mammary neoplasms.

Conclusions

The findings of this study indicate that 14-3-3 σ protein is present in both normal and neoplastic canine mammary tissue, with particular, albeit not exclusive, expression of this antigen in MECs. Our results suggest 14-3-3 σ may have a role in enhancing the invasive capacity of canine mammary tumours and we propose that further investigation of this protein is merited as a potentially novel prognostic biomarker and as a therapeutic target.

Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgments

This manuscript is dedicated to the memory of Esteban L. Suárez-López, a gentleman, man of science, and loving father. The authors wish to thank Dr. Miguel García Bello from the Investigation Unit of the Dr. Negrín University Hospital for his help with the statistical analysis.

References

- Bhawal, U.K., Sugiyama, M., Nomura, Y., Kuniyasu, H., Tsukinoki, K., 2008. Loss of 14-3-3 sigma protein expression and presence of human papillomavirus type 16 E6 in oral squamous cell carcinoma. Archives of Otolaryngology-Head and Neck Surgery 134, 1055–1059.

- Chan, T.A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1999. 14-3-3 sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* 401, 616–620.
- DiRenzo, J., Signoretti, S., Nakamura, N., Rivera-Gonzalez, R., Sellers, W., Loda, M., Brown, M., 2002. Growth factor requirements and basal phenotype of an immortalized mammary epithelial cell line. *Cancer Research* 62, 89–98.
- Espinosa de los Monteros, A., Millán, M.Y., Ramírez, G.A., Ordás, J., Reymundo, C., Martín de las Mulas, J., 2005. Expression of maspin in mammary gland tumors of the dog. *Veterinary Pathology* 42, 250–257.
- Ferguson, A.T., Evron, E., Umbricht, C.B., Pandita, T.K., Chan, T.A., Hermeking, H., Marks, J.R., Lambers, A.R., Futreal, P.A., Stampfer, M.R., Sukumar, S., 2000. High frequency of hypermethylation at the 14-3-3 sigma locus leads to gene silencing in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97, 6049–6054.
- Gama, A., Alves, A., Gartner, F., Schmitt, F., 2003. p63: a novel myoepithelial cell marker in canine mammary tissues. *Veterinary Pathology* 40, 412–420.
- Gama, A., Gartner, F., Alves, A., Schmitt, F., 2009. Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in canine mammary tissues. *Research in Veterinary Science* 87, 432–437.
- Ghahary, A., Karimi-Busheri, F., Marcoux, Y., Li, Y., Tredget, E.E., Taghi Kilani, R., Li, L., Zheng, J., Karami, A., Keller, B.O., Weinfeld, M., 2004. Keratinocyte-releasable stratifin functions as a potent collagenase-stimulating factor in fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology* 122, 1188–1197.
- Ghahary, A., Marcoux, Y., Karimi-Busheri, F., Li, Y., Tredget, E.E., Kilani, R.T., Lam, E., Weinfeld, M., 2005. Differentiated keratinocyte-releasable stratifin (14-3-3 σ) stimulates MMP-1 expression in dermal fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology* 124, 170–177.
- Guweidhi, A., Kleeff, J., Giese, N., El Fitori, J., Ketterer, K., Giese, T., Büchler, M.W., Korc, M., Friess, H., 2004. Enhanced expression of 14-3-3 sigma in pancreatic cancer and its role in cell cycle regulation and apoptosis. *Carcinogenesis* 25, 1575–1585.
- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T.C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1997. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Molecular Cell* 1, 3–11.
- Hirayama, K., Yokota, H., Onai, R., Kobayashi, T., Kumata, T., Kihara, K., Okamoto, M., Sako, T., Nakade, T., Izumisawa, Y., Taniyama, H., 2002. Detection of matrix metalloproteinases in canine mammary tumours: analysis by immunohistochemistry and zymography. *Journal of Comparative Pathology* 127, 249–256.
- Iwata, N., Yamamoto, H., Sasaki, S., Itoh, F., Suzuki, H., Kikuchi, T., Kaneto, H., Iku, S., Ozeki, I., Karino, Y., Satoh, T., Toyota, J., Satoh, M., Endo, T., Imai, K., 2000. Frequent hypermethylation of CpG islands and loss of expression of the 14-3-3 sigma gene in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 19, 5298–5302.
- Jeronimo, C., Monteiro, P., Henrique, R., Dinis-Ribeiro, M., Costa, I., Costa, V.L., Filipe, L., Carvalho, A.L., Hoque, M.O., Pais, I., Leal, C., Teixeira, M.R., Sidransky, D., 2008. Quantitative hypermethylation of a small panel of genes augments the diagnostic accuracy in fine-needle aspirate washings of breast lesions. *Breast Cancer Research and Treatment* 109, 27–34.
- Lakhani, S.R., O'Hare, M.J., 2001. The mammary myoepithelial cell—Cinderella or ugly sister? *Breast Cancer Research* 3, 1–4.
- Leibl, S., Gogg-Kammerer, M., Sommersacher, A., Denk, H., Moinfar, F., 2005. Metaplastic breast carcinomas: are they of myoepithelial differentiation? Immunohistochemical profile of the sarcomatoid subtype using novel myoepithelial markers. *The American Journal of Surgical Pathology* 29, 347–353.
- Lodygin, D., Diebold, J., Hermeking, H., 2004. Prostate cancer is characterized by epigenetic silencing of 14-3-3 sigma expression. *Oncogene* 23, 9034–9041.
- Luo, J., Feng, J., Lu, J., Wang, Y., Tang, X., Xie, F., Li, W., 2009. Aberrant methylation profile of 14-3-3 sigma and its reduced transcription/expression levels in Chinese sporadic female breast carcinogenesis. *Medical Oncology*. doi:10.1007/s12032-009-9287-8.
- Martín de las Mulas, J., Reymundo, C., Espinosa de los Monteros, A., Millán, Y., Ordás, J., 2004. Calponin expression and myoepithelial cell differentiation in canine, feline and human mammary simple carcinomas. *Veterinary and Comparative Oncology* 2, 24–35.
- Martínez-Galán, J., Torres, B., Del Moral, R., Muñoz-Gámez, J.A., Martín-Oliva, D., Villalobos, M., Núñez, M.I., Luna, J.D., Oliver, F.J., de Almodóvar, J.M., 2008. Quantitative detection of methylated ESR1 and 14-3-3-sigma gene promoters in serum as candidate biomarkers for diagnosis of breast cancer and evaluation of treatment efficacy. *Cancer Biology and Therapy* 7, 958–965.
- Medina, A., Ghaffari, A., Kilani, R.T., Ghahary, A., 2007. The role of stratifin in fibroblast-keratinocyte interaction. *Molecular and Cellular Biochemistry* 305, 255–264.
- Mhawech, P., Benz, A., Cerato, C., Greloz, V., Assaly, M., Desmond, J.C., Koeffler, H.P., Lodygin, D., Hermeking, H., Herrmann, F., Schwaller, J., 2005. Downregulation of 14-3-3 sigma in ovary, prostate and endometrial carcinomas is associated with CpG island methylation. *Modern Pathology* 18, 340–348.
- Misdorp, W., Else, R.W., Hellmén, E., Lipscomb, T.P., 1999. Histological classification of the mammary tumours of the dog and the cat. In: Shulman, F.I. (Ed.), *World Health Organization International Histologic Classification of Tumours of Domestic Animals*. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, USA, pp.16–29.
- Moreira, J.M., Gromov, P., Celis, J.E., 2004. Expression of the tumor suppressor protein 14-3-3 sigma is down-regulated in invasive transitional cell carcinomas of the urinary bladder undergoing epithelial-to-mesenchymal transition. *Molecular and Cellular Proteomics* 3, 410–419.
- Moreira, J.M., Ohlsson, G., Rank, F.E., Celis, J.E., 2005. Down-regulation of the tumor suppressor protein 14-3-3 sigma is a sporadic event in cancer of the breast. *Molecular and Cellular Proteomics* 4, 555–569.
- Nacht, M., Ferguson, A.T., Zhang, W., Petroziello, J.M., Cook, B.P., Gao, Y.H., Maguire, S., Riley, D., Coppola, G., Landes, G.M., Madden, S.L., Sukumar, S., 1999. Combining serial analysis of gene expression and array technologies to identify genes differentially expressed in breast cancer. *Cancer Research* 59, 5464–5470.
- Neupane, D., Korc, M., 2008. 14-3-3 sigma Modulates pancreatic cancer cell survival and invasiveness. *Clinical Cancer Research* 14, 7614–7623.
- O'Hare, M.J., Ormerod, M.G., Monaghan, P., Lane, E.B., Gusterson, B.A., 1991. Characterization in vitro of luminal and myoepithelial cells isolated from the human mammary gland by cell sorting. *Differentiation* 46, 209–221.
- Page, M.J., Amess, B., Townsend, R.R., Parekh, R., Herath, A., Brusten, L., Zvebil, M.J., Stein, R.C., Waterfield, M.D., Davies, S.C., O'Hare, M.J., 1999. Proteomic definition of normal human luminal and myoepithelial breast cells purified from reduction mammoplasties. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96, 12589–12594.
- Perathoner, A., Pirkebner, D., Brandacher, G., Spizzo, G., Stadlmann, S., Obrist, P., Margreiter, R., Amberger, A., 2005. 14-3-3 sigma expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients. *Clinical Cancer Research* 11, 3274–3279.
- Pozuelo Rubio, M., Geraghty, K.M., Wong, B.H., Wood, N.T., Campbell, D.G., Morrice, N., Mackintosh, C., 2004. 14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation, and trafficking. *Biochemical Journal* 379, 395–408.
- Prasad, G.L., Valverius, E.M., McDuffie, E., Cooper, H.L., 1992. Complementary DNA cloning of a novel epithelial cell marker protein, HME1, that may be down-regulated in neoplastic mammary cells. *Cell Growth and Differentiation* 3, 507–513.
- Qi, W., Liu, X., Qiao, D., Martinez, J.D., 2005. Isoform-specific expression of 14-3-3 proteins in human lung cancer tissues. *International Journal of Cancer* 113, 359–363.
- Ramos-Vara, J.A., Kiupel, M., Baszler, T., Bliven, L., Brodersen, B., Chelack, B., Czub, S., Del Piero, F., Dial, S., Ehrhart, E.J., Graham, T., Manning, L., Paulsen, D., Valli, V.E., West, K., 2008. American association of veterinary laboratory diagnosticians subcommittee on standardization of immunohistochemistry suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20, 393–413.
- Shoji, M., Kawamoto, S., Setoguchi, Y., Mochizuki, K., Honjoh, T., Kato, M., Hashizume, S., Hanagiri, T., Yoshimatsu, T., Nakanishi, K., 1994. The 14-3-3 protein as the antigen for lung cancer-associated human monoclonal antibody AE6F4. *Human Antibodies and Hybridomas* 5, 123–130.
- Simooka, H., Oyama, T., Sano, T., Horiguchi, J., Nakajima, T., 2004. Immunohistochemical analysis of 14-3-3 sigma and related proteins in hyperplastic and neoplastic breast lesions, with particular reference to early carcinogenesis. *Pathology International* 54, 595–602.
- Simpson, P.T., Gale, T., Reis-Filho, J.S., Jones, C., Parry, S., Steele, D., Cossu, A., Budroni, M., Palmieri, G., Lakhani, S.R., 2004. Distribution and significance of 14-3-3 sigma, a novel myoepithelial marker, in normal, benign, and malignant breast tissue. *The Journal of Pathology* 202, 274–285.
- Sitek, B., Sips, B., Alkatout, I., Poschmann, G., Stephan, C., Schulenberg, T., Marcus, K., Lüttges, J., Dittert, D.D., Baretton, G., Schmiegel, W., Hahn, S.A., Klöppel, G., Meyer, H.E., Stühler, K., 2009. Analysis of the pancreatic tumor progression by a quantitative proteomic approach and immunohistochemical validation. *Journal of Proteome Research* 8, 1647–1656.
- Snizek, J.C., Matheny, K.E., Burkey, B.B., Netterville, J.L., Pietenpol, J.A., 2002. Expression of p63 and 14-3-3 sigma in normal and hyperdifferentiated mucosa of the upper aerodigestive tract. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 126, 598–601.
- Sorenmo, K., 2003. Canine mammary gland tumors. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 33, 573–596.
- Suárez-Bonnet, A., Martín de las Mulas, J., Herráez, P., Rodríguez, F., Espinosa de los Monteros, A., 2010. Immunohistochemical localisation of 14-3-3 sigma protein in normal canine tissues. *The Veterinary Journal* 185, 218–221.
- Taylor-Papadimitriou, J., Lane, E.B., 1987. Keratin expression in the mammary gland. In: Neville, M.C., Daniel, C.W. (Eds.), *The Mammary Gland: Development, Regulation and Function*. Plenum, New York, USA, pp. 181–215.
- Tzivion, G., Gupta, V.S., Kaplun, L., Balan, V., 2006. 14-3-3 proteins as potential oncogenes. *Seminars in Cancer Biology* 16, 203–213.
- Uchida, D., Begum, N.M., Almofti, A., Kawamata, H., Yoshida, H., Sato, M., 2004. Frequent downregulation of 14-3-3 sigma protein and hypermethylation of 14-3-3 sigma gene in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *British Journal of Cancer* 91, 1131–1138.
- Umbricht, C.B., Evron, E., Gabrielson, E., Ferguson, A., Markes, J., Sukumar, S., 2001. Hypermethylation of 14-3-3 sigma (stratifin) is an early event in breast cancer. *Oncogene* 20, 3348–3353.
- Vercoutter-Edouart, A.S., Lemoine, J., Le Bourhis, X., Louis, H., Boilly, B., Nurcombe, V., Révillion, F., Peyrat, J.P., Hondermarck, H., 2001. Proteomic analysis reveals that 14-3-3 sigma is down-regulated in human breast cancer cells. *Cancer Research* 61, 76–80.
- Villaret, D.B., Wang, T., Dillon, D., Xu, J., Sivam, D., Cheever, M.A., Reed, S.G., 2000. Identification of genes overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma using a combination of complementary DNA subtraction and microarray analysis. *Laryngoscope* 110, 374–381.

- Wang, Z., Tropè, C.G., Suo, Z., Trøen, G., Yang, G., Nesland, J.M., Holm, R., 2008. The clinicopathological and prognostic impact of 14-3-3 sigma expression on vulvar squamous cell carcinomas. *BMC Cancer* 8, 308.
- Westfall, M.D., Mays, D.J., Sniezek, J.C., Pietenpol, J.A., 2003. The Δ Np63 α phosphoprotein binds the p21 and 14-3-3 σ promoters in vivo and has transcriptional repressor activity that is reduced by Hay-Wells syndrome-derived mutations. *Molecular and Cellular Biology* 23, 2264–2276.



Contents lists available at ScienceDirect

The Veterinary Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tvjl

Short Communication

Immunohistochemical localisation of 14-3-3 σ protein in normal canine tissuesAlejandro Suárez-Bonnet^{a,*}, Juana Martín de las Mulas^b, Pedro Herráez^a, Francisco Rodríguez^a, Antonio Espinosa de los Monteros^a^aUnit of Histology and Animal Pathology, Institute for Animal Health, Veterinary School, University of Las Palmas de Gran Canaria, Trasmontaña s/n, 35413 Arucas (Gran Canaria), Spain^bDepartment of Comparative Pathology, Veterinary School, University of Córdoba, Campus de Rabanales, 14014 Córdoba, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 12 May 2009

Keywords:

14-3-3 σ

Canine

Epithelial marker

Immunohistochemistry

Stratifin

ABSTRACT

The 14-3-3 σ protein, also called stratifin, belongs to the highly conserved family of 14-3-3 acid proteins, which are involved in the modulation of diverse signal transduction pathways. Loss of 14-3-3 σ expression has been observed in several types of human cancers, suggesting that it may have a role as a tumour suppressor gene. The 14-3-3 σ protein has been localised in normal human tissues exclusively in various epithelial cell types. The aim of the study was to investigate the expression and the distribution pattern of 14-3-3 σ by immunohistochemical analysis in normal canine tissues. Immunohistochemical expression of 14-3-3 σ was demonstrated in several normal canine tissues with some minor differences of distribution pattern compared with human tissues. It appears that 14-3-3 σ is a very specific epithelial cell marker in normal canine tissues.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The 14-3-3 proteins are members of a family of highly conserved, small, acid polypeptides of 28–33 kDa that are found in all eukaryotic species (Hermeking, 2003). They have a crucial role in a wide variety of cellular responses, including cell cycle progression, DNA damage checkpoints and apoptosis (Hermeking, 2003). Of the seven isoforms, 14-3-3 σ , also called stratifin, has been most directly linked to tumour development (Hermeking, 2003; Lodygin and Hermeking, 2006). It is a protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylase and endogenous inhibitor of protein kinase C (Ichimura et al., 1988).

The 14-3-3 σ protein is a cell regulator and causes G2/M arrest by sequestering the cdc2–cyclin B1 complex in the cytoplasm and preventing its nuclear localisation, which is required for progression through mitosis (Chan et al., 1999). Furthermore, 14-3-3 σ has been shown to bind to G1-specific cyclin-dependent kinase 2 (cdk2), suggesting that it may also regulate G1/S progression (Laronga et al., 2000). Loss of 14-3-3 σ expression results in malignant transformation in vitro and supports tumour formation in vivo, suggesting a role as a tumour suppressor gene (Hermeking, 2003; Lodygin and Hermeking, 2006).

In spite of the ubiquitous distribution of most of the 14-3-3 isoforms, the expression of 14-3-3 σ is restricted to epithelial cells and increases during epithelial differentiation (Hermeking, 2003). These findings prompted us to analyse the distribution of 14-3-3 σ protein in normal canine tissues. So far and to the best of our

knowledge, no previous assessment of 14-3-3 σ immunorepression in canine tissues has been reported.

Normal canine tissues were obtained from four necropsy cases (two males, two females). Both males and one female dog were euthanased because of traffic accidents and had multiple fractures, and the second female died during recovery following caesarean surgery.

For the immunohistochemical study, tissue sections were de-waxed in xylene, taken through ethanol, blocked for endogenous peroxidase in methanol (10 min), and subjected to a high-temperature antigen retrieval technique (3 min of pressure cooking in citrate buffer pH 6.0). A goat polyclonal antibody specific for the N-terminus of the 14-3-3 σ isoform (N-14; Santa Cruz Biotechnology; 1:60; 16 h at 4 °C) and the avidin–biotin–peroxidase complex (Vector Laboratories) were employed (Simpson et al., 2004). Human skin was used as positive control, whereas negative controls were obtained by omitting the primary antibody.

The immunohistochemical results are summarised in Table 1. 14-3-3 σ immunoreactive cells were found in different locations including the epidermis (Fig. 1a), sebaceous glands (Fig. 1b), salivary gland (Fig. 1c), oesophagus (Fig. 1d), gall bladder (Fig. 2a), urinary bladder (Fig. 2b), prostate gland (Fig. 2c), mammary gland (Fig. 2d and e) and pancreatic islets (Fig. 2f). The expression was restricted to cells of epithelial origin.

The 14-3-3 protein family acts as adaptors or ‘chaperone molecules’, which are able to move freely from the cytoplasm to the nucleus and vice versa, showing the dynamic role of these proteins in normal cells (Muslin et al., 1996). So far, the most common function of 14-3-3 proteins appears to be sequestration of proteins in

* Corresponding author. Tel.: +34 928 45 10 95; fax: +34 928 45 11 41.
E-mail address: asuarez@becarios.ulpgc.es (A. Suárez-Bonnet).

Table 1
Expression of 14-3-3 σ in normal canine tissues.

Tissue	Cytoplasm ^a	Nuclei ^a
<i>Skin</i>		
Epidermis/hair follicles	+++	–
<i>Sebaceous glands</i>		
Sebocytes	+	–
Reserve cells	+++	–
<i>Apocrine glands</i>		
Acini	+	–
Myoepithelium	++	–
<i>Digestive system</i>		
Oral cavity (Squamous epithelium)	+++	–
<i>Salivary glands</i>		
Acini	–	–
Myoepithelium	++	–/+
Ducts	+++	–
<i>Esophagus</i>		
Surface epithelium	+	+
Glands	+	–
<i>Stomach</i>		
Gastric pits	+	–
Corpus glands	–	–
Pyloric glands	–	–
<i>Intestine</i>		
Surface epithelium	–	–
Mucosal crypts	–	–
Brunner's glands	–	–
<i>Liver</i>		
Hepatocytes	–	–
Bile ducts	–	–
Gall bladder	++	–
<i>Pancreas</i>		
Acini	–	–
Ducts	–	–
Islet	+++	–
<i>Respiratory tract</i>		
<i>Trachea</i>		
Pseudostratified ciliated columnar epithelium	–	–
Basal cells	+	–
<i>Bronchi</i>		
Cylindrical ciliated epithelium	–	–
Basal cells	+	–
Alveolar epithelium	–	–
Glands	–	–
<i>Urinary tract</i>		
<i>Kidney</i>		
Ureter	+++	+
<i>Urinary bladder</i>		
Superficial cells	–/+	–
Basal cells	+++	+
Urethra	+++	+
<i>Endocrine glands</i>		
<i>Pituitary glands</i>		
Thyroid/parathyroid	–	–
<i>Adrenal gland</i>		
Cortex	–	–
Medulla	++	–
<i>Male genital</i>		
<i>Seminiferous tubules</i>		
Excretory ducts	–	–
Epididymis	–	–
<i>Prostate</i>		
Secretory cells	+	–
Ducts	+++	+
<i>Female genital</i>		
<i>Ovary</i>		
Surface epithelium	–	–
Rete ovarii	–	–
<i>Endometrium</i>		
Surface epithelium	+	–
Glands	+	–
Vagina (Squamous epithelium)	+++	–
<i>Mammary glands</i>		
Secretory cells ^b	+ // –/+	–
Myoepithelium	+++	–
Ducts	–/+	–

Table 1 (continued)

Tissue	Cytoplasm ^a	Nuclei ^a
<i>Nervous system</i>		
Cerebrum	–	–
Cerebellum	–	–
Ependymal cells	–	–

^a – = No stained cells; –/+ = solitary positive cells; + = faint reaction; ++ = medium reaction; +++ = strong reaction.

^b Lactating mammary gland, +; No-Lactating mammary gland, –/+.

the cytoplasm, leading to inhibition of their function (Hermeking, 2003). The 14-3-3 σ protein is a recently recognised tumour suppressor (Hermeking, 2003; Lodygin and Hermeking, 2006), the expression of which is down-regulated by CpG methylation in several types of human cancer (Hermeking, 2003; Lodygin and Hermeking, 2006). It is expressed in squamous epithelia in locations such as periductal and periglandular cells of various glands, and epithelial cells of the gastrointestinal tract, urinary tract and endometrium (Nakajima et al., 2003). Our findings indicate that 14-3-3 σ expression in normal canine tissues is generally similar to what has been described in humans. However, some minor differences in 14-3-3 σ expression between human and canine normal tissues were also observed.

In humans, the 14-3-3 σ protein has been detected by immunohistochemistry within the cytoplasm and nuclei of various cell types. Thus, strong immunoreactivity has been reported in the cytoplasm of epithelial cells of the skin, tongue, oesophagus, trachea, gall bladder, urinary bladder and cervix (Nakajima et al., 2003; Mhawech et al., 2005). Furthermore, a weak nuclear immunoreactivity has been reported in the epithelium of the oesophagus and tongue (Nakajima et al., 2003). In our study, canine skin, tongue, trachea, gall bladder, ureter, urinary bladder, urethra and vagina showed a pattern of reaction similar to those described in human tissues. However, the oesophageal epithelium showed a weak cytoplasmic immunostaining with an intense nuclear reaction in the basal cells.

In humans, 14-3-3 σ expression has been described in renal tubular epithelial cells (Nakajima et al., 2003; Mhawech et al., 2005). In contrast, 14-3-3 σ was apparently not expressed in canine kidneys. In the canine mammary gland, epithelial and myoepithelial cells were 14-3-3 σ positive with a predominant staining of the myoepithelial cells. Recently, 14-3-3 σ has been proposed as a novel and specific myoepithelial cell marker of the human mammary gland (Simpson et al., 2004). In contrast, other authors have described 14-3-3 σ immunoreaction within the cytoplasm of both luminal and myoepithelial cells of ducts and lobules with a stronger intensity in the myoepithelial cells (Simooka et al., 2004). Further studies are necessary to elucidate the real role of this protein in the canine mammary gland and its utility in the identification of myoepithelial cells.

Endocrine glands in humans show a complete lack of 14-3-3 σ expression (Nakajima et al., 2003). In canine tissues, a moderate and strong reaction was detected in the medulla of adrenal glands and in pancreatic islets, respectively. In the canine salivary gland, 14-3-3 σ was expressed in the simple cuboidal epithelium of ducts and myoepithelial cells, but glandular cells were totally negative. In human salivary glands, a similar pattern has been described with the exception of glandular cells, which expressed 14-3-3 σ at low levels (Nakajima et al., 2003). In the human prostate, 14-3-3 σ is expressed in periductal and periglandular cells (Nakajima et al., 2003) and luminal cells (Nakajima et al., 2003; Mhawech et al., 2005). In our study, no immunostaining was detected in periductal or periglandular cells and the immunoreaction was localised within the cytoplasm of both secretory and ductal cells with medium and intense intensity, respectively.

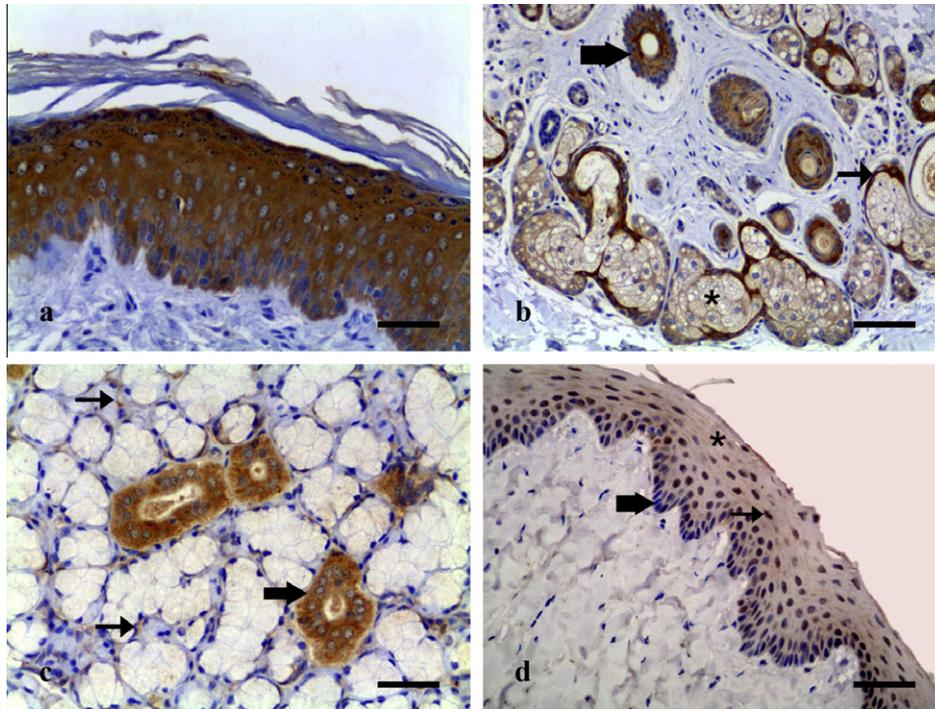


Fig. 1. Immunohistochemistry of 14-3-3 σ in normal canine tissues. (a) Skin. Strong reaction in all layers of the epidermis; bar = 50 μ m. (b) Skin appendages. Note the strong reaction in the reserve cells of the sebaceous glands (thin arrow) and in the cortex of hair follicles (arrow), and faint staining in sebaceous cells (asterisk); bar = 100 μ m. (c) Salivary gland. Epithelial cells of ducts (arrow) and myoepithelial cells (thin arrows) are homogeneously positives; bar = 50 μ m. (d) Oesophagus. Epithelial cells show faint reaction in the cytoplasm (asterisk) while nuclei are diffusely positive (thin arrow). Some nuclei of basal cells are negative (arrow); bar = 50 μ m. Avidin–biotin–peroxidase complex counterstained with Harris's haematoxylin.

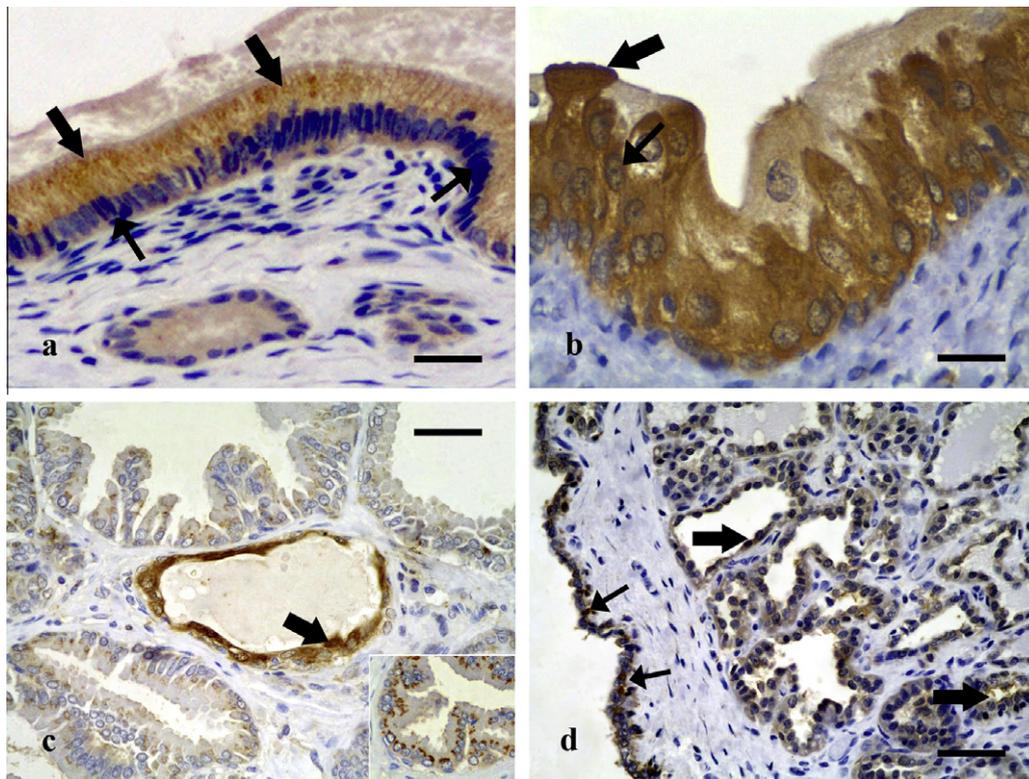


Fig. 2. Immunohistochemistry of 14-3-3 σ in normal canine tissues. (a) Gall bladder. Cytoplasmic expression in columnar epithelial cells (arrows). Nuclei were all negative (thin arrows); bar = 50 μ m. (b) Urinary bladder. Cytoplasmic expression in basal and umbrella intermediate cells (arrow). Note the expression in various nuclei (thin arrow); bar = 25 μ m. (c) Prostate gland. Cytoplasmic expression in ductal (arrow) and secretory cells (inset); bar = 50 μ m. (d) Lactating mammary gland. Positive luminal epithelial cells (arrows) and myoepithelial cells (thin arrows); bar = 50 μ m. (e) Non-lactating mammary gland. All the myoepithelial cells as well as sporadic and solitary luminal epithelial cells stain positive (thin arrow); bar = 50 μ m. (f) Adrenal gland. 14-3-3 σ immunoreactive cells of the medulla; bar = 100 μ m. Avidin–biotin–peroxidase complex counterstained with Harris's haematoxylin.

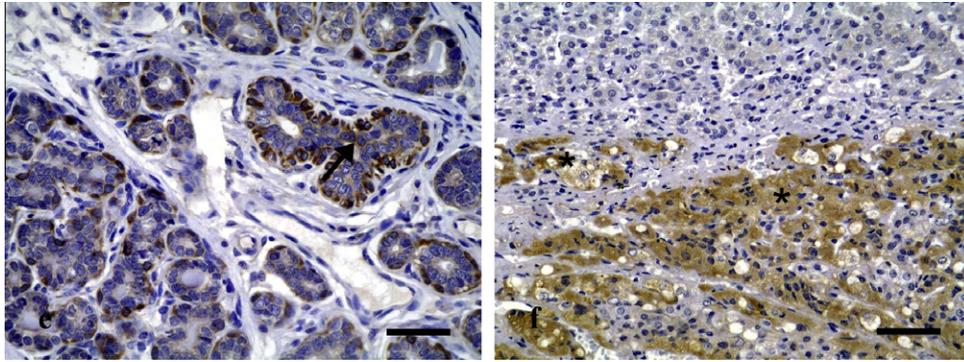


Fig. 2. (continued)

Conclusions

The 14-3-3 σ protein appears to be a specific epithelial cell marker of normal canine tissues with some minor differences in expression pattern compared to human tissues. Its expression by several cell types in different tissues suggests that it is involved in a variety of cellular processes in canine tissues. Like other epithelial markers, 14-3-3 σ may have a potential use in the differential diagnosis of neoplastic lesions. In humans, the cell marker has been proposed as a novel prognostic factor for cancer patients (Simpson et al., 2004) and it would be interesting to evaluate the expression of this protein in canine tumours also.

Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgement

The authors wish to thank Dr. Juan José Cabrera for giving us the human skin sample used as control in this study.

References

- Chan, T.A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1999. 14-3-3 sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* 401, 616–620.
- Hermeking, H., 2003. The 14-3-3 cancer connection. *Nature Reviews Cancer* 3, 931–943.
- Ichimura, T., Isobe, T., Okuyama, T., Takahashi, N., Araki, K., Kuwano, R., Takahashi, Y., 1988. Molecular cloning of cDNA coding for brain-specific 14-3-3 protein, a protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 7084–7088.
- Laronga, C., Yang, H.Y., Neal, C., Lee, M.H., 2000. Association of the cyclin-dependent kinases and 14-3-3 σ negatively regulates cell cycle progression. *Journal of Biological Chemistry* 275, 23106–23112.
- Lodygin, D., Hermeking, H., 2006. Epigenetic silencing of 14-3-3 sigma in cancer. *Seminars in Cancer Biology* 16, 214–224.
- Mhawech, P., Greloz, V., Assaly, M., Herrmann, F., 2005. Immunohistochemical expression of 14-3-3 sigma protein in human urological and gynecological tumors using a multi-tumor microarray analysis. *Pathology International* 55, 77–82.
- Muslin, A.J., Tanner, J.W., Allen, P.M., Shaw, A.S., 1996. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* 84, 889–897.
- Nakajima, T., Shimooka, H., Weixa, P., Segawa, A., Motegi, A., Jian, Z., Masuda, N., Ide, M., Sano, T., Oyama, T., Tsukagoshi, H., Hamanaka, K., Maeda, M., 2003. Immunohistochemical demonstration of 14-3-3 sigma protein in normal human tissues and lung cancers, and the preponderance of its strong expression in epithelial cells of squamous cell lineage. *Pathology International* 53, 353–360.
- Simooka, H., Oyama, T., Sano, T., Horiguchi, J., Nakajima, T., 2004. Immunohistochemical analysis of 14-3-3 sigma and related proteins in hyperplastic and neoplastic breast lesions, with particular reference to early carcinogenesis. *Pathology International* 54, 595–602.
- Simpson, P.T., Gale, T., Reis-Filho, J.S., Jones, C., Parry, S., Steele, D., Cossu, A., Budroni, M., Palmieri, G., Lakhani, S.R., 2004. Distribution and significance of 14-3-3 sigma, a novel myoepithelial marker, in normal, benign, and malignant breast tissue. *The Journal of Pathology* 202, 274–285.