

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS

DE GRAN CANARIA

Departamento de Patología animal,

Producción animal, Bromatología y

Tecnología de los alimentos

Facultad de Veterinaria



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA

TESIS DOCTORAL

Cirugía selectiva o “a la carta” como tratamiento de las neoplasias mamarias caninas.

Tesis doctoral presentada por **D^a Sara Ramos Vega**,
Licenciada en Veterinaria para optar al grado de Doctor.

DIRECTORES: Dr. Enrique Rodríguez Grau–Bassas

Dr. Antonio Rafael Espinosa de los Monteros y Zayas

Dr. Alejandro Suárez Bonnet



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA

Anexo II

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Departamento/Instituto/Facultad Departamento de Patología Animal, Producción animal, Bromatología y Tecnología de los alimentos.

Programa de doctorado Clínica e Investigación Terapéutica

Título de la Tesis

Cirugía selectiva o “a la carta” como tratamiento de las neoplasias mamarias caninas

Tesis Doctoral presentada por D/D^a. Sara Ramos Vega

Dirigida por el Dr/a. D/D^a. Enrique Rodríguez Grau-Bassas

Codirigida por el Dr/a. D/D^a. Antonio Rafael Espinosa de los Monteros y Zayas

Codirigida por el Dr/a. D/D^a. Alejandro Suárez Bonnet

El/la Director/a

(firma)

El/la Codirector/a

(firma)

El/la Codirector/a

(firma)

El/la Doctorando/a

(firma)

Las Palmas de Gran Canaria, a 18 de Noviembre de 2015

AGRADECIMIENTOS.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo nunca hubiese visto la luz sin la dirección, estímulo, consejos y desinteresada colaboración de las personas a las que deseo dejar constancia y mi más profundo agradecimiento.

En primer lugar agradecer a mi familia, por darme todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño constituyendo una fuente de apoyo constante e incondicional en todos mis proyectos e ilusiones.

Dedicar todo mi agradecimiento a mis directores de tesis, el Dr. Enrique Rodríguez Grau- Bassas, el Dr. Antonio Espinosa de los Monteros y Zayas y el Dr. Alejandro Suárez Bonnet por su orientación y ayuda en la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Enrique Rodríguez Grau-Bassas tengo muchas cosas que agradecerle y algunas van más allá de este mismo proyecto. Siempre ha estado detrás de cada paso que doy, enseñándome, aconsejándome y dedicando toda su capacidad y conocimiento. Gracias por su valiosa dirección y apoyo en los momentos difíciles, por ayudarme a concluir este proyecto que nos marcamos unos años atrás y sobre todo por despertar en mí el “gusanillo” de la investigación.

Al Dr. Antonio Espinosa de los Monteros y Zayas por su apoyo, orientación y rigor que me permitió un buen aprovechamiento en el trabajo realizado y que esta tesis llegara a buen término.

Al Dr. Alejandro Suárez Bonnet por su ayuda y colaboración sin ponerme nunca peros o darme negativas sino todo lo contrario.

A la Dra. María Dolores Fiuza Pérez por su inestimable ayuda con el método estadístico, y por pasar conmigo inmersa en gráficas, variables y números largas mañanas.

A todos mis amigos que, directa o indirectamente, han estado a mi lado durante todo este tiempo en el que me han ofrecido su amistad sin pedir nada a cambio. A todos gracias por creer en mí.

A Ago, mi compañero en la vida y mi punto de apoyo en todo momento. Ha entendido mi dedicación a la investigación y su motivación, amor y cariño han sido suficientes para seguir adelante cuando se presentaron las dificultades.

Por último, y por ello no menos importante agradecer a todos los propietarios de estos pacientes, que con su aportación también han contribuido en la realización de este estudio. Gracias por su amabilidad y buen hacer.

ÍNDICE.

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN	3
1.1.- Introducción General	3
1.2.- Antecedentes, aspectos comparativos y situación actual	3
2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
2.1.- Morfología de la glándula mamaria	9
2.1.1.- Embriología	9
2.1.2.- Anatomía	11
2.1.2.1.- Riego sanguíneo	11
2.1.2.2.- Drenaje linfático	12
2.1.3.- Histología	14
2.2.- Los tumores de mama en la especie canina	17
2.2.1.- Prevalencia	17
2.2.2.- Características histológicas	18
2.2.2.1.- Clasificación	19
2.2.3.- Factores de Riesgo	20
2.2.3.1.- Edad	20
2.2.3.2.- Sexo	21
2.2.3.3.- Raza/ predisposición genética	21
2.2.3.4.- Variables geográficas y medioambientales	22
2.2.3.5.- Hormonas	22
2.2.3.6.- Dieta y obesidad	24
2.2.4.- Signos clínicos	26
2.2.5.- Diagnóstico	27
2.2.5.1.- Historia clínica y examen clínico	27
2.2.5.2.- Pruebas complementarias	28
2.2.5.3.- Aspectos clinicopatológicos	28
2.2.5.4.- Diagnóstico citológico	29
2.2.6.- Estadificación	30
2.2.7.- Factores pronósticos	32
2.2.7.1.- Factores morfológicos clásicos	32
2.2.7.1.1.- Tamaño tumoral	32

2.2.7.1.2.- Estatus ganglionar	33
2.2.7.1.3.- Estadío tumoral.....	35
2.2.7.1.4.- Características histológicas	36
2.2.7.1.4.1.- Grado histológico de malignidad	36
2.2.7.1.4.2.- Grado de diferenciación nuclear	37
2.2.7.1.4.3.- Tipo histológico: clasificación histológica de los tumores mamarios caninos	37
2.2.7.1.4.4.- Infiltrado inflamatorio linfocitario.....	39
2.2.7.1.4.5.- El crecimiento infiltrante en tejidos vecinos (Invasión estromal)	40
2.2.7.1.4.6.- La presencia de émbolos de células neoplásicas (Invasión vascular)	41
2.2.7.2.- Factores pronósticos moleculares	41
2.2.7.2.1.- Receptores hormonales.....	42
2.2.7.2.2.- HER-2.....	43
2.2.7.2.3.- Tasa de proliferación de la neoplasia.....	44
2.2.7.2.4.- Gen supresor de tumor p53	45
2.2.7.2.5.- Ciclooxigenasa-2	45
2.2.7.2.6.- EGFR.....	46
2.2.7.2.7.- VEGF.....	46
2.2.7.2.8.- BRCA2.....	47
2.2.8.- Tratamiento	47
2.2.8.1.- Quirúrgico.....	47
2.2.8.2.- Tratamiento quimioterápico	51
2.2.8.3.- Desmopresina	53
2.2.8.4.- Inmunoterapia.....	54
2.2.8.5.- Terapia hormonal	54
2.2.8.6.- Radioterapia	57
2.2.8.7.- Inhibidores de COX-2	57
2.2.8.8.- Inhibidores tirosina quinasa	58
2.2.8.9.- Viroterapia oncolítica	59
2.2.8.10.- Estatinas.....	59
2.2.8.11.- Criterios para evaluar la respuesta al tratamiento	60
2.2.9.- Carcinoma inflamatorio de mama.....	61
3.- <u>JUSTIFICACIÓN</u>	65
3.1.-Justificación del estudio	65
4.- <u>OBJETIVOS</u>.....	69

5.- MATERIAL Y MÉTODO	73
5.1.- Diseño del estudio	73
5.2.- Método	74
5.2.1.- Procedimiento quirúrgico	74
5.2.1.1.- Planteamiento quirúrgico en el grupo A	74
5.2.1.2.- Planteamiento quirúrgico en el grupo B	75
5.2.2.- Estudio histológico postoperatorio	77
5.3.- Sistemas de información	78
5.4.- Análisis de datos y variables	79
5.5.- Análisis estadístico	80
6.- RESULTADOS	83
6.1.- Característica poblacional	83
6.2.- Edad	89
6.3.- Mortalidad	90
6.4.- Tamaño tumoral	92
6.5.- Metástasis a distancia y /o recidivas locales	94
6.6.- Equipos de cirujanos	96
6.7.- Supervivencia	98
7.- DISCUSIÓN	103
8.- CONCLUSIONES	115
9.- BIBLIOGRAFÍA	119

LISTADO DE ABREVIATURAS

ACVIM	Colegio Americano de Medicina Interna Veterinaria
AgNOR	región organizadora nucleolar argirófilas
AINE	antiinflamatorio no esteroideo
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BRCA2	gen del cáncer de mama-2
CCM	carcinoma complejo y mixto
CDKIs	inhibidores dependientes de ciclina quinasas
COX-2	ciclooxigenasa-2
CSS	carcinoma simple sólido
CSTP	carcinoma simple tubulopapilar
DMT	densidad microvascular intratumoral
EE	enfermedad estable
EGFR	receptores de factor de crecimiento epidérmico
FDA	Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos
GH	hormona del crecimiento
HER-1	factor de crecimiento epidermal humano-1
HER-2	factor de crecimiento epidérmico humano-2
IGF-1	factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1
ITK	inhibidor de tirosina-quinasa
LHRH	hormona liberadora de hormona luteinizante
LL	lateral izquierdo
L-MTP-PE	tripéptido fosfatidiletanolamina encapsulado en liposomas

OMS	Organización Mundial de la Salud
PCNA	antígeno nuclear de células en proliferación
PE	progresión de la enfermedad
RC	respuesta completa
RE	receptores de estrógenos
RECIST	criterios de evaluación de la respuesta en tumores sólidos
RG	respuesta global
RH	receptores hormonales
RL	lateral derecho
TAC	tomografía computerizada
TNF α	factor de necrosis tumoral α
TNM	tumor, linfonodo, metástasis
VCOG	Grupo de Oncología Cooperativa Veterinaria
VD	ventrodorsal
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular
VSSO	Veterinary Society of Surgical Oncology

INTRODUCCIÓN.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Introducción general

Los tumores de mama son las neoplasias más comunes en las hembras caninas enteras. La mayoría de los tumores mamarios en hembras caninas son de origen epitelial y aproximadamente el 50% se consideran malignos (*Misdorp y cols., 1999; Rutteman y cols., 2001*).

Los tumores de mama caninos tienen características epidemiológicas, clínicas, morfológicas y pronósticas similares al cáncer de mama humano (*Vail y cols., 2000*). Al igual que en las neoplasias mamarias humanas, el sistema linfático es la principal ruta de metástasis de los tumores de mama malignos en el perro (*Soremno y cols., 2003; Cassali y cols., 2011, Mohamed, 2011*), siendo las metástasis a distancia una causa común de muerte en estos pacientes (*Misdorp, 2002; Lana y cols., 2007; Klopffleisch y cols., 2011*).

1.2.- Antecedentes, aspectos comparativos y situación actual

El tratamiento de elección para los tumores de mama caninos es la cirugía, y puede ser curativo en pacientes con tumores benignos, tumores de bajo grado histológico o tumores pequeños de estadios tempranos sin metástasis (*MacEwen y cols., 1984; Allen y cols., 1989; Chang y cols., 2005; Marconato y cols., 2009; Nimwegen y cols., 2012; Soremno y cols., 2013*). En la actualidad las ventajas de escisión quirúrgica local versus escisión radical son debatidas (*MacEwen y cols., 1985, Stratmann y cols., 2008, Horta y cols., 2014*).

En medicina humana *William Halsted (1852-1922)*, uno de los pioneros de la cirugía moderna, basándose en la teoría de la diseminación centrífuga creía que la resección local podía curar el cáncer de mama y consideraba la reaparición del cáncer en otra localización como una enfermedad nueva. En 1889 describió la *mastectomía radical* con la que consiguió reducir la incidencia de recidiva local de un 56-81% al 6%, pero sin embargo la supervivencia a los 10 años sólo alcanzaba el 25% (*Halsted, 1894*). La técnica, que se convirtió en el tratamiento de elección hasta finales de los años setenta, consiste en la extirpación en bloque de la mama, los músculos pectorales mayor y menor y linfadenectomía completa de la axila y de las fosas supra e infraclavicular (*Halsted, 1984, 1989 y 1907*).

El desarrollo de técnicas quirúrgicas menos radicales se inició con la *mastectomía radical conservadora* (*Patey y Dyson, 1948*) que preserva el pectoral mayor. Se confirmó la ausencia de diferencias en supervivencia y recidiva local entre pacientes tratadas con mastectomía radical conservadora y tradicional (*Patey y Dyson, 1948*). En 1972 se

publicó el uso de la *mastectomía radical modificada* (Madden y cols., 1972) con preservación de pectoral mayor y menor, sin detrimento del resultado oncológico.

Crile extendió la idea de que no debía realizarse linfadenectomía axilar si no existía evidencia clínica de afectación ganglionar, tras lo que se difundió el uso de la *mastectomía simple* y se promovió el uso de resecciones más limitadas en casos muy seleccionados (Crile, 1961 y 1965). En 1969, Kaae y Johansen confirmaron las mismas tasas de supervivencia al comparar la mastectomía simple y modificada acompañada de radioterapia postoperatoria.

Ulteriormente, las *técnicas conservadoras* fueron ganando adeptos. Éstas consisten en una resección que se limita a la porción mamaria que contiene el tumor con un margen concéntrico de tejido sano (Schwartz y cols., 2006) permitiendo en muchos casos preservar la consistencia, forma y tamaño mamario, así como la sensibilidad local.

Existen semejanzas entre los tumores de mama humano y canino, como son morfología del tumor, pudiendo ser móvil o fijo, de aspecto sólido o quístico y de presentar rápido crecimiento e invasión en y a tejidos adyacentes como ocurre con los carcinomas, implicación de linfonodos axilares y esternales, la presencia de receptores de estrógeno, progesterona y de factor de crecimiento epidermal 2 (HER2) (Gama y cols., 2008), metástasis a órganos como hígado, cerebro y hueso (Gerald y cols., 2000) y la evolución clínica relacionada con la supervivencia de las pacientes en algunos casos (Peleteiro y cols., 1994; Bremmes y cols., 2002).

En el caso de la perra, la elección de la mejor técnica quirúrgica para el tratamiento de tumores de mama ha sido debatida extensamente. A pesar del conocimiento biológico de estos tumores, algunos autores han sugerido procedimientos quirúrgicos agresivos sin ventaja clínica, señalando la mastectomía radical como la mejor opción quirúrgica (Gilberston y cols., 1983). En el mismo año Brodley y cols. (1983) propusieron tratamientos individuales, donde el procedimiento quirúrgico se basaba en el drenaje linfático, localización, tamaño, número de lesiones y adherencia muscular o en piel. En un estudio prospectivo conducido por MacEwen y cols. (1985), no se halló ninguna diferencia entre la recidiva y el tiempo de supervivencia en mastectomía simple y mastectomía de cadena mamaria. Por el contrario, Stratmann y cols. (2008) aconsejan cirugía radical tras observar que en el 58% de perras con tumores mamarios a las que se les realiza mastectomía regional desarrollaron nuevos tumores en la misma cadena mamaria.

La opción de mejorar el pronóstico o la supervivencia del paciente haciendo cirugías más agresivas no ha sido demostrada. Según algunos de los autores citados anteriormente, una manera de prevenir la aparición de nuevos tumores es la mastectomía radical resecando la mama afectada por la neoplasia y las sanas como único bloque, o mediante mastectomía regional basada en el drenaje linfático de la

mama afectada (*Gilberston y cols., 1983; Stratmann y cols., 2008*). Si bien es cierto que el sistema linfático es considerado la principal ruta de metástasis para los carcinomas de mama en perros y en la mayoría de los casos el procedimiento quirúrgico se basa en el drenaje de la mama afectada, en un número variable de casos éste se ve alterado cuando hay neoplasia (*Pereira y cols., 2003 y 2008*), existiendo a veces implicación de linfonodos esternales e iliacos que son irreseccables en mastectomías más radicales (*Pereira y cols., 2003; Patsikas y cols., 2006*). Por otro lado las neoplasias mesenquimales en mama (sarcomas) cuya vía de diseminación es la hematógica y metastatizan a pulmón sin verse afectados en ocasiones los linfonodos superficiales (*Davidson, 2003*), hacen plantearse si cirugías tan agresivas resecando tejido sano ofrecen beneficio para el paciente, y valorar la importancia de la detección temprana de la lesión ya que en muchos de los casos se trata de lesiones preneoplásicas que no han malignizado (*Sorensen 2009, Cassali y cols., 2011*) o tumores “*de novo*” no relacionados con otros tumores extirpados anteriormente, y que al tratarlas con procedimientos quirúrgicos simples llevan a un mejor pronóstico (*Horta y cols., 2014*).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1.- Morfología de la glándula mamaria

La glándula mamaria es una glándula sudorípara apocrina modificada, únicamente presente en mamíferos, especializada en la producción de leche después de la gestación. Consiste en una red de ductos rodeados por un estroma fibrovascular rico en adipocitos. Las mamas solo adquieren su pleno desarrollo en las hembras, y su actividad periódica se supedita a los ritmos gestacionales. Con la gestación se produce una proliferación del tejido ductal, producción y secreción de leche por las células acinares, y al final de la lactación involución de los componentes secretores de la glándula con preservación de las estructuras ductales. 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 liberados desde los ovarios activan el desarrollo mamario, 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

Durante el desarrollo embrionario la primera manifestación de las glándulas mamarias se presenta en forma de dos engrosamientos epidérmicos longitudinales procedentes del ectodermo denominadas **banda mamaria** (Figura 1) que se extienden desde la región axilar a la región inguinal. Con la proliferación epitelial del centro longitudinal de cada banda se forma la **cresta mamaria** (Figura 1), la cual es más estrecha y saliente. Las crestas mamarias sufren un desplazamiento ventral con el crecimiento de la parte dorsal del tronco. Coincidiendo con este desplazamiento aparecen las **eminencias mamarias** (Figura 1), que se forman por multiplicación y concentración de las células epidérmicas de la cresta y condensación del mesénquima subyacente (*Sandoval, 2003*).

La condensación del epitelio de cada una de las eminencias invade el tejido dérmico subyacente, originándose la **yema mamaria** (Figura 1) que será la precursora de los brotes glandulares primarios. Ésta se transforma por ahuecamiento en *seno lactífero primitivo*, y posteriormente los cordones y brotes en *conductos lactíferos primarios y secundarios*. Simultáneamente en superficie se produce una intensa queratinización de la epidermis que originó la yema mamaria, cuyo centro será el *esbozo de la papila*

mamaria (Figura 2). Como contribución a la transformación de este *esbozo de papila mamaria* en papila mamaria definitiva, se produce la “eversión” cutánea del tejido cutáneo circundante.

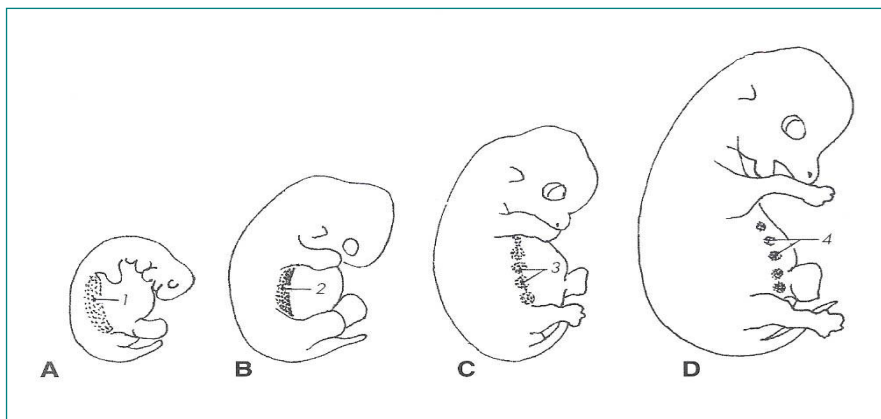


Figura 1. Embriología mamaria. Representación semi-esquemática de las primeras etapas del desarrollo prenatal (A-D) de las mamas. 1, banda mamaria; 2, cresta mamaria; 3, eminencias mamarias; 4, yemas mamarias. Nótese la posición de las eminencias y yemas respecto a la primitiva banda mamaria, debido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

Finalmente el tejido que rellena la papila termina canalizándose a partir de los senos lactíferos primitivos en varios conductos papilares que comunican con el exterior (Sandoval, 2003).

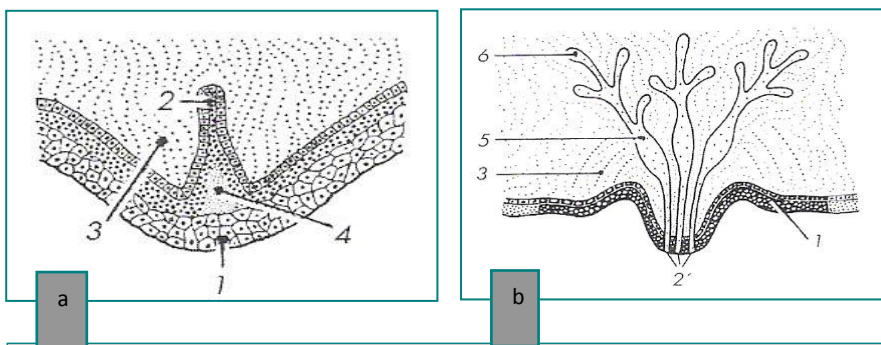


Figura 2. Secciones sagitales de dos etapas de la formación de la papila mamaria. a) Feto precoz. 1, epitelio del esbozo de la papila; 2, yema mamaria; 3, mesénquima areolar; 4, seno lactífero primitivo. b) Feto a término. 1, circunvolución cutánea; 2, conductos papilares; 3, mesénquima diferenciándose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

2.1.2.- Anatomía

Se trata de un paquete tubuloalveolar dividido en lóbulos por tejido conectivo interlobular. En perras la glándula mamaria se encuentra fijada por una extensión variable a la parte ventral de la pared torácica y la pared abdominal. La fijación de la glándula mamaria se produce por escisiones de las hojas superficiales y profundas de la fascia externa del tronco, que reciben el nombre de aparato suspensorio de las mamas (*Apparatus suspensorius mammarius*). El aparato suspensorio está formado por las láminas laterales (*Laminae laterales*) y las láminas mediales (*Laminae mediales*) elásticas, desde las cuales se originan otras más delgadas o laminillas suspensorias que penetran dentro del cuerpo glandular.

Las glándulas mamarias en la perra están formadas por una mitad derecha y otra izquierda que se extiende desde la pared torácica ventral hasta la región inguinal. Esta posición se denomina toracoinguinal. Por lo general en cada lado se desarrollan 5 complejos mamarios formados cada uno por 2 pares de mamas, que se denominan, según su ubicación, glándulas mamarias torácicas craneales y caudales (M1 y M2), mamas abdominales craneales y caudales (M3 y M4) y glándulas mamarias inguinales (M5) (*Miller y cols., 1964; Frandson y Spurgeon 1992; Silver IA 1966*). Cada complejo mamario presenta entre cinco y veinte unidades glandulares.

El componente epitelial de la glándula mamaria es mantenido por tejido mesenquimal y que incluye tejido conectivo fibroso, tejido adiposo, vasos sanguíneos y linfáticos y nervios. En algunas ocasiones se incluyen en el estroma histiocitos, mastocitos y células linfoides.

En esta región también encontramos dos músculos supramamarios 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 ilíaca; el músculo supramamario caudal se origina en los músculos de la vulva (*Sisson y Grossman, 1975; Sandoval, 2003*). Las mamas de cada cadena mamaria no se encuentran completamente separadas entre sí. La mama torácica craneal se encuentra separada de la mama torácica caudal, mientras que entre las mamas torácica caudal abdominal craneal y caudal e inguinal no existe separación física, sino que representan una continuidad morfológica en la misma cadena mamaria (*Withrow, 1975*).

2.1.2.1.- Riego sanguíneo

Diferentes arterias irrigan las glándulas mamarias. Las mamas torácicas craneal y caudal reciben sangre de la arteria epigástrica superficial craneal, de las ramas de la

torácica lateral y de la arteria intercostal (*Miller y cols., 1964; Silver 1966; Barone, 1990, 1996*).

Las glándulas abdominales craneales son irrigadas por la arteria epigástrica superficial craneal y por las ramas cutáneas de las arterias intercostales caudales. Las mamas abdominales caudales e inguinales son irrigadas por la arteria epigástrica craneal (ramas de las arterias pudenda externa). La vascularización se ve reforzada a las mamas abdominales lateralmente por las ramas cutáneas de las arterias frénico-abdominal y caudalmente por las ramas de la iliaca circunfleja profunda. Las dos arterias epigástricas se anastomosan en el ombligo, y algunos vasos pueden cruzar la línea media desde una mama hasta su par.

El drenaje venoso es paralelo al arterial. Pequeñas venas cruzan la línea media en mayor frecuencia que las arterias, y esto puede permitir que las neoplasias malignas aparezcan en el mismo par de mamas (*Silver, 1966*).

2.1.2.2.- Drenaje linfático

El sistema linfático es una entidad anatómica que juega un papel importante en el control local del tumor y en el transporte de células tumorales, representando la ruta más común de metástasis de neoplasias (*Hartveit, 1990; Rubert y cols., 1990; Patsikas y cols., 1996; Stewart y Lyster, 1997; Liu y Zhang, 1998; Haigh y Giuliano, 2000*).

El drenaje linfático de las glándulas mamarias no neoplásicas ha sido investigado mediante técnicas anatómicas y radiográficas, y los canales linfáticos y linfonodos han sido descritos con detalle. Cada glándula mamaria tiene su red de pequeños vasos linfáticos que drenan a vasos mayores y éstos, a su vez, a los linfonodos (*Miller y cols., 1964; Silver, 1966*).

En condiciones normales las glándulas mamarias torácicas craneales y caudales drenan al linfocentro axilar ipsilateral (el propio linfonodo y el linfonodo axilar accesorio si existe). Las glándulas mamarias abdominales craneales y caudales drenan al linfocentro inguinofemoral y las inguinales a linfocentro inguinofemoral y, en menor medida, a poplíteos (*Barone, 1990, 1996; Patsikas y Dessiris, 1996a, b; Pereira y cols., 2003, Patsikas y cols., 2006*) (Figura 3 y 4). Las glándulas mamarias abdominales craneales drenan también a los linfocentros axilar e inguinofemoral (*Barone, 1990, 1996; Patsikas y Dessiris, 1996a, b; Pereira y cols., 2003, Patsikas y cols., 2006*). Sin embargo *Patsikas y Dessiris (1996a, 1996b)* y posteriormente *Patsikas y cols. (2006)* defiende que el drenaje de las glándulas mamarias abdominales craneales se produce principalmente en el linfonodo axilar, mientras que *Barone (1996)* declara que el drenaje de dichas mamas se produce de igual manera en ambos linfocentros axilar e inguinofemoral.

De acuerdo con la literatura consultada, se han detectado variaciones en cuanto al patrón de drenaje de las mamas torácicas y abdominales. Así las mamas torácicas craneales drenan al linfocentro axilocervical y esternal (*Pereira y cols., 2008*). Las mamas abdominales caudales, a su vez, drenan a los nódulos inguinales superficiales e iliaco medial (*Patsikas y Dessiris, 1996 a, b*) o nódulo axilar (*Patsikas y cols., 2006*).

En condiciones neoplásicas la vascularización linfática puede verse alterada (*Pereira y cols., 2003 y 2008*), es por ello que se debe mostrar especial atención ya que el número de anastomosis contralaterales se ve incrementado en los casos en los que haya tumores en mamas abdominales e inguinales (*Graham y Myerers, 1999; Olofsson y cols., 1999; Veikkola y cols., 2000*).

Pereira y cols. (2003) describen que en casos de neoplasias en mamas torácicas el drenaje linfático se produce en los linfocentros superficial cervical o torácico ventral y que las mamas abdominales craneal y caudal drenan a los linfocentros axilar, inguinofemoral y poplíteo. Las mamas inguinales además podrían drenar al linfocentro poplíteo. Así mismo *Nickel y cols. (1981)* estudiaron una posible comunicación entre linfocentros axilar, profundo cervical y ventral torácico con neoplasia en mama abdominal craneal.



Figura 3 y 4. Circulación sanguínea y linfática de las glándulas mamarias (*derecha*). Vista lateral de los linfonodos regionales (*izquierda*). 1, Linfonodo axilar y accesorio. 2, Rama de la arteria torácica lateral. 3, Ramas de los vasos torácicos internos. 4, Ramas de las venas epigástricas superficiales. 5, Arteria epigástrica superficial caudal. 6, Linfonodo inguinal superficial. 7, Rama labial ventral a la vulva. 8, Arteria pudendo externa. 9, Linfonodo esternal. *Dyce y cols. (1996). Textbook of Veterinary Anatomy.*

Patsikas y Dessiris (1996a, b) y *Patsikas y cols. (2006)* no hallaron anastomosis linfática entre glándulas mamarias normales. Sin embargo, probaron que existe un flujo linfático retrógrado de una glándula a otra a través de su linfonodo regional común y que existe conexión entre los linfonodos inguinales superficiales de cada lado.

En el estudio de 2006, *Patsikas* y colaboradores hallaron 1 caso de 41 perras adultas con anastomosis entre la 3ª mama neoplásica y la 4ª mama ipsilateral normal. *Pereira y cols. (2003)* reportaron anastomosis de vasos linfáticos en mamas sanas tanto ipsilateral como contralateral, así como mayor número de anastomosis en los casos de mamas neoplásicas, estableciendo que el patrón de drenaje linfático cambia en casos de tumores mamarios.

2.1.3.- Histología

Histológicamente, la glándula mamaria es una glándula tubuloalveolar compuesta por **lóbulos mamarios** que constituyen las unidades estructurales básicas de la glándula. Cada uno de estos lóbulos cuenta con su propio conducto excretor (**conductos galactóforos**), que convergen hacia la base del pezón en donde desembocan de manera independiente. Antes de su desembocadura en el pezón cada uno de estos conductos presenta una dilatación fusiforme llamada **seno galactóforo**. Posteriormente, el conducto se vuelve a adelgazar para desembocar en el pezón.

Cada lóbulo está formado por un conjunto de unidades más pequeñas denominadas **lobulillos mamarios**. Al penetrar en el lóbulo, los conductos galactóforos se dividen en multitud de ramificaciones destinadas a los lobulillos mamarios tomando entonces el nombre de **conductos interlobulillares**. Dentro de los lobulillos estos conductos se vuelven a dividir, en cuyo extremo se agrupan las unidades secretoras de la mama denominadas **alveolos glandulares**, que a través del entramado de conductos moviliza su producto de secreción (leche) hacia el exterior (*Monteiro-Riviere, 2006*).

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. Longitudinalmente a éstos, y 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*).

El alveolo glandular está tapizado por un epitelio simple cúbico, cuya altura varía según la fase de la actividad secretora.

El tejido intersticial de la glándula mamaria proporciona importante tejido de sostén para las unidades secretoras y alberga nervios, vasos sanguíneos y linfáticos.

Las **células epiteliales** de la mama son de morfología cúbica, tienen un citoplasma típicamente eosinófilico 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 el periodo de lactación principalmente (Monteiro-Riviere, 2006).

Entre las células epiteliales y la membrana basal se localizan las **células mioepiteliales** también conocidas como mioepitelio y originadas a partir del ectodermo. Estas células a pesar de su origen epitelial se caracterizan por presentar numerosos filamentos de actina y miosina en su citoplasma, con lo que tienen capacidad contráctil. La contracción de estas células facilita el paso de la secreción láctea de la luz de los adenómeros glandulares a los conductos excretores glandulares (Gartner y Hiatt, 2006; Monteiro Riviere, 2006).

Rehm y cols. (2007) y Santos y cols. (2010) describen la histología de la glándula mamaria canina durante el ciclo estral, por su importancia para una correcta evaluación de los cambios patológicos que se producen en este órgano. En las perras prepúberes, durante la fase de proestro de su primer ciclo estral, sólo serán detectados 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. Desde la pared de estos ductos se observan proyectadas lateralmente 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, vamos a encontrar una glándula inactiva y formada principalmente por ductos interlobulares y ocasionalmente con lóbulos de pequeño tamaño, que a su vez están rodeados por una variable cantidad de tejido conectivo inter e intralobular. En algunas ocasiones, pueden observarse estructuras alveolares del ciclo estral precedente, compuestas por células epiteliales vacuoladas de tipo cuboidal o aplanadas. Del mismo modo, pueden observarse macrófagos cargados

de lipofuscina en la luz de los alveolos o en el tejido estromal intralobular (*Rehm y cols., 2007*).

La llegada del estro conlleva consigo la proliferación del epitelio ductal intralobular, con la formación de múltiples ductos pequeños tapizados por un epitelio estratificado, similar al descrito anteriormente, dentro del tejido conectivo interlobular (*Rehm y cols., 2007*).

Durante el diestro temprano, en donde los niveles de progesterona se encuentran elevados, se produce un gran desarrollo de los ductos con formación de lóbulos. El epitelio que va a tapizar estos ductos es estratificado y las células presentan un núcleo redondeado y alargado, eucromático, con 1-2 nucléolos prominentes, observándose numerosas figuras mitóticas. Los fibroblastos en el tejido conectivo interlobular van a poseer núcleos más prominentes y pueden mostrar una actividad mitótica incrementada. Estos fibroblastos se van a localizar en una matriz mucinosa que contiene numerosos vasos sanguíneos congestionados. En diestro tardío, el desarrollo de la glándula mamaria canina va a finalizar con la formación de alveolos secretores al final de los ductos intralobulares. Los alveolos van a presentar una secreción proteinácea eosinofílica en su parte central, y tapizados por células cuya morfología puede variar de cuboidal a más aplanada. Rodeando al epitelio alveolar, las células mioepiteliales se encuentran elongadas y formarán una capa continua en torno a los alveolos menos desarrollados, y a su vez discontinua en torno a los alveolos completamente desarrollados y distendidos. Este último hallazgo va a ser atribuido a la morfología estrellada de estas células mioepiteliales alveolares. Los ductos intralobulares también tienen una moderada cantidad de secreción eosinofílica en la luz y estarán 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 estará formado por bandas de colágeno y fibras de reticulina y rodea los ductos interlobulares (*Rehm y cols., 2007*).

La primera fase del anestro se caracteriza por presentar alveolos que contienen menor cantidad de secreción. Estos alveolos estarán compuestos por células epiteliales vacuolizadas, yaciendo las mismas sobre una membrana basal más prominente. Algunos lóbulos van a mostrar cambios asociados con la regresión propia de la glándula mamaria, en donde se puede apreciar un aumento del estroma intralobular, así como un infiltrado de linfocitos y células plasmáticas (*Rehm y cols., 2007*). En el anestro tardío, la regresión de la glándula mamaria muestra cambios más evidentes. La luz de los ductos disminuye en diámetro y los lóbulos disminuyen de tamaño. Con frecuencia se van a observar células con núcleos picnóticos tapizando los ductos y los alveolos, así como estructuras corpusculares eosinofílicas (*corpora amylacea*) en la luz de los ductos. El intersticio será más abundante, las fibras de colágeno aparecerán más compactas y existirá un infiltrado de linfocitos y células plasmáticas junto a macrófagos cargados de

lipofuscina. El estroma interlobular será más abundante y compacto (*Rehm y cols., 2007; Santos y cols., 2010*).

2.2.- Los tumores de mama en la especie canina

2.2.1.- Prevalencia

El tumor de mama es la neoplasia más frecuente en perras enteras (*Brodey y cols., 1983 y Dobson y cols., 2002*). Representa en total entre el 25 y 50% de todos los tumores documentados (*Dobson y cols., 2002*). Aproximadamente entre el 30 y 50% de los tumores de mama caninos son malignos.

La incidencia en Europa es aproximadamente de 200/100000 perras/año. En una población de perros en Reino Unido, reportaron una incidencia de tumores de mama de 205/100000 perros/año (*Dobson y cols., 2002*). Resultados muy similares se obtuvieron en Génova, con 272.1/100000 perras/año (*Vascellari y cols., 2009*). En Suecia se incluyeron a más de 80000 perras en un estudio, siendo la incidencia por año de 111 cada 10000 perras (*Egenvall y cols., 2005*). Desconocemos la existencia de datos estadísticos sobre esta incidencia en España y en las Islas Canarias.

Los factores epidemiológicos pueden clasificarse en: género, edad, raza, localización, variaciones geográficas, esterilización a edad temprana y grado de malignidad.

Género: Principalmente los tumores mamarios afectan a hembras aunque se ha estimado una incidencia en machos de 0 a 2,7% (*Brodey y cols., 1983*).

Edad: Diferentes autores han coincidido en que la incidencia se ve incrementada con la edad (*Loar, 1989; Moulton, 1990; Hellmén, 1996; Rutteman y cols., 2001*). Así mismo, en un estudio concreto, se determinó que la incidencia de tumores de mama en perras de 6, 8 y 10 años de edad era de 1%, 6% y 13%, respectivamente (*Egenvall y cols., 2005*).

Raza: De acuerdo a la literatura consultada las razas que tienen mayor riesgo de desarrollar tumores mamarios, sugiriendo un componente genético, son: Springer Spaniel Inglés, Bretón, 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 y cols., 1971; Cohen y cols., 1974; Mitchell y cols., 1974; Mac Vean y cols., 1978; Kurzman y Gilbertson, 1986; Boldizsar y cols., 1992; Yamagami y cols., 1996; Moe, 2001 Goldschmidt y cols., 2001; Richards y cols., 2001; Egenvall y cols., 2005; Bronden y cols., 2010*).

Localización: Las glándulas mamarias abdominal caudal e inguinal son las más frecuentemente afectadas. Entre el 50 y 70% de perras con tumores de mama presentan múltiples lesiones, pudiendo ser de diferente tipo (*Benjamín y cols., 1999; Misdorp, 2002; Soremno, 2003; Soremno y cols., 2009*).

Variaciones geográficas: Muchos de estos resultados de prevalencia se ven influenciados en diversas regiones por la idea de mantener la integridad sexual de la mascota. Así, los tumores de mama benignos y malignos son menos frecuentes en ciertas regiones del Oeste de Europa debido a la práctica común de ovariectomía a edades tempranas para mantener un control reproductivo (*Moe 2001; Egenvall y cols., 2005*). Por el contrario, en países como Escandinavia y España la incidencia de estos tumores es mucho mayor ya que la esterilización preventiva no se realiza rutinariamente (*Moe 2001, Perez Alenza y cols., 2001, Egenvall y cols., 2005*). En Noruega, un país con casi su totalidad de hembras enteras, presentó una prevalencia de tumores de mama del 53,3% (*Moe, 2001*).

Esterilización a edad temprana: El riesgo de desarrollar tumores de mama disminuye significativamente con ovariectomía a edad temprana. El riesgo de padecer estas neoplasias se ve reducido a un 0,5 %, 8%, 26% dependiendo de si la ovariectomía se realizó antes del primer, segundo o después del segundo celo pero con una edad inferior a los dos años y medio, respectivamente (*Schneider y cols., 1969*).

Grado de malignidad: Entre el 30 y 50% de los tumores de mama caninos son malignos y entre el 50 y 75% recidiva o metastatiza en 1 ó 2 años (*Knapp y cols., 1997; Misdorp y cols., 2002; Soremno, 2003*). Los carcinomas complejos (tanto epitelial como mioepitelial) y carcinomas simples (casi siempre epiteliales) son las neoplasias de mama más comunes en perras mientras que los sarcomas y carcinosarcomas tienen una presentación relativamente rara (*Misdorp y cols., 2002; Misdorp y cols., 1999*). Según un estudio, existen evidencias de progresión histológica hacia malignidad en tumores de mayor tamaño (*Soremno y cols., 2009*). Además varias publicaciones revelan que perras con lesiones pre malignas (hiperplasia, hiperplasia atípica y carcinoma *in situ*) (*Antuofermo y cols., 2007; Mouser y cols., 2010*) o perras con historias previas de tumores de mama (*Stratmann y cols., 2008; Soremno y cols., 2009*) presentan un mayor riesgo de desarrollar un nuevo tumor de mama maligno.

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

A lo largo de los años 70 surgieron varias propuestas de clasificación de tumores de mama caninos (*Moulton y cols., 1970; Monlux y cols., 1977*). En 1974, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó la primera "Clasificación Histológica Internacional de Tumores en Animales Domésticos" incluyendo tumores y displasias de la glándula mamaria basada en estudios previos sobre tumores de mama caninos publicados en la revista *Veterinary Pathology*. La clasificación de tumores de mama incluía un glosario basado en la morfología descriptiva, que fue la base para la clasificación de los tumores de mama malignos en perras.

Actualmente, el examen histológico de los tumores de mama es la base para distinguir tumores epiteliales benignos de malignos y complejos, y para clasificar los diferentes subtipos. 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 y cols., 1999*), que se basa en criterios de valor pronóstico más que en criterios morfológicos; la clasificación de *Benjamin y cols., (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 y cols., 1999*).

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 y cols., 1999; Misdorp, 2002*), no obstante nuevos datos en relación a los tumores de mama caninos han sido documentados en la literatura veterinaria a lo largo de los años como es el diagnóstico de nuevos histiotipos no discutidos con anterioridad (*Cassali y cols., 2011*) y que requieren ser estudiados y en ocasiones comparados con la clasificación histológica de los tumores de mama en la mujer ya que se trata de una clasificación mas reciente (*Tavassoli y cols., 2003*) y se discuten algunos histiotipos que también pueden observarse en la perra.

En 2011, *Goldschmidt* y colaboradores publican un artículo en el que se da una visión general de los sistemas de clasificación de tumores de mama: la primera de 1974 y la modificada de 1999 y además se propone un nuevo sistema de clasificación morfológicamente más diverso. Este sistema describe una nomenclatura para los tumores y las hiperplasias/displasias. De esta forma algunas neoplasias (carcinoma sólido y carcinoma anaplásico) mantienen el mismo nombre, mientras otras (carcinoma micropapilar invasivo y carcinoma ductal) son separados del grupo asignado previamente. Además, esta clasificación añade nuevos tipos como el carcinoma

inflamatorio y se incorporan resultados de técnicas de inmunohistoquímica para diferenciar aquellas células de origen mioepitelial. Sin embargo existen diferentes histiotipos que actualmente se describen en la literatura y no se incluyen en dicho artículo. Ejemplo de esto es el reciente artículo publicado por *Rismachi y cols. (2015)* en el que identifican el primer linfoma de mama canino.

Es necesario establecer una serie de pautas para el diagnóstico de los tumores de mama. Artículos como el de *Webster y cols. (2011)* representan un consenso en Oncología Veterinaria donde oncólogos y patólogos veterinarios de todo el mundo pretenden construir las bases para establecer una nueva clasificación de tumores de mama caninos.

2.2.3.- Factores de Riesgo

Los factores que se considera que son predisponentes o pueden aumentar el riesgo de padecer tumores de mama se catalogan en los siguientes grupos, que engloban en sí mismos las características asociadas con la presencia de la enfermedad (*Schneider y cols., 1969; Schneider 1970; Rutterman 1990; Sonnenschein y cols., 1991; Pérez Alenza y cols., 1998; Dore y cols., 2003; Queiroga y cols., 2005; Chang y cols., 2009; Lavalley y cols., 2009; Rivera y cols., 2009*):

- Edad.
- Sexo.
- Raza/Predisposición genética.
- Variables geográficas y medioambientales
- Hormonas.
- Dieta y obesidad.

2.2.3.1.- 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 y cols., 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 y cols., 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 y cols., 1971; Brodey y cols., 1983; Shofer y cols., 1989; Hellmén y cols., 1993). Las perras jóvenes tienen tendencia a desarrollar tumores benignos (Taylor y cols., 1976; Moulton y cols., 1986; Misdorp, 1988; Goldschmidt y cols., 2001) y, por otra parte, un estudio 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 (Soremno y cols., 2009).

En uno de los estudios anteriormente citados (Soremno y cols., 2009), se describe que las perras afectadas de tumores de mama malignos presentaban una media de edad superior a las que tenían tumores benignos; que dos tercios de las perras del estudio presentaban tumores múltiples y que había evidencia de progresión histológica hacia malignidad en los tumores de mayor tamaño. Además varias publicaciones revelan que perras con lesiones pre malignas (hiperplasia, hiperplasia atípica y carcinoma *in situ*) (Antuofermo y cols., 2007; Mouser y cols., 2010) o con historias previas de tumores de mama (Stratmann y cols., 2008; Soremno y cols., 2009) tienen mayor riesgo de desarrollar un nuevo tumor de mama maligno.

2.2.3.2.- 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 y cols., 1983; Madewell y Theilen, 1987; Saba y cols., 2007; Bearss y cols., 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 y cols., 2007; Bearss y cols., 2011).

2.2.3.3.- Raza/predisposición genética

Los tumores de mama pueden ocurrir en cualquier hembra canina de cualquier raza, pero ciertos tipos de perros y razas, tales como las razas toy (miniatura) suelen estar sobrerrepresentadas 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: Springer Spaniel Inglés, Bretón, 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 y cols., 1971; Cohen y cols., 1974; Mitchell y cols., 1974; Yamagami y cols., 1996a; Goldschmidt y cols., 2001; Moe, 2001; Richards y

cols., 2001; Egenvall y cols., 2005; Bronden y cols., 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 y cols., 1971; Brodey y cols., 1983; Goldschmidt y cols., 2001), mientras que en trabajos realizados en diferentes países europeos aparecen con mayor riesgo (Moe, 2001; Richards y cols., 2001; Brønden y cols., 2010). Un estudio realizado sobre una colonia de perras de raza Beagle mostró también una variación en cuanto al riesgo dentro de la misma raza (Schafer y cols., 1998).

2.2.3.4.- 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 y cols., 1968; Schneider, 1970; Dorn y Schneider, 1976; Merlo y cols., 2008; Brønden y cols., 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 y cols., 1970; Moulton y cols., 1986; Benjamin y cols., 1999).

2.2.3.5.- Hormonas

Los tumores de mama tanto de las mujeres como en perros son controlados hormonalmente y pueden encontrarse semejanzas de dependencia hormonal entre el cáncer de mama en la mujer y los tumores de mama caninos (Thuroczy y cols., 2007).

En cada ciclo estral de las perras, los esteroides ováricos estimulan, bajo condiciones fisiológicas, el crecimiento del tejido mamario normal. Su efecto proliferativo en el epitelio puede crear condiciones para la proliferación neoplásica (Soremno y cols., 2000; Queiroga y cols., 2005) en los primeros años de vida de la perra. Esto hace que con los primeros ciclos estrales las perras sean más susceptibles de padecer futura carcinogénesis (Ruttemann, 1990; Stovring y cols., 1997; Chang y cols., 2009). Fonseca

y Daleck (2000) realizaron una extensa revisión bibliográfica donde discuten la influencia hormonal en el desarrollo y evolución de los tumores de mama y comentan el valor terapéutico de la ovariectomía en el momento de la mastectomía. La publicación de referencia de Schneider y cols., en 1969, describe cómo el riesgo de una perra de desarrollar un tumor mamario se incrementa de manera drástica durante el primer ciclo estral, sugiriendo que aquellos factores que predisponen a desarrollar tumores en la glándula mamaria ocurren a edad temprana en la perra. La ovariectomía 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 y cols., 1969).

Los estrógenos promueven el crecimiento ductal, mientras que los progestágenos son capaces de producir el desarrollo lobuloadveolar de la glándula mamaria con hiperplasia de las células mioepiteliales y secretoras (Rutteman, 1990). Durante la fase lútea del ciclo estral de la perra, la glándula mamaria es expuesta a altas concentraciones de progesterona (Evans y cols., 1969; Schaefer-Okkens y cols., 2005). Los mecanismos involucrados en la inducción de los tumores de mama mediante la influencia de progesterona incluyen la producción de hormona del crecimiento (GH) en la glándula mamaria (Mol y cols., 1996; Queiroga y cols., 2008). Se especula que GH estimula la proliferación de células madre mamarias como primer paso en el proceso de carcinogénesis mamaria (Mol y cols., 1996; Garderen y cols., 1999).

Los receptores de progesterona y estrógenos están presentes tanto en tejido normal como neoplásico (MacEwen y cols., 1982; Gerald y cols., 2000; Nieto y cols., 2000; Martín de las Mulas y cols., 2005; Millanta y cols., 2005; Yang y cols., 2006; Gama y cols., 2008; Chang y cols., 2009). Sin embargo la presencia de receptores de estrógenos es significativamente mayor en tumores benignos que en malignos (MacEwen y cols., 1982; Rutteman y cols., 1988; Donnay y cols., 1995; Gerald y cols., 2000; Martín de las Mulas y cols., 2005; Illera y cols., 2006; Yang y cols., 2006; Chang y cols., 2009). De igual manera, la expresión de receptores de progesterona disminuye progresivamente desde hiperplasias/lesiones benignas hasta los tumores malignos de mama (Gerald y cols., 2000; Millanta y cols., 2005; Chang y cols., 2009).

La baja expresión de receptores de estrógenos y progesterona parece estar correlacionada con un peor pronóstico (Nieto y cols., 2000; Martín de las Mulas y cols., 2005; Gama y cols., 2008; Chang y cols., 2009). Sin embargo no todos los estudios muestran resultados similares. Millanta y cols. (2005) no encontraron una correlación estadísticamente significativa entre la pérdida de expresión de receptores de estrógenos y progesterona y un peor pronóstico. Además Kumaraguruparan y cols. (2006) determinaron una alta expresión de receptores de estrógenos en todos los tumores benignos y malignos examinados.

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

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 y cols., 1977; Giles y cols., 1978; Kwapien y cols., 1980; Concannon y cols., 1981; Selman y cols., 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 y cols., 1977; Giles y cols., 1978; Kwapien y cols., 1980; Concannon y cols., 1981; Selman y cols., 1995*). La administración de progestágenos en perras domésticas con el objeto de retrasar o suprimir el celo también incrementa el riesgo de desarrollo de tumores (*Misdorp, 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 y cols., 1966; Schneider y cols., 1969; Taylor y cols., 1976*). Concretamente, el efecto de pseudogestaciones en el desarrollo de tumores de mama caninos es aún debatido (*Rutteman, 1990; Gobello, 2001*) aunque, muy posiblemente, no hay efectos. Un estudio retrospectivo en 267 perras afectadas por tumores de mama, no pudo demostrar ninguna influencia de pseudogestaciones en el inicio de carcinomas de mama (*Veronesi y cols., 2003*).

2.2.3.6.- Dieta y obesidad

La obesidad, que se define como una excesiva acumulación de tejido adiposo en el cuerpo, es uno de los problemas de salud más importantes tanto en Medicina Humana como Veterinaria. En humana la obesidad está asociada a numerosas enfermedades como hipertensión, enfermedad cardíaca, diabetes *mellitus*, enfermedad respiratoria y neoplasias incluyendo cáncer de mama, colon, esófago y próstata (*Slattery y cols., 1997; Carmichael y cols., 2004; Baillargeon y cols., 2006; Veugelers y cols., 2006*).

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 y cols., 1991*). Sin embargo, las perras de este estudio que estaban obesas un año antes del diagnóstico de tumor de mama o tenían una dieta con alto contenido en grasas no demostraron tener un mayor riesgo para desarrollar tumores mamarios (*Sonnenschein y cols., 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 y cols., 1998*). Estos dos estudios muestran cómo el efecto de la obesidad en el riesgo de padecer tumores 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 significación 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 la perra.

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 y cols., 2007; Nunez y cols., 2008; Khalid y cols., 2010*).

Una excesiva acumulación de adipocitos influye tanto en el tejido normal mamario como en el epitelio mamario neoplásico a través de la secreción de citoquinas y hormonas incluyendo leptina, adiponectina, factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1), factor de necrosis tumoral- α , interleuquina-6, resistina y aromatasa (*Laflamme, 2006; Zoran, 2010*). Las hormonas sexuales esteroideas como estrógenos y progesteronas juegan un papel importante en el crecimiento e invasión tanto en cáncer de mama en la mujer como en la perra a través de la activación de receptores hormonales (RHs) (*Yager y cols., 2006*). Además los adipocitos y las células carcinomatosas son capaces de secretar citocromo p450 aromatasa que a su vez favorece la biosíntesis intratumoral de estrógenos (*Miki y cols., 2007*).

La leptina es una de las hormonas liberadas por los adipocitos que estimula la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama a través de la transcripción de la aromatasa (*Lorincz y cols., 2006; Jarde y cols., 2008*). Tanto en humana como en perros los niveles circulantes de leptina se correlacionan con la acumulación de adipocitos (*Wauters y cols., 2000; Ishioka y cols., 2007*).

En un estudio de Medicina Humana se halló correlación entre altos niveles de receptores de leptina intratumoral y leptina plasmática y un pobre pronóstico (*Miyoshi y cols., 2006*).

IGF-1 ejerce un efecto mitogénico y antiapoptótico en los carcinomas de mama caninos mediante su unión a los receptores IGF-1 (IGF-1 R) e incrementando la activación de los receptores estrogénicos (RE) (Yee y cols., 2000). Estos hallazgos sugieren que la obesidad puede afectar al desarrollo de cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas y de tumores de mama caninos en perras esterilizadas mediante una continua biosíntesis y estimulación de estrógenos (Hankinson y cols., 1998; Wu y cols., 1999; Tymchuk y cols., 2001; Cleary y cols., 2009; Lim y cols., 2015).

Lim y cols. (2015) sugieren en un estudio que el sobrepeso o la obesidad son un factor de riesgo para el inicio temprano de tumores de mama caninos de alto grado y que la expresión de aromataasa en perras obesas o con sobrepeso puede influir en el desarrollo de tumores de mama caninos a través de los receptores hormonales (RH).

2.2.4.- Signos clínicos

La mayoría de las perras con tumores de mama están clínicamente sanas en el momento del diagnóstico y, en ocasiones, es el propietario de forma casual o en un examen físico rutinario hecho por un profesional veterinario donde se identifican las lesiones (Soremno, 2003).

Una completa historia y un examen físico, junto a una cuidadosa palpación de cada glándula mamaria, deben de ser realizados de forma habitual en nuestros pacientes, y concretamente en pacientes con tumores de mama debe ser imprescindible y minucioso. Si bien, en ocasiones, los tumores mamarios son detectados incidentalmente en hembras de mediana a avanzada edad con otros problemas médicos concurrentes que requieren tratamiento, lo habitual es que 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 manifestar signos sistémicos de enfermedad, alteraciones en los valores hematológicos, así como coagulopatías, cambios consistentes con enfermedad sistémica y metastásica (Gilbertson y cols., 1983; Stockhaus y cols., 1999; Marconato y cols., 2009). Si existe metástasis, los pacientes pueden mostrar signos inespecíficos como fatiga, letargo, pérdida de peso, disnea, tos, edema o dolor en extremidades.

Las perras con tumores mamarios frecuentemente 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 (Soremno y cols., 2009). Otros muchos autores, incluyendo aquellos responsables de los trabajos observacionales realizados sobre grandes colonias de Beagles, han reportado lesiones neoplásicas mamarias múltiples (Moulton y cols., 1976; Bender y cols., 1984; Taylor y cols., 1986; Benjamin y cols., 1999). Las mamas inguinales suelen ser las más frecuentemente afectadas mientras que las torácicas craneales no suelen verse

afectadas en un primer lugar (Moulton y cols., 1976; Bender y cols., 1984; Taylor y cols., 1986; Benjamin y cols., 1999; Goldschmidt y cols., 2001).

2.2.5.- Diagnóstico

2.2.5.1.- Historia clínica y examen clínico

El profesional debe recopilar toda la información posible sobre historia médica del paciente, ciclo reproductivo (estros regulares, número de partos, castración, uso de terapias hormonales, abortos o historia de pseudogestaciones), la fecha aproximada de detección de tumor por parte del propietario, y la existencia de tumores previos.

Durante el examen físico se evalúa la condición general del paciente enfermo. El paciente es colocado en decúbito supino para realizar una correcta palpación de las dos cadenas mamarias y los linfonodos. Cada mama debe ser minuciosamente examinada. Los tumores de mama son relativamente fáciles de detectar durante la realización de un examen físico. Los signos clínicos específicos dependen del comportamiento biológico del tumor y en qué estadio de la enfermedad se encuentra la paciente cuando son inspeccionadas por el veterinario. Los tumores pueden ser lesiones únicas o múltiples, normalmente firmes, bien delimitadas y varían en tamaño desde pocos milímetros hasta 10-20 cm o más. Pueden estar fijados al tejido subcutáneo o presentar movilidad. En ocasiones la piel que lo cubre o el propio tumor están ulcerados y se asocian a inflamación local. Los tumores de mama múltiples pueden localizarse en una única mama o afectar a múltiples glándulas mamarias simultáneamente (tumores multicéntricos), pudiendo ser de diferente tipo histológico (Kurzman y cols., 1986; Misdorp y cols., 1999). Los linfonodos regionales en condiciones normales no se palpan (axilares) o se palpan pequeños (inguinales) pero pueden encontrarse aumentados de tamaño en caso de metástasis ganglionar (Romagnoli, 2005).

Los pulmones son los órganos más frecuentemente afectados por la enfermedad metastásica en los tumores de mama caninos (Fidler y Brodey, 1967a; 1967b). Para determinar el estadio del cáncer y determinar si existe enfermedad metastásica a pulmón, el profesional debe realizar radiografías de tórax en sus tres proyecciones (VD, RL, LL). Las lesiones metastásicas de pulmón que miden entre 5-7 mm de diámetro son detectables con radiografía convencional (Kealy y McAllister, 2005; Nemanic y cols., 2006). Estas lesiones se reconocen radiográficamente como nódulos radiodensos pobremente delimitados y en ocasiones acompañados por derrame pleural no asociado a patología pulmonar (Johnston, 1993; Kealy y McAllister, 2005; Nemanic y cols., 2006; Otoni y cols., 2010). La tomografía computerizada (TAC) es más sensible que la radiografía convencional, pudiendo detectar lesiones de 1 mm, dependiendo del escáner usado (Nemanic y cols., 2006; Otoni y cols., 2010). Aunque el pulmón sea el órgano diana para metástasis de tumores de mama malignos es recomendable realizar

ecografía o radiografía abdominal en aquellos casos en que los pacientes muestren signos clínicos específicos que sean indicativos de que existen metástasis en otras localizaciones anatómicas (Soremno, 2003).

Los linfonodos 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 linfonodos regionales ha demostrado ser un método altamente sensible para la detección de metástasis ganglionar en pacientes con tumores sólidos (Langenbach y cols., 2001). Si el estudio citológico es negativo para enfermedad metastásica, la toma de biopsia ganglionar no sería necesaria a no ser que el linfonodo 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 (Soremno y cols., 2011).

Conocer el tamaño y extensión del tumor primario, el grado de diseminación a los linfonodos y la presencia de metástasis nos ayudan a realizar la estadificación del tumor, procedimiento que será explicado más detalladamente en el apartado correspondiente de esta tesis doctoral.

2.2.5.2.- Pruebas complementarias

El análisis hematológico y perfil bioquímico rutinario son técnicas que ayudan a detectar síndromes paraneoplásicos (Johnston, 1993; Fossum y Hedlund, 1997). Las pruebas de coagulación no son técnicas que deben realizarse de manera rutinaria en perras con tumores de mama, pero su alteración puede indicarnos metástasis a distancia, necrosis del tumor, carcinoma inflamatorio o infiltración de células tumorales a estructuras adyacentes (Stockhaus y cols., 1999).

2.2.5.3.- Aspectos clínicopatológicos

Como ya se ha comentado anteriormente, son frecuentes las perras que 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 (Soremno y cols., 2009). 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 (Soremno y cols., 2009). En este sentido, se ha descrito una progresión histológica hacia la malignidad asociada a un incremento de tamaño de la masa tumoral en perros que presentaron múltiples tumores (Soremno y cols., 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 (Soremno y cols., 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 y cols. (1986)* reportaron cómo perras con tumores malignos presentaban simultáneamente tumores benignos del mismo tipo histológico. *Bender y cols. (1984)* describieron que aquellas perras con tumores de mama benignos tenía un mayor riesgo de desarrollar tumores malignos más tarde. *Soremno y cols. (2009)* sugieren 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. *Benjamin y cols. (1999)* apuntan una progresión histológica desde las formas menos agresivas de carcinoma hacia la forma de carcinoma anaplásico. Por último, y en este mismo sentido, *Gilbertson y cols. (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.

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

2.2.5.4.- Diagnóstico citológico

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 llegar a un diagnóstico debido a la elevada presencia en la citología de células no relacionadas con el tumor o a una muestra no representativa del mismo. La única excepción es el carcinoma inflamatorio, en el cual sí es útil para identificar las células neoplásicas que infiltran la piel (*Allen y cols., 1986; Madewell y Theilen 1987; Hellmén y Lingren 1989a; Lana y cols., 2007*).

Existen varias razones por las que una citología puede ser una muestra no representativa del tumor. En primer lugar, los tumores pueden estar rodeados por una extensa reacción estromal (*Martins y cols., 2002*) o tejido normal (*Romagnoli, 2005*). En segundo lugar, algunos tumores inducen una reacción inflamatoria en mayor o menor grado con lo que las células tumorales estarán rodeadas por estas células inflamatorias.

En tercer lugar, la morfología de las células tumorales puede variar en un único tumor (Allen y cols., 1986; Romagnoli, 2005; Simon y cols., 2009).

No obstante, otros autores opinan que los exámenes citológicos pueden ser más precisos (Simeonov y Simeonova, 2006 a, b; Cassali y cols., 2007). Simon y cols. (2009) publicaron un trabajo en el que usa como prueba de referencia la histología para demostrar que la citología de tumores de mama caninos es un método útil como factor pronóstico y altamente sensible y específico para discernir entre tumores benignos y malignos.

Hay que resaltar que el examen citológico de las lesiones de mama es una técnica útil a la hora de determinar si se trata o no de una lesión neoplásica, o incluso de diferenciar neoplasia mamaria de tumores no mamarios como mastocitoma (Welle y cols., 2008). Si se sospecha que la lesión es neoplásica se recomienda la resección de la lesión y examen histopatológico.

2.2.6.- Estadificación

La estadificación se realiza en un intento de agrupar a las pacientes en función de la extensión de su enfermedad. Su utilidad viene dada en términos de:

- 1- Determinar de forma individual la opción de tratamiento en cada paciente.
- 2- Estimar el pronóstico.
- 3- Comparar los distintos tratamientos empleados en un mismo grupo de pacientes con el mismo estadio.

Los tumores de mama se estadifican de acuerdo al sistema Tumor, Linfonodo, Metástasis (TNM) establecido por la OMS para los tumores de mama caninos. Por lo tanto, para estadificar a un paciente canino con tumor de mama se requiere información referente al tamaño de la lesión (T), la afectación ganglionar (N) y la presencia o no de metástasis (M). 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 (Soremno y cols., 2011).

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 OMS (Owens, 1980) y el segundo, más reciente, resulta una modificación del primero (Rutteman y cols., 2001). La Tabla I es una comparación de estos dos sistemas. En dicha tabla puede observarse que existen importantes diferencias entre ambos. De acuerdo con la clasificación modificada

(Rutteman y cols., 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) asigna el mismo estadio de enfermedad, específicamente el estadio II, a pacientes con un tumor de pequeño tamaño y afectación del linfonodo regional (N1+), así como designa a un paciente con un tumor de mayor tamaño (TII 3-5 cm) sin tener en cuenta el estatus del linfonodo (N0 o N1), sugiriendo que el tamaño tumoral tiene el mismo valor pronóstico que la afección del linfonodo. Además, de acuerdo con el sistema de estadificación original de la OMS, un perro con un tumor mayor (TIII) 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 (Soremno y cols., 2011).

Tabla I. Sistema de estadificación para los tumores de mama caninos.

SISTEMA OMS ORIGINAL (Owens, 1980)				SISTEMA OMS MODIFICADO (Rutteman et al., 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 _{1a,b,c}	N ₁	M ₀				
	T _{2a,b,c}	N ₀ ó N _{1a}	M ₀				
Estadio III	T _{3a,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) T₀: No evidencia de tumor T₁: < 3 cm (a,b,c) T₂: 3-5 cm (a,b,c) T₃: > 5 cm (a,b,c) T₄: Cualquier T, carcinoma inflamatorio N: Estado del linfonodo regional N₀: No metástasis N₁: Metástasis ipsilateral (a,b) N₂: Metástasis bilateral (a,b) M: Metástasis a distancia M₀: No metástasis a distancia M₁: Metástasis a distancia				T: Tumor primario T₁: < 3 cm T₂: 3-5 cm T₃: >5 cm N: Estado del linfonodo regional N₀: No metástasis N₁: Metástasis M: Metástasis a distancia M₀: No metástasis a distancia M₁: Metástasis a distancia			

Los sistemas de estadificación facilitan la estandarización de los datos de un paciente de manera que los clínicos pueden comunicarlos 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.

En los sistemas de estadificación 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 requiere una intensificación en el tratamiento. De cualquier manera ninguno de los sistemas de estadificación mencionados ha sido validado por su valor pronóstico en estudios controlados (*Soremno y cols., 2011*).

2.2.7.- Factores pronósticos

La capacidad para identificar qué grupo de perras se beneficiaría en realidad del tratamiento adyuvante sería de gran valor. Un factor pronóstico puede dar información sobre la historia natural y evolución clínica en el momento del diagnóstico, independientemente de la terapia. El factor predictivo puede dar información sobre la probabilidad de respuesta a una modalidad terapéutica específica. De esta manera el concepto de “factores predictivos” se va imponiendo al de “factores pronósticos” en un intento de poder predecir cuáles son los tumores que responderán a un tratamiento en particular y no a otro.

Se han publicado numerosos estudios retrospectivos sobre factores pronósticos en los tumores de mama caninos. De acuerdo con los estudios mejor controlados y que incluyen mayor número de animales, los factores que más se asocian con el pronóstico y por lo tanto son necesarios para los clínicos a la hora de tomar decisiones en el manejo del paciente son el tamaño tumoral, el estatus ganglionar, el estadio tumoral y factor pronóstico histológico (*Lana y cols., 2007; Soremno y cols., 2011*).

A continuación se detallan aquellos factores pronósticos morfológicos que constituyen indicadores pronósticos clásicos y que pueden determinarse de forma rutinaria; y posteriormente otros indicadores “nuevos” moleculares que pueden resultar útiles aunque ninguno se ha adoptado aún como rutinario en parte debido a que son pocos los estudios prospectivos multivariantes que han demostrado su valor pronóstico.

2.2.7.1.- Factores morfológicos clásicos

2.2.7.1.1.- Tamaño tumoral

Clásicamente, se describen tres diferentes categorías en referencia al tamaño: T1: < 3 cm, T2: 3-5 cm y T3: > 5 cm (*Owens, 1980; Rutteman y cols., 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 un valor pronóstico, existen contradicciones acerca 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 recidiva 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 y cols. (2003)* también encontraron diferencias en la supervivencia de perras con tumores menores de 3 cm (T1) y mayores de 3 cm (T2 y T3). *Yamagami y cols. (1996b)*, sin embargo, reportaron un pronóstico similar para los T1 y T2 siendo significativamente peor para los T3. *Chang y cols. (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 y que la metástasis a linfonodo era mayor en los casos en los que los tumores de mama superan los 5 cm de diámetro.

Ferreira y cols. (2009) reportaron una supervivencia total y periodo libre de enfermedad menor en perras que presentaban tumores de mama de mayor tamaño.

En otros estudios los tumores de más de 3 cm de diámetro se asocian a determinados factores como son la pérdida de receptores de progesterona o alto índice proliferativo que indican mal pronóstico (*Ferreira y cols., 2009; Soremno y cols., 2009*).

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 éste aparenta tener un valor pronóstico significativo (*Soremno, 2003; Soremno y cols., 2011*).

Según lo anterior, la mayoría de los trabajos indican 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, realizaron sólo un análisis univariable y no tuvieron en cuenta posibles asociaciones entre el tamaño tumoral y el estatus del linfonodo (*Soremno y cols., 2011*).

2.2.7.1.2.- Estatus ganglionar

De acuerdo con el sistema de estadificación modificado, el estatus ganglionar se clasifica en N₀ (no metástasis) o N₁ (metástasis) basado en el estudio mediante citología o histopatología (*Rutteman y cols., 2001*). Un linfonodo positivo (N₁) concuerda con un estadio IV de la enfermedad en el sistema de estadificación modificado. En el sistema original de la OMS, el estatus ganglionar está determinado por el examen clínico o histopatológico y además especifica la localización del linfonodo positivo (ipsilateral o contralateral) y si se encuentra fijado o no a tejidos subyacentes. Esta información

adicional determina 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 y cols., 1999). Sin embargo, estos mismos autores, en estudios previos, habían indicado que dicho estatus no tenía valor pronóstico (Misdorp y cols., 1976). Esto puede ser atribuido, en parte, al hecho de que tales estudios eran de naturaleza retrospectiva: la estadificación y los procedimientos quirúrgicos no estaban estandarizados y podrían haber sido incompletos en términos de la evaluación histopatológica del linfonodo regional, provocando un fallo en la detección de la metástasis y, por lo tanto, subestimando la estadificación. 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 hematógena y no afectan al linfonodo. Estos casos tienen un pronóstico pobre a pesar de tener un estatus ganglionar negativo (N₀) (Hellmén y cols., 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 ser tumor específico, así como los valores de remisión, tiempo de progresión o la supervivencia tumor-específica (Webster y cols., 2011).

La edad avanzada en el momento de diagnóstico de tumores de mama está asociada con una supervivencia global más corta (Pérez Alenza y cols., 1997). Sin embargo, otros investigadores no definen la edad como un factor pronóstico (Philibert y cols., 2003; Chang y cols., 2005).

Hay que tener en cuenta además que aquellas perras con edad avanzada tienen más posibilidades de morir por otras causas no asociadas con cáncer que las perras jóvenes (Soremno, 2003); el hecho de no eliminar estos casos puede provocar un error en la identificación de factores de pronóstico verdaderos, es decir, factores asociados a un comportamiento biológico agresivo (Lana y cols., 2007).

La metástasis ganglionar demostró ser un factor pronóstico significativo en un amplio estudio retrospectivo que usó como valor de evaluación la recidiva del tumor y que incluía sólo perras con carcinomas en cuya cirugía de mastectomía se había incluido el linfonodo regional (Kurzman y Gilbertson, 1986). El estatus ganglionar también ha sido asociado con el pronóstico en otros muchos estudios que han usado análisis multivariantes (Hellmén y cols., 1993; Yamagami y cols., 1996b; Nieto y cols., 2000; Chang y cols., 2005). En otros estudios multivariantes no se pudo demostrar su valor pronóstico (Hellmén y cols., 1993; Martín de las Mulas y cols., 2005; Santos y cols., 2013. Araujo y cols. (2015) sostienen la importancia de evaluar las metástasis a linfonodo, determinar el valor pronóstico del tamaño de las metástasis e incluso establecer un número de cortes histológicos a analizar que ayuden en un futuro a

estandarizar un método de análisis que permita calcular el auténtico valor pronóstico de las metástasis a nódulos linfáticos en los tumores de mama caninos.

Por otra parte, en Patología Humana es una práctica común la realización de análisis inmunohistoquímico usando anticuerpos anti-citoqueratinas (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 y cols., 2006; de Boer y cols., 2010*). En Medicina Veterinaria sólo hemos encontrado 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 linfonodos y se identificaron micrometástasis ocultas en un 9,2% de los casos, no obstante la relevancia clínica de estos resultados requiere un mayor número de estudios y discusión (*Matos y cols., 2006*).

2.2.7.1.3.- Estadío tumoral

La información recogida acerca del tamaño tumoral y el estatus ganglionar se incluyen en ambos sistemas de estadificación y proporcionan la información necesaria para designar en qué estadio se encuentra el tumor. Diversos estudios han valorado el valor pronóstico del estadio tumoral de acuerdo con ambas clasificaciones de la OMS. *Yamagami y cols. (1996b)* usaron el sistema de estadificación original y encontraron diferencias significativas entre los estadios I, III y IV, no pudiendo realizar análisis estadístico del estadio II ya que era un grupo muy reducido comparado con los otros.

El sistema de estadificación modificado ha sido usado en dos estudios más recientes; *Chang y cols. (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 y cols. (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 estadificación y pronóstico adolecen normalmente de las mismas limitaciones, como son la falta de estandarización de los métodos de estadificación, 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 sobreestimación o subestimación del estadio tumoral y, por tanto, provocar análisis sesgados (*Webster y cols., 2011*).

2.2.7.1.4.- Características histológicas

Las características histológicas de los carcinomas de mama caninos que tienen valor pronóstico probado son: el grado histológico de malignidad, grado de diferenciación nuclear, tipo histológico de tumor, la presencia de un infiltrado linfocitario en la vecindad del tumor, el crecimiento infiltrativo en los tejidos vecinos y la presencia de émbolos de células neoplásicas (*Bloom y Richardson, 1957; Scarff y Torloni, 1968; Misdorp y Hart, 1976; Else y Hannant, 1979; Gilbertson y cols., 1983; Parodi y cols., 1983; Bostock, 1986; Madewell y Theilen, 1987; Lagadic y Estrada, 1990; Hellmén y cols., 1993; Misdorp y cols., 1999; Misdorp, 2002; Lana y cols., 2007*). 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.

2.2.7.1.4.1.- Grado histológico de malignidad

El grado histológico de malignidad evalúa, fundamentalmente, 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 y cols. (1983)* y el de *Lagadic y Estrada (1990)*, y los propuestos más recientemente se basan en los mismos criterios (*Misdorp, 2002*).

Gilbertson y cols. (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 y cols. (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 y cols. (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 índice mitótico (número de mitosis en 10 campos de 400 aumentos). A cada criterio se le asigna una puntuación que varía con los sistemas propuestos.

2.2.7.1.4.2.- Grado de diferenciación nuclear

El grado de diferenciación nuclear evalúa, fundamentalmente, 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 y cols. (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 y cols., 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 y cols., 1993*).

2.2.7.1.4.3.- 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 y cols., 1999; Ellis y cols., 2007*). Según la última clasificación de las neoplasias de la glándula mamaria de la perra propuesta por la OMS (*Misdorp y cols., 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 lumbinales y a células mioepiteliales); 3) carcinoma simple (un carcinoma constituido por un solo tipo celular que es similar o bien a las células epiteliales lumbinales 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).

De acuerdo a 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 tubulopapilar < carcinoma simple sólido < carcinoma anaplásico (*Else y Hannant, 1979; Misdorp y Hart, 1976; Parodi y cols., 1983; Misdorp y cols., 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 y cols., 2003; Pérez-Martínez y cols., 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 y cols., 1977; Misdorp y Hart 1979; Brodey y cols., 1983; Gilbertson y cols., 1983; Bostock, 1986; Kurzman y Gilbertson, 1986; Hellmen y cols., 1993; Misdorp y cols., 1999*). En algunos estudios se comprobó, además, que el tipo histológico era un factor pronóstico independiente (*Misdorp y Hart 1976; Shofer y cols., 1989; Hellmén y cols., 1993; Yamagami y cols., 1996b; Pérez Alenza y cols., 2000; Philibert y cols., 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 y cols., 1999*) que no coincidía plenamente con la de la OMS (*Misdorp y cols., 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 y cols., 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).

La clasificación del cáncer de mama de la especie humana basada en subtipos moleculares es una herramienta más útil que las características morfológicas de los tumores con valor pronóstico o predictivo, así se clasifica mediante un perfil de expresión génica en dos tipos según la presencia o ausencia de receptores hormonales (estrógenos y/o progesterona). Dentro de cada tipo, a su vez, se han establecido diferentes subtipos, dos para los positivos a receptores hormonales (luminal A y luminal B) y tres para los negativos a receptores hormonales (el que expresa el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano o HER2, el basal y el no clasificado (Perou y cols., 2000; Sørlie y cols., 2003).

En Veterinaria, la clasificación de los tumores de mama se basa, como ya hemos comentado, en las características histomorfológicas. Esta clasificación al igual que en humana no refleja la heterogeneidad de los tumores en su comportamiento biológico, ni permite identificar los pacientes que presentan mejores respuestas y beneficios con las diferentes modalidades terapéuticas. Al contrario que en humana, algunos tumores de mama caninos presentan una fuerte expresión del componente mioepitelial con lo que los marcadores inmunohistoquímicos usados para clasificar los subtipos en humana no son del todo apropiados para las perras. Estudios recientes tienen como objeto demostrar la utilidad de la clasificación de los tumores de mama caninos por subtipos moleculares mediante paneles de anticuerpos similares a humana (Gama y cols., 2008); Sassi y cols., 2010; Ortega García y cols., 2013; Im y cols., 2014) y han permitido identificar varios subtipos. Sin embargo, la definición de un subtipo molecular para los tumores de mama caninos con valor predictivo o pronóstico requiere una mejor definición de los marcadores basales.

2.2.7.1.4.4.- Infiltrado inflamatorio linfocitario

El papel del infiltrado inflamatorio en los tumores de mama caninos no es del todo claro. 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 y cols., 1983) o supervivencia (MacEwen, 1986). 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. Estos mismos autores observaron que los carcinomas de grado histológico de

malignidad I con reacción linfocitaria tenían una probabilidad de recaer 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 (*Gilbertson y cols., 1983*). Recientemente *Kim y cols. (2013)* describieron altos niveles de células B y T en tumores de mama menos diferenciados y con invasión linfática. Estos resultados sugieren que las distintas poblaciones linfoides tienen papeles opuestos en la progresión del cáncer.

Nowak y cols. (2007) hallaron altos niveles de células T CD8+ en carcinoma de mama metastásico sugiriendo una relación de éste subtipo de linfocito en la progresión tumoral. *Estrela-Lima y cols. (2010, 2012)*, sin embargo, compararon los porcentajes de células B, linfocitos T CD4+ y CD8+ concluyendo que los que tenían peor pronóstico eran los pertenecientes a células B y T CD4+. Esta serie de conflictos puede explicarse mediante los hallazgos hechos en el cáncer de mama en la mujer donde la presencia de células T CD8+ en el mismo lecho tumoral se asocia con un tipo histológico más agresivo, mientras que su acumulación en la periferia se relaciona con mejor periodo libre de enfermedad y supervivencia (*Liu y cols., 2011*).

Un estudio retrospectivo señala que el número total de linfocitos T intratumorales es significativamente mayor en tumores de mama malignos en perras comparado con lesiones benignas. Además, se correlaciona con un mal pronóstico en el análisis multivariable (*Saeki y cols., 2012*). *Kim y cols. (2010b)* obtuvieron resultados similares, demostrando 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 metastáticos. 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.

Aún así, es necesario clarificar el papel que ejercen estas y otras células del sistema inmune sobre los tumores de mama caninos para desarrollar diferentes modalidades de inmunoterapia (*Marconato y cols., 2015*).

2.2.7.1.4.5.- El crecimiento infiltrante en 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 y cols., 1993; Lana y cols., 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, 1979; Bostock, 1986; Yamagami y cols., 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 y cols. (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 (*Sánchez-Céspedes y cols., 2011*).

2.2.7.1.4.6.- 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 y cols., 2007*), porque este hecho se ha comprobado tanto en estudios de correlación con el tiempo de supervivencia (*Parodi y cols., 1983; Estrada y cols., 1984; Yamagami y cols., 1996b*), como con el periodo libre de enfermedad (*Gilbertson y cols., 1983; Kurzman y Gilbertson, 1986; Lagadic y Estrada, 1990*). Sin embargo, *Misdorp y Hart (1976)* y *Hellmén y cols. (1993)* no encontraron relación entre la presencia de invasión vascular y el tiempo de supervivencia.

2.2.7.2.- Factores pronósticos moleculares

Actualmente en Veterinaria los únicos factores pronósticos aceptables que proporcionan información necesaria para tomar decisiones de tratamiento son la etapa TNM, estatus del linfonodo, tamaño y grado del tumor e invasión vascular.

En las últimas décadas se han realizado numerosos estudios sobre nuevos marcadores moleculares identificándose numerosos antígenos y oncogenes que puedan tener un valor pronóstico y que muestran similitudes tanto en humana como perras.

En Veterinaria no se ha confirmado la utilidad de estos marcadores moleculares y biológicos y por tanto no se consideran como factores pronósticos establecidos y clínicamente útiles.

A continuación se describen algunos de ellos, especialmente aquellos que funcionan como diana en terapias anticancer y que tienen especial importancia en medicina comparativa.

2.2.7.2.1.- Receptores hormonales

En humana, los receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP) han sido de los primeros factores moleculares en utilizarse en la práctica clínica (Rosai, 1996) ya que contribuyen en la regulación de la proliferación y diferenciación celular mamaria y, sobre todo, son imprescindibles para la selección de pacientes que se beneficiaran de un tratamiento hormonal mejorando el pronóstico y supervivencia de las enfermas (Mauriac y cols., 1989; Rosai, 1996; Allred y cols., 1998; Masood, 2005; Knoop y cols., 2007). Además, las pacientes con carcinoma de mama hormonodependiente (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 y cols., 1989; Rosai, 1996; Allred y cols., 1998; Masood, 2005; Knoop y cols., 2007).

En la perra se conocen menos datos que en la mujer sobre este tema pero sí se ha comprobado que algunos carcinomas de mama tienen receptores hormonales (MacEwen y cols., 1982; Elling, 1983; Martín y cols., 1984; Rutteman y cols., 1988; Donnay y cols., 1989; Rutteman, 1990; Sartin y cols., 1992; Donnay y cols., 1993). El valor de los receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RP) como marcador predictivo de respuesta favorable a terapia endocrina no se ha estudiado en los tumores de mama caninos a excepción de un estudio (Guil-Luna y cols., 2011). Por tanto, el análisis de RE y RP no se realiza como rutina en perras con tumores de mama al contrario que en la mujer que sí se usan como marcadores pronósticos y predictivos de respuesta a tratamiento endocrino (Hammond y cols., 2010).

Todos los autores están de acuerdo en que los valores de RE y RP son bajos en los tumores de mama malignos en la perra (Nieto y cols., 2000; Martín de las Mulas y cols., 2005; Millanta y cols., 2005; Yang y cols., 2006; Chang y cols., 2009; Morris y cols., 2009). Sin embargo el porcentaje de tumores positivos varía en la literatura. Dependiendo de los estudios, los carcinomas de mama caninos benignos fueron positivos a RE en 17,02% (Klopfleisch y cols., 2010), 49% (Martín de las Mulas y cols., 2005), 65,22% (Morris y cols., 2009) 95,5% (Millanta y cols., 2005), 95,8% (Chang y cols., 2009) y 100% (Yang y cols., 2006) de los casos, respecto a los carcinoma de mama malignos osciló entre un 10% (Illera y cols., 2006), 12,96% (Klopfleisch y cols., 2010), 22% (Martín de las Mulas y cols., 2005), 46,52% (Morris y cols., 2009), 50,6% (Chang y cols., 2009), 58,3% (Gama y cols., 2008), 67% (Yang y cols., 2006) y 92,3% (Millanta y cols., 2005). Resultados similares se obtuvieron para el porcentaje de RP

positivo en tumores de mama benignos en 50% (Millanta y cols., 2005), 96% (Martín de las Mulas y cols., 2005) y 100% (Chang y cols., 2009), y en malignos 23,80% (Millanta y cols., 2005), 66% (Martín de las Mulas y cols., 2005) y 71,9% (Chang y cols., 2009).

Los factores que pueden ser responsables de estos cambios incluyen métodos de detección y tipo de sistema de clasificación usado. Pocos artículos han estudiado la expresión combinada de RE y RP (Martín de las Mulas y cols., 2005, Chang y cols., 2009) o su expresión según los subtipos histológicos de tumores de mama caninos tanto en perras esterilizadas como enteras (Mainenti y cols., 2014). Kim y cols. (2014) realizan el primer estudio que evalúa los tumores de mama caninos RE⁻/RP⁺ según la expresión génica de RE. Categorizan los tumores de mama caninos de acuerdo al fenotipo de RE/RP mediante inmunohistoquímica y evalúan las características clinicopatológicas de los diferentes fenotipos tumorales revelando que aquellos tumores RE⁻/RP⁺ se clasifican en nivel pronóstico intermedio entre los tumores RE⁺/RP⁺ y RE⁻/RP⁻.

En humana, se ha establecido un umbral a partir del cual se asegura la efectividad del tratamiento hormonal y se ha establecido en 1% ya que a ese nivel de expresión de receptores hormonales la paciente todavía responde a tratamiento hormonal (Fitzgibbons y cols., 2010; Hammond y cols., 2010). En perras ese umbral no se ha establecido y son escasas las referencias en las que se ha analizado el valor pronóstico de la presencia de receptores de estrógenos (Nieto y cols., 2000) y estrógenos y progesterona (Martín de las Mulas y cols., 2005; Millanta y cols., 2005; Chang y cols., 2009) en el carcinoma de mama canino, con resultados inmunohistoquímicos contradictorios.

2.2.7.2.2.- HER-2

Se trata de un protooncogén localizado en el cromosoma 17q21 que codifica un receptor de la tirosina-quinasa transmembrana (ERB2 o p185) que comparte una similitud con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

En las mujeres con cáncer, la expresión de HER2 se usa como factor pronóstico y predictivo rutinario (Payne y cols., 2008). Está sobreexpresado aproximadamente en el 30% de los tumores de mama en la mujer y se asocia a un comportamiento agresivo como desarrollo de metástasis, sensibilidad a terapias sistémicas y resistencia al tratamiento (Slamon y cols., 1987; Revillion y cols., 1998; Yamauchi y cols., 2001; Burstein, 2005).

En perras, la expresión de HER2 en tumores de mama es incierta. Existen estudios pero con resultados muy variados. En 1996, Ahern y colaboradores establecen que los tumores de mama caninos benignos no mostraban niveles de HER2 en ARNm mientras que muchos de los tumores malignos sí, concluyendo que HER2 puede empeñar un papel importante en la progresión de este tumor. Estudios posteriores no han llegado a un consenso en cuanto a la relación entre sobreexpresión de HER2 y malignidad de

tumores de mama, variando de 17.6% a 48% (*Rungsipipat y cols., 1997; Martín de las Mulas y cols., 2003; Gama y cols., 2008; Sassi y cols., 2010; Im y cols., 2013;*), ni a un valor pronóstico (*Martín de las Mulas y cols., 2003; Dutra y cols., 2004; Gama y cols., 2008; Hsu y cols., 2009; Ressel y cols., 2013*).

En humana, existen técnicas inmunohistoquímicas para HER2 estandarizadas. El primer método inmunohistoquímico aprobado por *Food and Drug Administration* (FDA) en Estados Unidos para determinar la expresión de HER2 fue HercepTest™ (DAKO, Glostrup, Dinamarca). Internacionalmente también se aceptó el sistema de evaluación para HER2 (HercepTest scoring) (*Wolff y cols., 2007*).

Peña y cols. (2014) proponen tomar como referencia el protocolo establecido para humana de *Wolff y cols. (2007)* con el objeto de estandarizar las técnicas inmunohistoquímicas para HER2 en los tumores de mama caninos (Tabla II). Aún así, es fundamental realizar más estudios con anticuerpos específicos que permitan estudiar el valor pronóstico de este oncogén en la especie canina (*Burrai y col., 2015*).

Tabla II. Interpretación de inmunohistoquímica para HER2 en tumores de mama: propuesta basada en el sistema aplicado en cáncer de mama en humana.

Clasificación ^a IHC	Criterios de interpretación
3+	Marcaje de membrana completo, intenso y homogéneo en > 30% de las células.
2+	Marcaje de membrana completo, intenso en ≤ 30% de las células.
0-1+	Marcaje de membrana débil o moderado y heterogéneo en al menos el 10% de las células. No marcaje de membrana (0) débil ó, incompleto (1+) en cualquier porcentaje de las células.

^a De acuerdo con la guía propuesta por la Sociedad Americana de Oncología Clínica/Colegio de Patólogos Americanos. Solo los tumores 3+ se consideran positivos (*Wolff y cols., 2007*).

2.2.7.2.3.- 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 y cols., 1991; Hellmén y cols., 1993; 1995; Pérez Alenza y cols., 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 y cols., 1997; Peña y cols., 1998; Queiroga y cols., 2001*) y la técnica del AgNOR para determinar el número de regiones organizadoras del nucléolo (*Bostock y cols., 1992; Destexhe y cols., 1995; Löhr y cols., 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 y cols., 2006; Morris y cols., 2009*) y la continuidad de la barrera de células mioepiteliales (*Sánchez-Céspedes y cols., 2011*).

2.2.7.2.4.- Gen supresor de tumor p53

El gen supresor de tumor p53 juega un papel muy importante en el control del crecimiento celular después de producirse daños en el ADN. Cuando existe mutación en este gen, se altera la regulación de proliferación celular, con lo que se ve favorecida la formación tumoral (*Velculescu y cols., 1996*). En mujeres con cáncer de mama, la inmunexpresión de proteína nuclear p53 acumulada, indicativo de mutación de este gen, parece tener un valor pronóstico negativo (*Kim y cols., 2010; Beenken y cols., 2001*). En tumores de mama caninos, también se reconoce el valor pronóstico de las mutaciones del gen p53 (*Lee y cols., 2004; Wakui y cols., 2001*). *Veldhoen y cols. (1999)*, identificaron mutaciones del gen p53 en tumores de mama caninos a nivel de exones 2, 4 y 5 y mutación en Ala125Val, coincidiendo con mutación de Ala125Val del gen p53 de humana, sugiriendo una relación entre agresividad y el gen mutado tal y como se demostró en estudios previos en humana.

2.2.7.2.5.- Ciclooxygenasa-2

Existen numerosos estudios que relacionan la actividad de Ciclooxygenasa-2 (COX-2) con desarrollo y progresión tumoral tanto en neoplasias humanas como caninas (*Prescott y cols., 2000*).

El primer estudio sobre expresión de COX-2 en cáncer de mama en la mujer fue publicado en 1998 (*Hwang y cols., 1998*), mientras que la primera evidencia de expresión de COX-2 en tumores de mama caninos no fue hasta 2003 (*Dore y cols., 2003*).

Muchos estudios en humana y veterinaria señalan una mayor expresión de COX-2 en tumores malignos que en benignos mostrando una correlación entre la expresión de COX-2 y angiogenesis, desarrollo de metástasis a distancia, peor pronóstico y cortos periodos de supervivencia (*Costa y cols., 2002; Ristimaki y cols., 2002; Denkert y cols., 2003; Spizzo y cols., 2003; Boland y cols., 2004; Queiroga y cols., 2005; Millanta y cols., 2006a; Lavalley y cols., 2009; Queiroga y cols., 2010; Queiroga y cols., 2011*).

El carcinoma inflamatorio de mama es un tipo de tumor de mama canino muy agresivo que comparte similitudes clínicas e histológicas con el cáncer inflamatorio de mama en la mujer (*Queiroga y cols., 2005 y Vermeulen y cols., 2010*) y que presenta los

niveles de COX-2 más altos de todas las neoplasias mamarias malignas (Queiroga y cols., 2005; Souza de M. y cols., 2009, Clemente y cols., 2013).

2.2.7.2.6.- EGFR

Los receptores de factores de crecimiento epidermal como EGFR y receptores de factores de crecimiento epidermal humano (HER)-1 o c-erbB1 se incluyen en la familia de los Receptores de Factores de Crecimiento Epidermal Humano (HER) y reciben especial atención en la literatura humana aunque con resultados contradictorios (Lewis y cols., 1990; Klijn y cols., 1992; Walker y Dearing, 1999 y Tsutsui y cols., 2002). EGFR fue el primer receptor tirosina-quinasa identificado y relacionado con la aparición de neoplasias en humana (Hynes y Lane, 2005). También participa en la proliferación celular, angiogénesis, metástasis y crecimiento tumoral (Shien y cols., 2005). En mujeres con cáncer de mama está asociado con aumento de tamaño del tumor, estatus ganglionar, alto índice proliferativo, alto grado histológico y peor desarrollo clínico (Klijn y cols., 1992, Walker y Dearing, 1999 y Tsutsui y cols., 2002). En los tumores de mama caninos, los estudios sobre EGRF son escasos, pero sugieren una relación entre expresión de este receptor y agresividad (Gama y cols., 2009).

2.2.7.2.7.- VEGF

El descubrimiento de la familia de factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y sus receptores (VEGFR) supuso un importante paso para entender la angiogénesis tumoral y para desarrollar terapias antiangiogénicas.

Varios estudios definen la densidad microvascular intratumoral (DMT) como un estimador frecuente de la angiogénesis tumoral, presentando altos niveles en los carcinomas de mama caninos menos diferenciados (Griffey y cols., 1998; Restucci y cols., 2002; Millanta y cols., 2006b; Queiroga y cols., 2011). Sin embargo, otros artículos no reportaron diferencias en los niveles de DMT en tumores de mama benignos y malignos (Graham and Myers, 1999). Por otra parte se ha asociado la DMT con la expresión de EGFR, sugiriendo como terapias alternativas inhibidores de estos receptores (Carvalho y cols., 2013).

Existen resultados contradictorios en cuanto a los niveles de VEGF en tumores de mama caninos, mientras que unos autores asocian el incremento de VEGF con tumores de mama malignos, tumores con altos niveles de DMT, expresión COX-2, carcinoma inflamatorio de mama y tumores de alto grado (Restucci y cols., 2002; Millanta y cols., 2010; Queiroga y cols., 2011; Camacho y cols., 2014) considerándolo un potente factor pronóstico para la clínica y a la hora de determinar la progresión de neoplasias mamarias caninas (Moschetta y cols., 2015), otros sin embargo no consiguen asociarlo con tipo histológico, grado, DMT, proliferación, tamaño, invasión de vasos linfáticos, metástasis a

distancia o a nódulos linfáticos (Jain, 2005; Millanta y cols., 2006b; Mylona y cols., 2007, Nieto y cols., 2007; Al-Disi y cols., 2010; Santos y cols., 2010, 2013). Estos hallazgos contradictorios pueden ser explicados en parte por los diferentes métodos inmunohistoquímicos de cuantificación usados en varios estudios. Santos y cols. (2010) sugiere que VEGF se expresa en la glándula mamaria normal y que participa en la fisiología de la misma, posiblemente en la exposición cíclica de estrógenos en la glándula.

A pesar de estos resultados, muchos de ellos contradictorios, existe un grupo de perras con tumores de mama que presentan altos niveles de VEGF y que pueden beneficiarse de terapias dirigidas como comentaremos en el correspondiente apartado (Santos y cols., 2014).

2.2.7.2.8.- BRCA2

Se trata de una proteína que juega un papel importante en el mantenimiento de la estabilidad genómica y es la base de la predisposición genética al cáncer de mama. En humana, la baja expresión del complejo BRCA/BRCA2/RAD51 se correlaciona con un alto grado histológico del tumor, sugiriendo una asociación entre la pérdida de estas proteínas y un fenotipo tumoral agresivo (Soderlund y cols., 2007). Se ha demostrado que aquellas mujeres que presentan mutación en BRCA2 tienen una alta probabilidad de desarrollar cáncer de mama a lo largo de su vida (Evans y cols., 2008; King y cols., 2003). Diversos estudios han encontrado una asociación entre tumores de mama caninos y los factores que influyen en la función normal de BRCA2 ya sea inactivación o mutación (Rivera y cols., 2009; Yoshikawa y cols., 2012 y 2015; Ochiai y cols., 2015). Aún así, se requiere mayor número de estudios ya que poco se sabe de la expresión de BRCA2 en los tumores de mama caninos.

2.2.8.- Tratamiento

2.2.8.1.- Quirúrgico

Hasta la fecha, la cirugía es el tratamiento de elección para los tumores de mama caninos. La cirugía está contraindicada en caso de carcinoma inflamatorio de mama y de manera parcial en perras con metástasis subclínicas, pero debe considerarse una opción perfectamente válida en aquellas en que un tumor primario resecable deteriora la calidad de vida del paciente de manera más inminente y clara que dichas metástasis (Misdorp 2002; Veterinary Society of Surgical Oncology [VSSO]).

La escisión quirúrgica puede ser curativa si los márgenes son limpios y siempre que se realice antes de que el cáncer se haya diseminado. Además permite realizar el análisis histopatológico y obtener el diagnóstico definitivo (Fossum y Hedlund, 1997). El

abordaje quirúrgico dependerá del tamaño del tumor, localización y estado del paciente (Fossum y Hedlund, 1997).

Los pros y contras de cirugía radical versus escisión local han sido debatidos desde hace años (Misdorp y cols., 1979; Brodey y cols., 1983; Ferguson, 1985; Moulton, 1990; Rutteman, 2005; Stratmann y cols., 2008). En un estudio prospectivo de 144 perras no se halló diferencia de supervivencia ni recidiva de la enfermedad entre las perras a las que se les realizó mastectomía simple y de cadena mamaria completa (MacEwen y cols., 1985). Los partidarios de mastectomías completas de la cadena mamaria argumentan que esta técnica es la más apropiada para eliminar todo el tumor y reduce riesgos de recidivas o nuevos tumores al disminuir el volumen de tejido mamario en riesgo. Además se apoyan en el hecho de que muchas de las lesiones benignas tienen alto riesgo de desarrollar cáncer invasivo, por lo que consideran que la cirugía agresiva es la técnica de elección (Gilbertson y cols., 1983). En un estudio realizado a 99 perras enteras a las que se le practicó mastectomía regional para tumores solitarios en mama se observó que el 58% desarrollaron tumores de mama en la cadena ipsilateral y concluyen con que la mastectomía radical también sería la mejor opción para los tumores de mama (Stratmann y cols., 2008).

Aunque la mastectomía se asocia en muchos artículos a una baja morbilidad, en aquellos casos en los que la cirugía afecta a un mayor número de mamas, como mastectomías unilaterales o radicales, debe considerarse como una cirugía agresiva que puede causar dolor moderado o severo. Las complicaciones postoperatorias son frecuentes, especialmente en aquellos casos de cirugías más amplias (Polton, 2009). Procedimientos agresivos con incisiones y resecciones extensas se asocian con mayor estrés nociceptivo y postoperatorio y mayor incidencia de complicaciones postoperatorias, comprometiendo la calidad de vida del paciente (Horta y cols., 2015). Estas cirugías se realizan frecuentemente de manera profiláctica sin una indicación clínica adecuada o beneficio evidente (Sorenmo y cols., 2003 y 2013).

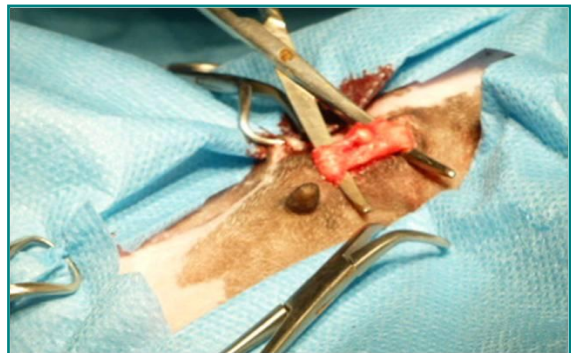
Según las recomendaciones de la VSSO, el principal objetivo de la cirugía de tumores de mama debe ser eliminar cuanto antes todo el tejido tumoral independientemente de las mamas afectadas, utilizando el procedimiento quirúrgico más simple, pues el retraso en la eliminación de tejido tumoral a cambio de la extirpación de mamas sanas puede dar lugar a la malignización de lesiones o a la diseminación de las mismas (MacEwen y cols., 1984; Allen y cols., 1989; Chang y cols., 2005; Sorenmo y cols., 2013).

La elección de la técnica quirúrgica se determina en función del tamaño del tumor, si la lesión está adherida al tejido que lo rodea, número de lesiones y extensión al sistema linfático y probabilidad de conseguir control local del tumor (MacEwen y cols., 1984; Allen y cols., 1989; Chang y cols., 2005 y Nimwegen y cols., 2012; Sorenmo y cols., 2013).

A continuación se detallan las técnicas quirúrgicas según la VSSO y que incluyen biopsia escisional o nodulectomía, mastectomía local, mastectomía regional, mastectomía unilateral y mastectomía bilateral simultánea o en dos fases.

Nodulectomía o biopsia escisional. Está indicada en lesiones pequeñas (menos de 0,5 cm), firmes, superficiales, no adheridas (*MacEwen y cols., 1984; Chang y cols., 2005 y Nimwegen y cols., 2012*). Esta técnica no se debe usar en lesiones con diagnóstico previo maligno. Se realiza incisión en la piel y se diseña el nódulo con un margen de tejido sano (Figura 5). En caso de diagnóstico maligno de la lesión pero circunscrita y de pequeño tamaño se pueden ampliar los márgenes.

Figura 5. Nodulectomía.
Obsérvese el margen de tejido sano adyacente a la lesión.



Mastectomía simple. Consiste en la extirpación de una sola glándula mamaria. Se realiza dos incisiones elípticas a ambos lados de la mama afectada (Figura 6 y 7). Está indicada en lesiones de más de 1 cm localizadas en el centro de la mama, y parcialmente fijadas a fascia muscular o piel. La piel y fascia afectadas deberían ser resecadas conjuntamente con la masa y la mama (*MacEwen y cols., 1984; Chang y cols., 2005, Nimwegen y cols., 2012*).

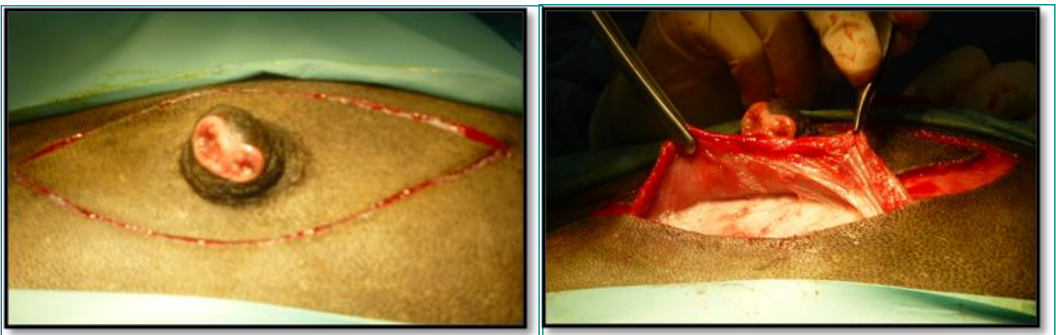


Figura 6 y 7. Mastectomía simple. Obsérvese la incisión elíptica en la piel a ambos lados de la mama afectada por tumor ulcerado (*izquierda*) y la disección del subcutáneo y piel con elevación del tejido mamario (*derecha*).

Mastectomía regional. Indicada en casos en los que tumores de mama de gran tamaño están localizados en mamas consecutivas o si está localizado entre dos mamas (Figura 8 y 9). Se basa en el concepto de que las glándulas mamarias comparten drenaje venoso y linfático y se pueden resear como una unidad con el linfonodo ipsilateral local (MacEwen y cols., 1984; Allen y cols., 1989; Chang y cols., 2005; Patsikas y cols., 2006). Según la localización del/los tumores las mamas serán extirpadas de 1 a 3 y 3 a 5 con el linfonodo inguinal como un solo bloque. La escisión del linfonodo local ipsilateral nos permite valorar si es positivo y por tanto determinar el pronóstico de la enfermedad (Chang y cols., 2005).

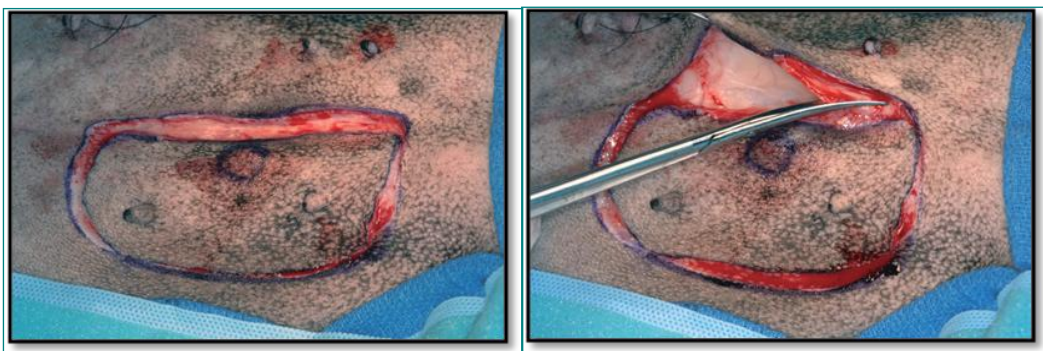
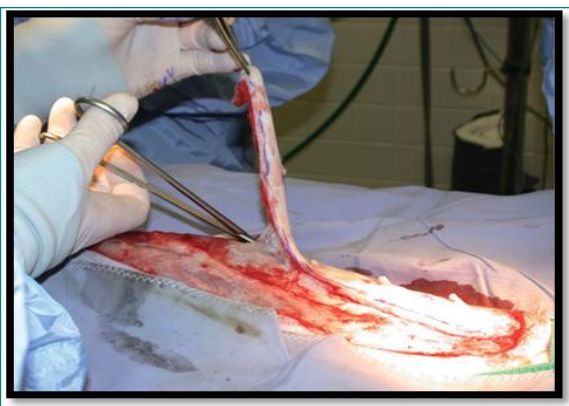


Figura 8 y 9. Mastectomía regional. Incisión elíptica de las mamas afectadas (izquierda). Disección lateral tomando margen de tejido sano (derecha). Karen M. Tobias (2010). *Manual of Small Animal Soft Tissue Surgery*.

Mastectomía unilateral. Se trata de resear una cadena completa como un único bloque en los casos en los que existen 2 o más tumores a lo largo de una cadena (MacEwen y cols., 1984 y Chang y cols., 2005). La incisión elíptica se realiza craneal a la mama 1 y se prolonga caudal a la mama 5 cerca de la vulva (Figura 10). Su ventaja es



una única incisión que comparada con múltiples nodulectomías o mastectomías se realiza en menor tiempo pero no presenta una mayor supervivencia comparada con las otras técnicas (Lana y cols., 2007).

Figura 10. Mastectomía unilateral. Elevación de la cadena mamaria afectada previa disección de piel y subcutáneo. Karen M. Tobias (2010). *Manual of Small Animal Soft Tissue Surgery*.

Mastectomía bilateral en dos fases. Consiste en realizar mastectomía unilateral y en un periodo de 4-6 semanas intervenir la otra cadena mamaria afectada (Stone, 2000). La ventaja de esta técnica es que el cierre del defecto creado es más fácil y rápido que una mastectomía bilateral simultánea. Por el contrario supone 2 cirugías y por tanto anestesia general en un periodo de tiempo muy corto.

Mastectomía bilateral simultánea. Resección elíptica de las dos cadenas mamarias como un único bloque en aquellos casos en los que los tumores mamarios se encuentran en ambas cadenas (Bartels y cols., 1978) (Figura 11). Su ventaja al igual que la técnica anterior es una única incisión que comparada con múltiples nodulectomías o mastectomías se realiza en menor tiempo pero tampoco presenta una mayor supervivencia comparada con las otras técnicas. La mastectomía bilateral profiláctica no es una técnica recomendada por su carácter invasivo y elevada agresividad, asociada a mayor morbilidad postoperatoria en pacientes sanos. Una mejor opción sería la detección temprana de las nuevas lesiones e intervenciones inmediatas para conseguir control local del tumor (Papazoglou y cols., 2006).



Figura 11. Mastectomía radical.
Disección lateral tomando
tejido sano como margen

Resección de linfonodo axilar e inguinal. El linfonodo axilar raramente está afectado en perras con tumores de mama y no se reseca como medida de prevención, solo en los casos en los que esté aumentado de tamaño y adherido en cuyo caso debe extirparse por una incisión diferente de la de la mastectomía. El linfonodo inguinal superficial se extirpa cuando está aumentado o si se realiza mastectomía de la 5ª mama ya que está íntimamente unido a ésta (Tuohy y cols., 2009).

2.2.8.2.- Tratamiento quimioterápico

Actualmente la quimioterapia se usa en perras con tumores de mama malignos como terapia adyuvante a la cirugía, como tratamiento paliativo al carcinoma inflamatorio de mama o en estadios avanzados con metástasis evidentes (Hortobagyi 2001, Karayannopoulou y cols., 2001; Sorenmo 2003; Simon y cols., 2006). Sin embargo, su

uso tampoco está extendido, ya que existe información muy limitada sobre su eficacia y efectos adversos en esos casos (Lana y cols., 2007). Varios quimioterápicos han sido utilizados en perras afectadas de tumores de mama malignos (Karayannopoulou y cols., 2001; Poirier y cols., 2004; Simon y cols., 2006; Marconato y cols., 2008; Clemente y cols., 2009; Domínguez y cols., 2009; Souza de M. y cols., 2009). Muchos de ellos no mostraron ningún resultado o presentaron alta toxicidad. El uso de ciclofosfamida en combinación con 5-fluorouracilo (Karayannopoulou y cols., 2001) o con mitoxantrona y vincristina (Clemente y cols., 2009) incrementó significativamente el tiempo de supervivencia con pocos efectos adversos, sin embargo el número de pacientes fue muy reducido en ambos estudios, contando con 8 perras en el estudio de Karayannopoulou y cols. (2001) y 7 en el de Clemente y cols. (2009). La combinación de ciclofosfamida y doxorrubicina con o sin 5-fluorouracilo en perros con carcinoma inflamatorio de mama causó graves efectos adversos y no pudo ser calculada la eficacia del tratamiento (Souza de M. y cols., 2009).

Altas dosis de paclitaxel dieron una respuesta parcial del 20% en perras con carcinoma de mama pero con una toxicidad inaceptable (Poirier y cols., 2004).

Simon y cols. (2006) hicieron uso de otro taxano, docetaxel, y registraron menos efectos adversos a una dosis inferior. En este mismo estudio no hallaron diferencias significativas en el periodo libre de enfermedad, aparición de metástasis y supervivencia global en pacientes tratados con docetaxel o con doxorrubicina.

El tratamiento con gemcitabina en carcinomas de mama agresivos fue bien tolerado pero no ofreció diferencia en tiempo de recidiva, tiempo de metástasis a distancia y supervivencia global comparado con cirugía como único tratamiento (Marconato y cols., 2008). Domínguez y cols. (2009) usaron una combinación de gemcitabina y carboplatino para tratar carcinomas de mama consiguiendo una respuesta global del 13% con moderados efectos adversos.

La terapia metronómica o antiangiogénica consiste en la administración de quimioterapia a bajas dosis de manera continua y prolongada en el tiempo siendo eficaz en la reducción del crecimiento tumoral mediante la inhibición de la angiogénesis. Este tipo de terapia resulta útil en perras con tumores mamarios en estadios clínicos III y V (ciclofosfamida a dosis de 12,5-25 mg/m²/24h PO o clorambucilo a dosis de 6-8 mg/m²/48h PO) (Leach y cols., 2011).

Hasta ahora, no hay ningún protocolo de quimioterapia que haya conseguido una buena respuesta y pocos efectos adversos en perras con carcinoma de mama, sobre todo en aquellos casos en los que la cirugía no es una opción o en tumores de alta agresividad. 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 y cols., 2008; Watanabe y cols., 2009; Thamm y cols., 2011).

2.2.8.3.- Desmopresina

Algunas publicaciones sugieren el uso de un análogo sintético de la vasopresina, la desmopresina (1- deamino-8-D- arginina vasopresina, también conocido como dDAVP), que es un fármaco que hipotéticamente es capaz de reducir las metástasis al linfonodo y a pulmón (Hermo y cols., 2008; 2011). La desmopresina es un derivado sintético de la hormona antidiurética con propiedades hemostáticas y que ha sido usada en humana y perros con diabetes insipidus y en la enfermedad de von Willebrand's (Mannucci y Ghirardini 1997; Callan y Giger 2002; Hara y cols. 2003).

El mecanismo de acción de la desmopresina no se conoce con exactitud. Se postula que interfiere en las interacciones recíprocas entre el tumor y las células endoteliales ejerciendo un efecto antimetastásico y apoptótico (Garona y Alonso, 2014). En el tumor produce la conversión proteolítica de plasminógeno en angiostatina que es un potente inhibidor de la angiogénesis (Keegan y cols., 2006; Terraube y cols., 2006; Ripoll y cols., 2008; Ripoll y cols., 2013) y simultáneamente activa la liberación endotelial de factores de von Willebrand que juegan un papel importante contra la diseminación tumoral y puede provocar apoptosis de los focos de micrometástasis (Mannucci y Ghirardini, 1997; Kaufmann y Vischer, 2003).

Cuando se traumatiza el tejido durante la cirugía son liberadas células cancerígenas al torrente circulatorio (Galan y cols., 2002). Es por ello que se han realizado determinados estudios con el objeto de demostrar que la administración de desmopresina perioperatoria en mujeres con cáncer de mama consigue una mejor respuesta y tolerancia tras la cirugía reduciendo precisamente recidivas o metástasis locales tras el tratamiento quirúrgico (Weinberg y cols., 2015).

Hermo y cols. (2008) realizaron un estudio piloto en 21 perras con tumores de mama malignos que serían sometidas a mastectomía y a las que se les administró desmopresina intraoperatoria demostrando un mayor intervalo libre de enfermedad y supervivencia global. Posteriormente, volvieron a analizar los efectos de la desmopresina perioperatoria en un total de 31 pacientes con carcinoma de mama con invasión local y además buscaron la relación con el grado histológico (Hermo y cols., 2011) con resultados muy similares al estudio de 2008. En ninguno de los dos estudios observaron efectos adversos.

2.2.8.4.- Inmunoterapia

Se han llevado a cabo 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 y cols., 1983; MacEwen y cols., 1985) y el "liposome-encapsulated muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine (L-MTP-PE)" (Teske y cols., 1998), sin que ninguno de ellos haya mostrado mejores resultados que la cirugía exclusiva. Otros autores indican efectos favorables *in vitro* del interferón-gamma (Whitley y cols., 1995).

Por otra parte, se han realizado ensayos en la fabricación de vacunas autólogas que tendrían un cierto poder antitumoral (Bird y cols., 2008 y 2011). Desde hace unos años, se ha venido desarrollando una vacuna de ADN basada en la proteína p62 que se sobreexpresa en una variedad de tumores en humana (Thompson y cols., 2003; Kitamura y cols., 2006; Rolland y cols., 2007). Esta vacuna ha demostrado su eficacia en ratones a los que se había inoculado (Venzani y cols., 2013). Recientemente un estudio piloto evaluó la eficacia y toxicidad de la misma administrada por vía intramuscular en perras con tumores de mama. Como resultado las lesiones disminuyeron de tamaño o se mantuvieron estables sin observarse efectos adversos en las pacientes. (Gabai y cols., 2014).

2.2.8.5.- Terapia hormonal

El tratamiento endocrino presenta diferencias entre la especie humana y la canina. Inicialmente el tratamiento hormonal en la mujer se encaminaba a la ablación de fuentes de estrógenos mediante cirugía o radioterapia. En 1896, Beatson fue el primero en realizar una ooforectomía bilateral con tiroidectomía como tratamiento a una paciente con cáncer de mama. Posteriormente se realizaron suprarrenalectomías e hipofisectomías, técnicas hoy en día obsoletas (Huggins y cols., 1953). Actualmente se continúan realizando ooforectomías y radioterapia ovárica, ya que aunque se trata de técnicas irreversibles son relativamente sencillas y el 33% de los casos consigue un control estrogénico de los tumores. Sin embargo, como describiremos a continuación, la introducción de agentes farmacológicos permite un bloqueo reversible y eficaz de la función ovárica.

En humana existen diversas terapias endocrinas que incluyen moduladores de los receptores estrogénicos, inhibidores selectivos de los receptores estrogénicos, inhibidores de aromataasa, liberadores agonistas de la hormona luteinizante, dosis altas de estrógenos y terapias dirigidas (Moy y cols., 2011) que principalmente se usan como tratamiento adyuvante (Howell y cols., 2005; Davies y cols., 2011; Davies y cols., 2013; Gray y cols., 2013; Pagani y cols., 2014; Francis y cols., 2015) aunque su uso también está indicado en enfermedad metastásica (Howell y cols., 2004; Mauri y cols., 2006; Berg

y cols., 2012; Mehta y cols., 2012) y como neoadyuvante (Eiermann y cols., 2001; Smith y cols., 2005; Abrial y cols., 2006; Cataliotti y cols., 2006; Ades y cols., 2014), aunque este último requiere más estudios.

El tamoxifeno es un modulador selectivo de estrógeno indicado en mujeres pre y postmenopáusicas (Jordan, 1992; Yamashita y cols., 2006; Cuzick y cols., 2011). Actualmente es el antiestrógeno más usado en mujeres con cáncer de mama RE positivo (Stuart-Harris y Davis 2010). Éste ejerce una acción antiestrogénica en mama y mucosa vaginal mediante inhibición parcial del proceso de dimerización de los receptores estrogénicos. A su vez, ejerce efecto estrogénico en endometrio (promoviendo hiperplasia endometrial), en coagulación sistémica (favoreciendo tromboembolismos), en hueso (previene osteoporosis) y en el hígado (promueve hepatotoxicidad) (Romagnoli, 2005; Ehrhart 2008).

Los inhibidores de aromatasa bloquean la síntesis de estrógenos mediante la inhibición de la aromatasa (Smith y cols., 2003). Anaastrozol y letrozol son inhibidores de aromatasa no esteroideos cuyo efecto es reversible, mientras que exemestano produce inhibición irreversible de la aromatasa. Principalmente se usa en mujeres postmenopáusicas secuenciado con tamoxifeno (Davies y cols., 2011). Su uso en mujeres premenopáusicas provoca una disminución en la producción de estrógenos periférico que a su vez estimula la producción de estrógenos en ovarios mediante *feedback* negativo (Moy y cols., 2011).

Los agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante suprimen la esteroidogénesis en mujeres premenopáusicas, actuando directamente en la glándula pituitaria. Inicialmente provoca estimulación hormonal y con el tiempo los complejos ligando receptor son secuestrados dentro de la célula reduciendo el número de receptores en superficie con lo que la estimulación hormonal cae, produciéndose un estado postmenopáusico.

Recientemente se han combinado los tratamientos hormonales con terapias dirigidas para evitar resistencia. Everolimus, que es un inhibidor de rapamicina, y palbociclib y LEE011, ambos inhibidores de ciclina D quinasa, son los más usados (Moy y cols., 2011).

En la perra, datos experimentales, clínicos y epidemiológicos indican que los tumores de mama caninos son hormonodependientes, es decir, influenciados por las hormonas ováricas principalmente estrógenos y progesterona (Sorenmo y cols., 2013).

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 y cols., 1996a; Morris y cols., 1998; Philibert y cols., 2003), pero ya había estudios previos en el mismo sentido (Brodey y cols., 1966, 1983). Sin embargo, otros autores sí han encontrado un efecto significativo en el tiempo de supervivencia tras la cirugía relacionado con la ovariectomía perquirúrgica (Soremno y cols., 2000; Chang y cols., 2005) o reducción significativa en la aparición de nuevos tumores (Kristiansen y cols., 2013).

Teóricamente, las perras con tumores de mama hormonopositivos se deberían beneficiar de fármacos antiestrogénicos (Rassnick 2005). Sin embargo, la tendencia generalizada es desaconsejar su uso por la ineficacia antitumoral y/o los efectos secundarios del tratamiento con antiestrógenos (Morris y cols., 1993; Lana y cols., 2007).

En Veterinaria se han estudiado las hormonas liberadoras de hormona luteinizante (LHRH) agonistas y antiestrogénicas en perras con tumores de mama. La goserelina, que como hemos comentado anteriormente, es un tratamiento efectivo en mujeres con cáncer de mama hormonodependiente (Bajetta y cols., 1994), ha demostrado en un estudio en un grupo de 18 perras con carcinoma de mama hormonodependiente resultados similares (Lombardi y cols., 1999). La mitad de las perras se trataron con 60 µ/kg de goserelina cada 21 días durante 12 meses, mientras que la otra mitad control no recibió tratamiento. En las perras tratadas con goserelina hubo una reducción de estradiol y progesterona circulante así como el tamaño de los tumores. Tras 2 años el periodo libre de enfermedad fue de 88% y no hubo efectos adversos importantes.

La aglepristona es un antagonista de los RP usado en perras como inductor de aborto o del parto (Baan y cols., 2005) y para tratar piómetra (Fieni, 2006). En publicaciones más recientes se ha descrito que administrado como neoadyuvante en perras no esterilizadas con carcinomas de mama positivos a RP tiene efectos antiproliferativos reduciendo la proliferación celular principalmente en los carcinomas simple epiteliales (Guil-Luna y cols., 2011). Por otro lado se han hecho estudios *in vitro* para valorar otros antiprogestágenos como posible tratamiento para los tumores de mama (Guil-Luna y cols., 2014).

La administración oral de melatonina parece ejercer un efecto oncostático en las neoplasias mamarias y su mecanismo de acción puede estar relacionado con su interacción con los receptores de estrógenos en las células epiteliales. Basándose en esto, Lopes y cols. (2015) analizaron el ratio de proliferación celular y apoptosis tras el tratamiento con melatonina en cultivos celulares de tumores de mama caninos. Los resultados mostraron una disminución en la viabilidad y proliferación celular de los tumores tras el tratamiento, sobre todo en aquellos tumores positivos a RE.

2.2.8.6.- Radioterapia

Actualmente, no hay información disponible sobre la utilidad de la radioterapia como tratamiento alternativo paliativo a la cirugía en los casos en que el tumor no es susceptible de tratamiento quirúrgico por su tamaño o extensión local (*Lana y cols., 2007*). Según otros estudios se considera tratamiento adyuvante a la cirugía en aquellos casos en los que el tumor no se ha resecado por completo o en enfermedad metastásica (*MacEwen y Withrow, 1996; Novosad 2003; Sorenmo 2003*).

En el carcinoma inflamatorio sí se ha utilizado y proporciona remisiones a corto plazo (*Madewell y Theilen 1987; Lana y cols., 2007*).

2.2.8.7.- Inhibidores de COX-2

Como comentamos en el apartado correspondiente a factores pronósticos, se ha demostrado que los niveles de COX-2 son mayores en los carcinomas de mama malignos en comparación con benignos y con tejido mamario normal (*Dore y cols., 2003; Millanta y cols., 2006; Queiroga y cols., 2007*). Esta expresión se asocia con una proliferación y diferenciación celular descontrolada, inhibición de la apoptosis, incrementada angiogénesis y mayor incidencia de metástasis (*Williams y cols., 1999*).

El piroxicam es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE), comúnmente usado en osteoartritis aunque también es efectivo en el tratamiento de diversos tumores caninos (*Knapp y cols., 1994, 2000, 2002; Dore y cols., 2003; Mohammed y cols., 2003; Millanta y cols., 2006; Queiroga y cols., 2007; Lavalley y cols., 2009; Queiroga y cols., 2010*). En un estudio *in vitro* el piroxicam a altas concentraciones fue capaz de inhibir la proliferación del carcinoma de mama. Sin embargo, cuando las dosis se redujeron para evitar graves efectos adversos no se consiguió una reducción en el crecimiento celular (*Knottenbelt y cols., 2006*). En otro estudio retrospectivo se valoró la respuesta de perras con carcinoma inflamatorio de mama a diferentes tratamientos. Aquellas tratadas únicamente con piroxicam (0,3mg/kg una vez al día) mostraron una mejor calidad de vida y supervivencia al comparar con perras tratadas con quimioterapia. Sin embargo no se observó un efecto sobre la progresión tumoral (*Souza de M. y cols., 2009*).

Deracoxib es un inhibidor selectivo de COX-2 para el tratamiento del dolor e inflamación asociado a la osteoartritis y cirugía ortopédica en perros (*Cox y cols., 2005*). Según *Sonzogni y cols. (2011)* fue capaz de reducir el crecimiento de carcinomas de mama caninos inoculados a ratones.

Se ha demostrado que la asociación entre el celecoxib (un antagonista selectivo de COX-2) y el cetuximab (un anticuerpo monoclonal anti EGFR) disminuye significativamente el desarrollo de metástasis en ratones con carcinomas mamarios

(Gupta y cols., 2007). Un estudio reciente propone al celecoxib como nueva estrategia para el tratamiento de los tumores de mama caninos al inducir la apoptosis de células tumorales de mama canina *in vitro*, incluso en mayor medida que el meloxicam o etodolac (Saito y cols., 2014). Otro estudio señala su capacidad de inhibición de la proliferación en células de tumores mamarios caninos que expresaran bajos niveles de COX-2 mediante vías independientes de la enzima COX-2 (Tamura y cols., 2015). Se observó que el celecoxib disminuía la proporción de células en la fase S e incrementaba la detención del ciclo celular en G2/M, lo que se asocia a un aumento en la expresión de los inhibidores dependientes de ciclina quinasa (CDKIs) p21 y p27. Además disminuyó la expresión de COX-2 e indujo la apoptosis celular vía intrínseca y extrínseca.

Como consecuencia de estos estudios y a pesar de que proponen el uso de inhibidores de COX-2 solos o en combinación con quimioterapia, se requiere un mayor número de investigaciones que confirmen la respuesta tumores de estos AINEs *in vivo*.

2.2.8.8.- Inhibidores tirosina quinasa

Algunos marcadores característicos del cáncer son mediados por unas proteínas específicas denominadas tirosina quinasa. Estas proteínas desencadenan una señal en cascada intracelular en respuesta a un factor extracelular o por autoactivación (Anreddy y cols., 2014).

Toceranib y masitinib son dos inhibidores de tirosina quinasa (ITKs) aprobados para su uso específicamente en Medicina Veterinaria. En 2009, la Administración Federal de Fármacos de Estados Unidos (FDA) aprobó el uso de toceranib para el uso en perros y un año más tarde se comercializó en Europa. El uso de masitinib se aprobó desde finales de 2008 en Europa y no fue hasta 2010 cuando se aprobó su uso de manera condicional por la FDA en Estados Unidos. En el ensayo clínico original para valorar la respuesta de toceranib sobre distintos tipos de tumores sólidos se observó que en el grupo más numeroso de pacientes, los afectados por mastocitoma, había una mayor respuesta al fármaco (London y cols., 2003) y como consecuencia se realizaron más estudios clínicos con el objeto de registrarlo como tratamiento para los mastocitomas. London y cols. (2003), en ese mismo estudio, observaron en el caso de pacientes con metástasis pulmonar de tumores de mama una respuesta biológica del 80% (2/5 remisión parcial y 2/5 enfermedad estable). Con posterioridad se han realizado estudios del uso de toceranib en otros tipo de tumores caninos (London, 2013; Bonkobara, 2015) y se investiga el uso combinado de ITK con fármacos citotóxicos (London, 2013). Un estudio *in vitro* describió al masitinib como un potente sensibilizador de las células de carcinoma de mama canino cuando se usa en conjunto con gemcitabina (Thamm y cols., 2012).

Los inhibidores de tirosina quinasa se consideran terapias moleculares útiles y se espera que en el futuro se realicen más ensayos que permitan evaluar los beneficios de estos y otros como tratamiento único o en combinación con otros fármacos sobre los tumores de mama caninos.

2.2.8.9.- Viroterapia oncolítica

Se trata de una de las terapias prometedoras para el cáncer. Se basa en la capacidad que tienen los virus oncolíticos para infectar y destruir las células cancerígenas sin causar excesivo daño en las células del tejido sano. La replicación de estos virus tiene lugar en las células tumorales infectadas provocando la lisis celular y liberación del virus para infectar otras células tumorales.

Muchos de los virus oncolíticos son modificados genéticamente para reducir su patogenicidad y hacerlos específicos para los tumores. Otros como los reovirus o myxoma virus presentan actividad oncolítica sin modificación genética (McNeil y cols., 2012; Urbanice y cols., 2012; Hwang y cols., 2013).

Algunos adenovirus caninos y humanos, el virus de moquillo canino y cepas del virus vaccinia han sido estudiados con éxito en ensayos preclínicos para terapia contra un cáncer en perros (Patol, y cols., 2012; Cecil y cols., 2014; Gentschev y cols., 2014; Adelfinger y cols., 2015). Un estudio reciente sugiere el alto poder oncolítico que los reovirus sobre cultivos celulares de tumores de mama caninos, melanoma y osteosarcoma (Igase y cols., 2015).

A pesar de ésto, son necesarios más estudios para comprender con exactitud el mecanismo por el que estos virus inducen la muerte celular y, además, evaluar el efecto sinérgico entre la viroterapia oncolítica y quimioterapia.

2.2.8.10.- Estatinas

Las estatinas han sido usadas como tratamiento terapéutico y preventivo en enfermedades cardiovasculares ya que se trata de un potente bloqueante de la síntesis de colesterol. Estudios preclínicos con determinados tipos de cáncer demuestran su posible efecto como agente anticancerígeno. Diversos ensayos han estudiado, con prometedores resultados, los potentes efectos que ejercen las estatinas en la carcinogénesis. Recientemente, se han realizado estudios sobre diversas neoplasias malignas como carcinoma hepatocelular, cáncer colorectal y esofágico (Singh y cols., 2013; Alexandre y cols., 2014; Liu y cols., 2014). Otros señalan que las estatinas podrían ser útiles en la prevención de recidiva y mejora de supervivencia en pacientes que sufren cáncer de mama (Bonovas y cols., 2014).

Los efectos de la simvastatina, un tipo de estatina lipofílica, han sido evaluados recientemente en cultivos celulares de tumores de mama caninos. Como resultado consiguen una disminución en actividad e invasión celular y un efecto sinérgico al combinarla con doxorubicina (*Torres y cols., 2015*).

2.2.8.11.- Criterios para evaluar la respuesta al tratamiento

En humana, los criterios de evaluación de la respuesta en tumores sólidos (RECIST) fueron introducidos en el año 2000 por un grupo internacional de trabajo para estandarizar y simplificar los criterios de respuesta de los tumores y se actualizaron en 2009 (*Eisenhauer y cols., 2009*).

En Medicina Veterinaria, no existe una guía estandarizada para calcular la respuesta al tratamiento en tumores sólidos y así saber si mantener un tratamiento o suspenderlo evitando posibles toxicidades y gastos innecesarios. Basándose en los cambios de tamaño se ha usado los criterios RECIST ya que se trata de una guía fácil de usar, reproducible y aplicable a la Oncología Veterinaria (cRECIST) (*Nguyen y cols., 2013*). Esta guía es recogida por el Grupo de Oncología Cooperativa Veterinaria (VCOG) a partir de las recomendaciones del subcomité del Colegio Americano de Medicina Interna Veterinaria (ACVIM).

Mediante controles sucesivos se reevalúan las lesiones diana y se realiza repetidamente la suma de sus diámetros mayores. Se considera respuesta completa (RC) a la desaparición de la enfermedad medible y evaluable, sin que aparezcan nuevas lesiones, ausencia de síntomas y normalización de marcadores durante al menos 4 semanas. Hablamos de respuesta parcial (RP) cuando la suma de los diámetros de las lesiones diana se reduce al menos 30%. Hay progresión de la enfermedad (PE) cuando estos aumentan un 20%, se produce un incremento absoluto de, al menos, 5 mm (en la suma de los diámetros de las lesiones diana) o aparecen nuevas metástasis o progresan las lesiones no diana. La enfermedad estable (EE) significa que no hay suficiente reducción o suficiente incremento para considerar o una respuesta completa o una progresión de la enfermedad. Se define como respuesta global (RG) a la mejor respuesta después de iniciado el tratamiento antes de que recidive o progrese la enfermedad.

Los criterios RECIST permiten la evaluación estandarizada de los pacientes con neoplasias sólidas (lesiones dianas y metástasis) desde su diagnóstico, evolución y para estadificar la respuesta al tratamiento.

2.2.9.- Carcinoma inflamatorio de mama

Se trata de un tipo de carcinoma de mama del que existe escasa información en la literatura. Esta neoplasia es extremadamente agresiva localmente, de crecimiento rápido y alto poder metastásico (Kleer y cols., 2000; Pérez Alenza y cols., 2001; Peña y cols., 2003a). Se han descrito dos formas clínicas de carcinoma inflamatorio de mama en perras (Pérez Alenza y cols., 2001; Clemente y cols., 2009); el *carcinoma inflamatorio de mama primario* que es la presentación más agresiva y se desarrolla en pacientes sin historia previa de tumores de mama, y el *carcinoma inflamatorio secundario* que ocurre



en perras que ya presentan tumores de mamas y a su vez se clasifica en *postquirúrgico* y *no postquirúrgico*, según si su aparición es posterior a una escisión quirúrgica de tumor de mama o no, respectivamente. 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 dolor, anorexia, pérdida de peso y debilidad (Figura 12).

Figura 12. Carcinoma inflamatorio de mama. Obsérvese el intenso eritema, edema e inflamación de la piel.

Algunos autores sugieren que el carcinoma inflamatorio de mama se suele producir en la fase lútea del ciclo estral cuando los niveles de progesterona son más elevados, sugiriendo un papel directo o indirecto de esta hormona en la aparición de esta neoplasia (Pérez Alenza y cols., 2001; Peña y cols., 2003a). Las metástasis suelen estar ya presentes en el momento del diagnóstico, con alta incidencia en vejiga de la orina y tracto reproductivo y baja incidencia de metástasis en pulmón, hígado, riñón o hueso (Clemente y cols., 2010). Otros estudios señalan que la mayoría de las metástasis ocurren en linfonodo regional y pulmón (Pérez Alenza y cols., 2001; Souza de M. y cols., 2009).

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 y cols., 2001; Marconato y cols., 2009). Las células tumorales presentan gotas de lípidos cuyo origen puede estar relacionado con secreción de esteroides (Pérez Alenza y cols., 2001; Peña y cols., 2003b). Se pueden identificar muchos tipos histológicos, como carcinomas anaplásicos (Soremno 2003; Souza de M. y cols., 2009; Marconato y cols., 2009),

carcinoma tubular, carcinoma sólido y tumores mixtos malignos (*Pérez Alenza y cols., 2001; Peña y cols., 2003b*).

El porcentaje de VEGF inmunorreactivo en las células tumorales del carcinoma inflamatorio es muy elevado. Ésto puede explicar la alta capacidad angiogénica y poder metastásico de estos tumores (*Millanta y cols., 2010*).

El tratamiento principalmente es paliativo. 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 (*Pérez Alenza y cols., 2001; Clemente y cols., 2010*). La supervivencia es pobre a pesar de realizar tratamiento, contando aproximadamente con 60 días después del diagnóstico (*Pérez Alenza y cols., 2001; Marconato y cols., 2009*).

JUSTIFICACIÓN.

3.- JUSTIFICACIÓN

3.1.- Justificación del estudio

Como vemos en la práctica diaria las neoplasias tienen comportamientos muy distintos. A pesar del conocimiento biológico de los tumores de mama, la elección de técnicas quirúrgicas más o menos agresivas sigue siendo un tema de debate.

Haciendo una revisión acerca del tratamiento quirúrgico para los tumores de mama caninos, la elección del procedimiento quirúrgico se basa en el número, tamaño y localización de las lesiones teniendo siempre en cuenta el drenaje linfático de la o las mamas afectadas. Así, se realiza resección de la mama neoplásica y de las sanas que comparten el mismo drenaje linfático como un único bloque. La idea de realizar cirugías tan radicales de manera injustificada y basándonos en el drenaje linfático poco a poco va desapareciendo. Como observación personal, en los casos de mastectomías radicales que se programan en dos fases quirúrgicas, los propietarios tras la alta morbilidad de la primera cirugía son reticentes a una segunda intervención lo que en muchas ocasiones implica progresión de la enfermedad.

Según algunos estudios el drenaje linfático puede verse alterado cuando existen tumores de mama. En ocasiones se producen metástasis a linfonodos que son irresecables como los esternales o ilíacos que debido a su localización son inaccesibles en la cirugía de mama o implicaría un notable incremento de la morbilidad (*Pereira y cols., 2003 y 2008*).

Al existir tantas similitudes entre los tumores mamarios de perra y mujer al revisar la historia de la cirugía de cáncer de mama encontramos que a lo largo de los años el tratamiento quirúrgico en la mujer ha sufrido importantes cambios. Inicialmente se aceptó el modelo halstediano, que como se explica anteriormente, consideraba el cáncer de mama una enfermedad localizada, y los linfonodos una barrera defensiva frente al tumor. Según este modelo, la estrategia terapéutica se orientó al control local de la enfermedad, con procedimientos quirúrgicos ampliamente mutilantes (*Halsted, 1894, 1898 y 1907*). El hecho de que la eficacia del tratamiento quirúrgico no fuese completa, ni siquiera en tumores localizados, condujo en la década de los 50-60 a la idea de que el cáncer de mama era una enfermedad sistémica desde el inicio, con capacidad de diseminación ganglionar y hematógena (*Fisher, 1980*). Incluso los tumores de pequeño tamaño se consideraban una manifestación temprana de la enfermedad sistémica y la afectación ganglionar equivalente a enfermedad a distancia (*Fisher, 1980*). Actualmente y gracias a los métodos de *screening* mamario, con progresos en la técnica de las mamografías, su aplicación en campañas de detección, así como una mayor información por parte de las autoridades sanitarias y una mayor sensibilización por parte de la mujer, el diagnóstico del cáncer de mama es cada vez más precoz. Esto ha conllevado a una disminución del

tamaño tumoral, permitiendo realizar un mayor número de intervenciones quirúrgicas más conservadoras, así como a una correlativa disminución de la afectación axilar por la enfermedad.

Tomando como referencia la estrategia quirúrgica empleada actualmente en la mujer hemos querido analizar en esta tesis doctoral los procedimientos quirúrgicos tras el diagnóstico de tumor de mama canino. Lo que planteamos es realizar chequeos rutinarios de los pacientes y de las lesiones con el objetivo de detectar y tratar precozmente las lesiones. Las lesiones mamarias pequeñas deben ser eliminadas quirúrgicamente de manera precoz y los tumores mamarios deben resecarse con la técnica quirúrgica más simple, con el objetivo de eliminar las lesiones palpables en su totalidad y de manera simultánea antes de que invadan una red linfática que no es extirpable en su totalidad (linfonodos esternales, ilíacos o poplíteos) o que de hacerlo conllevaría una morbilidad inaceptable.

Así, uno de los aspectos a evaluar en la presente tesis doctoral es la posible asociación del procedimiento quirúrgico con la evolución de la paciente tras la cirugía mamaria comparando la técnica de resección basada en los principios de drenaje linfático intermamario y linfonodos locales, y la propuesta de eliminación simultánea de todo el tejido mamario, basándonos en los principios oncológicos de resección de la masa tumoral con un margen de tejido sano peritumoral concéntrico.

OBJETIVOS.

4.- OBJETIVOS

1. Analizar y comparar las características epidemiológicas, clínicas e histopatológicas de una población de perras tratadas quirúrgicamente por tumores de mama en el HCV- ULPGC.
2. Evaluar los factores pronósticos de la población sujeta a estudio tomando como referencia la literatura consultada.
3. Evaluar la eficacia de la cirugía selectiva para el tratamiento de tumores de mama en relación al procedimiento quirúrgico convencional y valorar si existe asociación con la evolución de las pacientes.

MATERIAL Y MÉTODO.

5.- MATERIAL Y MÉTODO

5.1.- Diseño del estudio

Hemos realizado un estudio observacional retrospectivo sobre pacientes caninas diagnosticadas de tumores mamarios, las cuales fueron sometidas a tratamiento quirúrgico en el Hospital Clínico Veterinario de la ULPGC (HCV-ULPGC).

Se incluyen en este estudio aquellas pacientes que fueron intervenidas de tumores de mama en el periodo comprendido entre el 1 de enero de 2009 y 31 de diciembre de 2012, durante el cual se trataron quirúrgicamente 111 pacientes, diagnosticadas de tumores de mama en el HCV-ULPGC. De éstos, cumplieron nuestros criterios de inclusión 101 pacientes. El punto de corte para el análisis de la supervivencia se estableció hasta octubre de 2013.

Los criterios de selección de la muestra fueron los siguientes:

Criterios de inclusión

1. Pacientes caninas hembras, con 1 o más tumores mamarios, detectado/s por examen físico en el HCV-ULPGC.
2. Pacientes caninas hembras que no presentasen ninguna otra patología, o que en caso de presentarla, ésta no supusiese una esperanza de vida inferior a un año.
3. Tener un diagnóstico confirmado de neoplasia mamaria en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico Veterinario perteneciente al Departamento de Morfología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
4. Haber sido tratadas quirúrgicamente en el HCV-ULPGC.
5. No existir evidencias de metástasis a distancia por examen físico y radiografías torácicas antes de la primera cirugía.

Criterios de exclusión

1. Pacientes caninas hembras con otras patologías que significasen esperanza de vida inferior a 1 año y/o que impidiesen la intervención quirúrgica.
2. Metástasis evidentes en el momento del estudio.
3. Pacientes con diagnóstico de carcinoma inflamatorio de mama.

5.2.- Método

5.2.1.- Procedimiento quirúrgico

Todas las intervenciones fueron realizadas por dos equipos de cirujanos, que a su vez recibieron a las pacientes a través del procedimiento rutinario de remisión al HCV por parte de su veterinario habitual. Los dos equipos de cirujanos se clasificaron como Grupo A y Grupo B.

Ambos grupos de trabajo realizaron las cirugías atendiendo al tamaño, localización, número de tumores y estadio clínico del linfonodo regional. Así los procedimientos empleados fueron nodulectomías y mastectomías. A continuación, describimos los planteamientos quirúrgicos de cada equipo de cirujanos y tratamiento postquirúrgicos.

5.2.1.1. - Planteamiento quirúrgico en el Grupo A

Técnica quirúrgica convencional, basada en el drenaje linfático que comparten las mamas como se describe a continuación:

- Nodulectomía en caso de lesiones < 1 cm de diámetro y que no afecte al pezón.
- Mastectomía simple en caso de que la lesión se localice en la 1ª o 5ª mama. Sólo se extirpa la mama afectada y en caso de la 5ª se incluye el linfonodo inguinal superficial.
- Mastectomía regional de la 1ª y 2ª mama en caso de que el tumor se localice en la 2ª mama.
- Mastectomía regional de la 4ª y 5ª mamas en caso de que el tumor se localice en la 4ª mama. El linfonodo inguinal superficial se incluye en la pieza reseçada.
- Mastectomía regional de 1ª, 2ª y 3ª mama ó 3ª, 4ª y 5ª con linfonodo inguinal superficial en el caso de que existiera tumor en la 3ª mama.
- Mastectomía radical en dos fases si la disposición de los tumores implicaba la resección de ambas cadenas mamarias.

Como tratamiento analgésico y antiinflamatorio postquirúrgico en el Grupo A se administró tramadol (Tramadol Normon EFG solución inyectable 100 mg/2ml) de 1 a 4 mg/kg IM cada 12 horas y robenacoxib (Onsior®, NOVARTIS) a una dosis oral diaria de 1–2 mg/kg durante 3-4 días.

Las muestras fueron remitidas al Servicio de Anatomía Patológica para su estudio. En algunos casos no se remitió la totalidad de tejido extirpado.

5.2.1.2.- Planteamiento quirúrgico en el Grupo B

Se basa en el diseño de una estrategia quirúrgica que permita de manera selectiva la eliminación simultánea de todo el tejido tumoral afectado cuanto antes, de la manera más simple, minimizando la morbilidad postoperatoria y evaluando todos y cada uno de los tumores extirpados, generalmente sin extirpar mamas no afectadas por neoplasias. Así los planteamientos quirúrgicos son los siguientes:

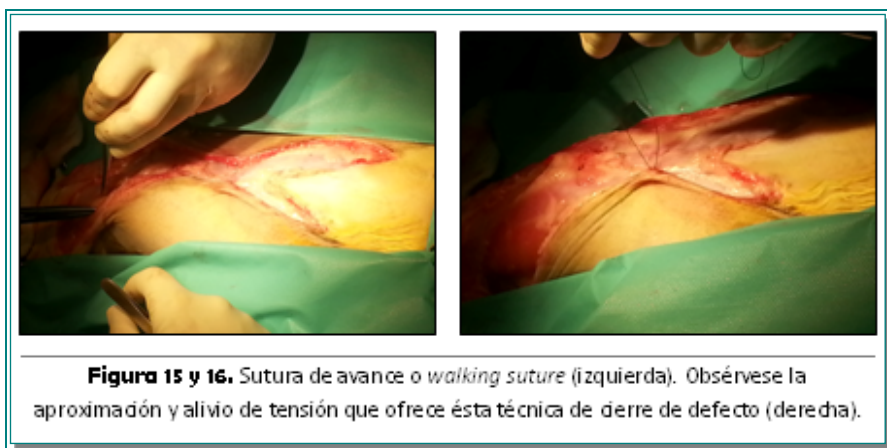
- Nodulectomía en caso de lesiones < 1 cm de diámetro en cualquier localización de ambas cadenas mamarias y que no afecte al pezón.
- Mastectomía simple de aquellas lesiones de < 1 cm que afecten a pezón o de lesiones que midan > 1 cm. Aplicable para cualquier localización del tumor a lo largo de las cadenas mamarias. Si afectase a la 5ª mama, se realiza la mastectomía junto con el linfonodo inguinal superficial.
- Mastectomía regional de mamas consecutivas con tumores. En el caso de que una de las mamas implicadas sea la 5ª, se reseca el bloque de las mamas afectadas junto al linfonodo inguinal superficial.
- Mastectomía radical con técnica en “mariposa” en los casos de múltiples tumores a lo largo de ambas cadenas. La diferencia con la técnica radical en forma elíptica radica en que la incisión realizada en la piel con forma de “mariposa” nos permite respetar una mayor cantidad de tejido sano dermoepidérmico y un considerable alivio de tensión en la cicatriz.

Aspectos quirúrgicos que se tuvieron en cuenta en el Grupo B:

- En caso de adherencia del tumor al tejido subyacente, se profundiza un plano de disección hasta el siguiente músculo o fascia sanos (Figura 13 y 14).



- Para el cierre del defecto creado tras la mastectomía radical se emplearon varias técnicas como colgajos uni o bilaterales, suturas de avance o el cierre solo de piel. Para el cierre se utilizan *walking sutures* o suturas de avance que consiste en poner puntos simples con sutura monofilamento absorbible en el subcutis desde el hueco creado en cada uno de los bordes hacia el centro de la herida y así conseguir aproximación de los bordes del tejido distribuyendo la tensión (Figura 15 y 16).



- En los casos de cirugías radicales se coloca un drenaje a lo largo de toda la zona de resección por el que instilamos anestésico local diluido y se conecta a un sistema de aspiración continua cerrado (Figura 17 y 18).



Como tratamiento postoperatorio en el Grupo B se administra tramadol (Tramadol Normon EFG solución inyectable 100 mg/2ml) de 1 a 4 mg/kg IM cada 12 horas y

robenacoxib (Onsior®, NOVARTIS) a una dosis oral diaria de 1–2 mg/kg durante 3-4 días. En todas las mastectomías radicales y en otros casos de resecciones amplias mantenemos a los pacientes con infusión continua de MLK (Morfina-Lidocaína-Ketamina) 0.2 mg/kg/h; lidocaína (Lidocaína inyectable BRAUN 2%) 25µg/kg/h; ketamina (Imalgene® 1000, MERIAL, 2 mg/kg/h) durante 12-24 horas por vía endovenosa. A los pacientes con catéter de drenaje tipo *Jackson Pratt* (COLOPLAST) (Figura 19) a lo largo de la zona resecada se administra bupivacaína (Bupivacaína inyectable 0,25%, BRAUN) a dosis de 1 mg/kg diluida en igual volumen de suero fisiológico cada 4-6 horas durante 48-72 horas. Media hora tras la administración del anestésico conectamos el reservorio de silicona para el drenaje cerrado (COLOPLAST) (Figura 19). Una vez el paciente está ambulatorio, sin dolor y el volumen de secreción es mínimo o nulo, generalmente al tercero o cuarto día, el catéter es retirado.



Figura 19. Sistema de drenaje *Jackson Pratt* y reservorio de silicona.

Tras la resección quirúrgica, la pieza anatómica obtenida es remitida en su totalidad al Servicio de Anatomía Patológica para su clasificación y evaluación de márgenes.

5.2.2.- Estudio histológico postoperatorio

El examen histopatológico de la mama nos permite obtener una información imprescindible para el diagnóstico de la lesión, ayudando a determinar el pronóstico y conseguir un mayor conocimiento de la evolución natural de la enfermedad, así como la indicación o no de tratamientos adyuvantes.

Las muestras resecadas tras las cirugías fueron fijadas en formol al 10% durante, al menos, 48 horas. Para la medida del tumor se tomó como referencia el mayor diámetro de la muestra. Los tumores de menos de 1 cm se incluyeron como un único bloque, mientras que los tumores de mayor tamaño se cortaron a intervalos de 5 mm. Las muestras fueron deshidratadas e incluidas en parafina. De cada bloque se obtuvo muestras de 3 µm que son teñidas usando hematoxilina y eosina (HE) (*Bancroft y Gamble, 2008*).

Los diagnósticos se consensuaron entre tres patólogos, tras el examen de las muestras. La clasificación histológica usada para los tumores de mama es la descrita por *Misdorp* en 1999. El grado histológico se determinó de acuerdo con el método numérico de *Elston y Ellis* (*Elston y cols., 1991*) también conocido como *Nottingham*. Este método de gradación es el más usado para el cáncer de mama en humana y se basa en las siguientes características morfológicas: formación tubular, pleomorfismo nuclear y

contaje de mitosis. Cada una de estas características se clasifica de I a III, siendo Grado I (bien diferenciado), Grado II (moderadamente diferenciado) y Grado III (pobrementemente diferenciado). Los carcinomas ricos en lípidos, carcinomas anaplásicos y carcinomas de células fusiformes se incluyeron en este estudio en Grado III.

5.3.- Sistemas de información

La serie se obtuvo usando la base de datos del HCV-ULPGC, a través de la cual se recogieron las pacientes que figuraban como operadas de tumores de mama desde el 1 de enero de 2009 hasta el 31 de diciembre de 2012 y que cumplían los criterios de inclusión. De esta base de datos obtuvimos información de raza, estado reproductivo, edad, fecha de la cirugía, número y localización de las lesiones, y tipo de cirugía.

Posteriormente, se accedió a la base de datos del Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico Veterinario perteneciente al Departamento de Morfología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria para recopilar la información referente al tamaño, tipo histológico, grado de diferenciación, invasión vascular, necrosis, márgenes del tumor y metástasis a linfonodo en el caso de que éstos se incluyeran para su estudio histológico.

Para llevar a cabo la valoración de los resultados obtenidos tras la cirugía, se realizó un pequeño cuestionario vía telefónica, valorando estos resultados en el contexto de un estudio sobre tratamiento quirúrgico en tumores de mama caninos llevado a cabo en el HCV-ULPGC.

Dentro de este pequeño cuestionario, las preguntas que se le formularon, realizadas todas por un único observador, en este orden y con transcripción exacta, eran las siguientes:

1. Nombre.
2. Raza.
3. ¿Sigue viva?
4. Edad.
5. Recidivas o nuevos tumores.
6. Metástasis.
7. ¿Nuevas cirugías de mama? Sí/No.
8. ¿Diagnóstico tras segunda cirugía?
9. ¿Causa de fallecimiento/eutanasia?
10. ¿Fecha de fallecimiento?
11. ¿Se realizó necropsia?

En los casos en que los propietarios no podían ofrecernos información específica en las preguntas 9 y 11, y en aquellos pacientes fallecidos, acudimos al servicio de Necropsias de la Facultad de Veterinaria de UPGC, siempre que sus restos hubiesen sido entregados a dichos servicios, para tal fin.

5.4.- Análisis de datos y variables

Se diseñó una tabla de datos *Excel* específica del estudio donde se recogen las variables que se describen a continuación:

Las variables clínico-epidemiológicas, edad (años), estado reproductivo (entera y ovariectomizada) y raza. En este último caso las razas se agruparon en función del peso, así tenemos **razas grandes** (≥ 15 Kg.), **razas medianas** (10-15 Kg.) y **razas pequeñas** (≤ 10 Kg.). Las perras **mestizas** (5-45 Kg.) se clasificaron en un grupo aparte independientemente del peso, ya que en muchos casos se desconocía.

En función del número de tumores, éstos fueron clasificados como **solitarios**, en el caso de que la paciente presentara una sola lesión, o **múltiples**, si presentaba ≥ 2 lesiones. En aquellos casos en los que las pacientes presentaban más de una neoplasia maligna de mama, se consideró como base para la clasificación aquella con las características clínicas e histopatológicas más agresivas.

La localización del tumor se clasificó en tres categorías, las cuales son **craneal**: mamas torácicas y abdominales craneales, **caudal**: abdominales caudales y mamas inguinales, y **ambas**: mamas craneales o caudales afectadas simultáneamente. Se recopiló información sobre qué cadena mamaria era la afectada, clasificándose como **cadena derecha**: el/los tumores se localizaban en la cadena derecha, **cadena izquierda**: el/ los tumores se localizan en cadena izquierda, o **ambas**: en el caso de que las dos cadenas estuvieran afectadas.

El tamaño del tumor se clasificó igualmente en tres categorías, las cuales son **a**: tumores < 1 cm, **b**: tumores entre 1 y 2,9 cm, y **c**: tumores ≥ 3 cm.

La clasificación histológica de los tumores malignos se agrupó de la siguiente manera: carcinoma complejo y mixto (**CCM**) que engloba los carcinomas complejos de mama y carcinomas en tumor mixto, carcinoma simple sólido de mama (**CSS**), carcinoma simple tubulopapilar (**CSTP**) y **OTROS** donde se incluyen los carcinomas anaplásicos, carcinomas de células fusiformes y carcinomas ricos en lípidos). Las lesiones benignas se clasificaron en adenomas y displasias. En variables histológicas se incluyó el **grado de malignidad** (I, II o III), **invasión vascular** (sí/no), **necrosis** (sí/no), **metástasis a linfonodo** (sí/no).

Para el margen tumoral se establecieron los siguientes subgrupos:

- 1) **Libres** (3 mm)
- 2) **Afectados** (presencia de células tumorales en el borde quirúrgico).

Las variables de seguimiento fueron: nuevos tumores (no/sí), mortalidad de la población estudiada, mortalidad por el tumor (no/sí). Se creó una variable de seguimiento denominada metástasis a distancia y/o recidiva tumoral donde se englobaron las pacientes que tenían recidivas tumorales en la propia cicatriz y metástasis a distancia de manera conjunta o independiente a las recidivas.

Según el equipo de cirujanos, los casos se dividieron en los siguientes grupos:

- 1) **Grupo A:** pacientes con uno o más tumores de mama malignos intervenidos de acuerdo a la técnica quirúrgica convencional descrita en la literatura basada en el drenaje linfático.
- 2) **Grupo B:** pacientes con uno o más tumores de mama malignos intervenidos según técnica selectiva.

Dentro de cada equipo de cirujanos las técnicas quirúrgicas se agruparon en **nodulectomía**, **mastectomía simple** y **mastectomía regional y radical** donde se englobaron ambas técnicas.

5.5.- Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa SPSS la versión 15.0. El nivel de significación estadística se estableció para una $\alpha=0.05$. Desde el punto de vista descriptivo, las variables cuantitativas fueron tratadas analizando los índices de centralización y dispersión: media aritmética, desviación típica. Las variables cualitativas se trataron analizando la frecuencia absoluta de la aparición de cada una de las categorías así como las frecuencias relativas. Se aplicó el test de *chi* cuadrado y la corrección de *Fisher* en caso de que fuera necesario para testar las asociaciones entre las variables cualitativas. Hemos realizado un análisis de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier*.

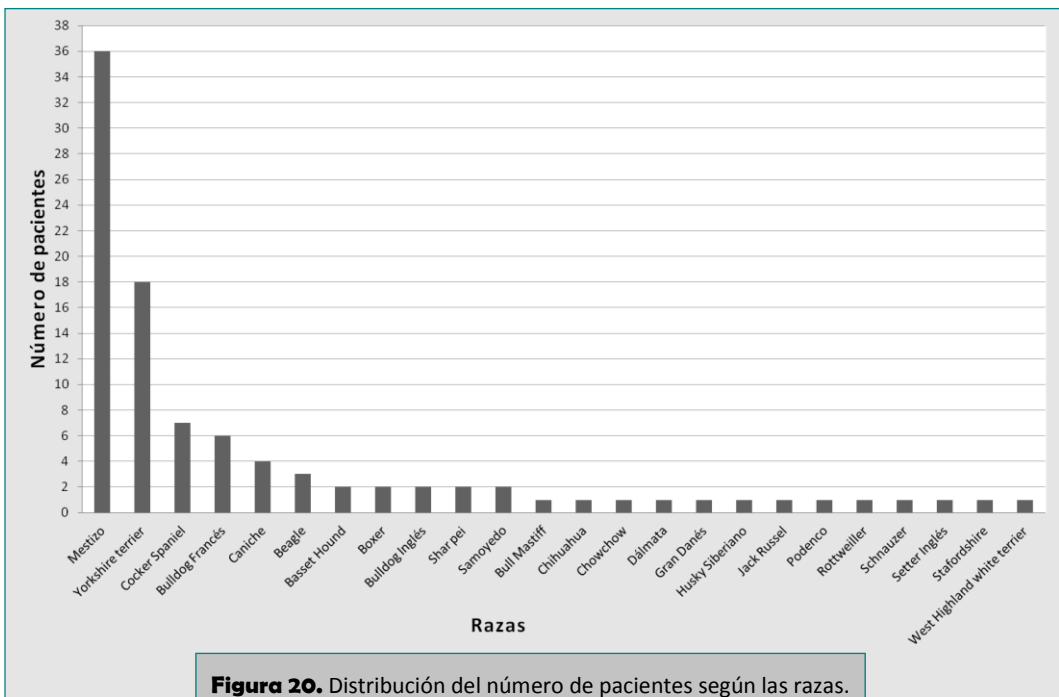
RESULTADOS.

6.- RESULTADOS

6.1.- Característica poblacional

En este estudio se incluyeron 101 perras con tumores de mama y edades de aparición de la neoplasia entre 1 y 15 años (media de $9,1 \pm 3,2$ años), el 50% de la población tenía 10 años (Tabla III). Un total de 23 razas diferentes y perras mestizas fueron incluidas en el estudio. La mayoría de los casos fueron mestizos (36 casos) seguidos por Yorkshire Terrier (18 casos), Cocker Spaniel (7), Bulldog Francés (6), Caniche (4), Beagle (3). Las razas restantes, con 1 o 2 pacientes en cada caso, hicieron un total de 23 perras (Figura 20).

Las razas fueron agrupadas por peso (Tabla III), así el 37,1% (n: 36) son perras mestizas, el 29,9% (n: 29) pertenecen a razas pequeñas, 15,5% (n: 15) razas medianas y 17,5% (n: 17) razas grandes. No fue posible determinar la raza en 4 pacientes.



Se determinó el estado reproductivo del 92% (n: 93) del total de la población. De éstas el 69,9% (n: 65) eran enteras y el 30,1% (n: 28) esterilizadas. Si bien los porcentajes de las perras esterilizadas antes o durante la cirugía de mama fueron de 8,6% (n: 8) y 21,5% (n: 20) respectivamente. No se obtuvo información del estado reproductivo en 8 pacientes incluidas en el estudio.

Tabla III. Variables clinicoepidemiológicas.			
Variable		N= 98	
Edad (años)			
Media + desviación típica		9.1 ± 3.2	
Rango		1 - 15	
Percentiles		75% < 12 años	
		25% > 12 años	
Razas			
	N	%	
Mestizo (5-45 kg)	36	37.1	
Razas Pequeñas (≤ 10 kg)	29	29.9	
Razas Medianas (10-15 kg)	15	15.5	
Razas Grandes (≥ 15 kg)	17	17.5	
Total	97	100.0	
Estado Reproductivo			
	N	%	
Entera	65	69.9	
Esterilizada	Anterior a cirugía	8	8.6
	En cirugía	20	21.5
Total	93	100.0	

Al analizar las variables relacionadas con la enfermedad tumoral, el 93,1% de las pacientes desarrollan neoplasias malignas. En relación al tipo histológico de los tumores malignos (Tabla IV) el más frecuente con un 50% (n: 47) es el grupo de carcinomas complejos y mixtos (CCM) frente al grupo menos representado clasificado como OTROS que incluye carcinomas ricos en lípidos, carcinomas anaplásicos y de células fusiformes representa solo con un 4,3% (n: 4) del total de pacientes.

Tabla IV. Variables relacionadas con el tipo histológicos de los tumores.		
Variable	N	%
Tumores malignos		
No	7	6,9
Si	94	93.1
Total	101	100.0
Tipo histológico de los tumores malignos		
CCM	47	50.0
CSS	14	14.9
CSTP	29	30.9
OTROS	4	4,3
Total	94	100.0

El grado histológico de las lesiones malignas más representativo en este estudio fue el Grado II con un valor de 60,6% (n: 57) (Tabla V).

Tabla V. Grado de tumores malignos.		
Variable	N	%
Grado		
I	16	17.0
II	57	60.6
III	21	22.3
Total	94	100.0

Analizando las variables relacionadas con el estudio histológico de los tumores de mama malignos (Tabla VI), el 30,9% (n: 29) de las lesiones presentaron necrosis tumoral y el 7,4% (n: 7) invasión vascular. El 6,4% (n: 6) de las neoplasias mamarias analizadas resultaron positivos a metástasis ganglionar en el momento de su análisis histológico (Tabla VI).

Tabla VI. Variables relacionadas con el análisis histológico de los tumores mamarios malignos.		
Variable	N	%
Invasión vascular		
No	87	92.6
Si	7	7.4
Total	94	100.0
Metástasis a linfonodo		
No	88	93.6
Si	6	6.4
Total	94	100.0
Necrosis		
No	65	69.1
Si	29	30.9
Total	94	100.0

En relación al tamaño de los tumores de mama malignos incluidos en este estudio, fue posible rescatar las medidas del 97,8% (n: 92) de los mismos. El tamaño más representativo fue el que incluye tamaños que oscilan entre 1 y 2,9 cm de diámetro con un 50% (n: 46) aunque aquellas con más de 3 cm también representaban un 37% (n: 34) (Tabla VII).

Tabla VII. Tamaño de los tumores de mama malignos.

Variable	N	%
Tamaño		
a (< 1 cm)	12	13.0
b (1- 2.9 cm)	46	50.0
c ($\geq$ 3 cm)	34	37.0
Total	92	100.0

Se recopiló información en relación al número de tumores por paciente en el 79,8% (n: 75) de perras con tumores malignos. Más de la mitad presentó tumores múltiples (56%) (Tabla VIII).

Analizando la localización del tumor (Tabla VIII), las mamas caudales fueron las más frecuentemente afectadas con un 45,3% (n: 34), mientras que la cadena mamaria izquierda fue la localización más común de las neoplasias contando con el 42,6% (n: 29) de las perras (Tabla VIII).

Tabla VIII. Variables relacionadas el número de tumores malignos y su localización.

Variable	N	%
Número de lesiones		
Múltiples	42	56.0
Solitaria	33	44.0
Total	75	100.0
Mama afectada		
Craneal (1,2,3)	16	21.3
Caudal (4,5)	34	45.3
Ambas	25	33.3
Total	75	100.0
Cadena mamaria afectada		
Derecha	18	26.5
Izquierda	29	42.6
Ambas	21	30.9
Total	68	100.0

Según la distribución de tumores de mama operados por los equipos de cirujanos, observamos que el 54,5% (n: 55) de las pacientes son intervenidas quirúrgicamente por el Grupo A frente el 45,5% (n: 47) del Grupo B (Figura 21).

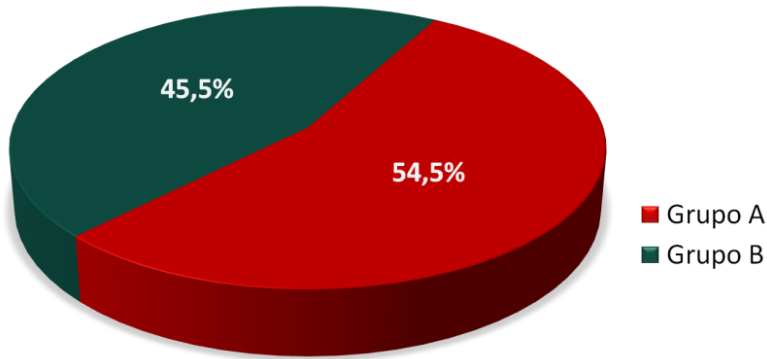


Figura 21. Porcentaje de tumores de mama totales para cada equipo de cirujanos.

Del total de pacientes con tumores malignos (n: 94) observamos que el Grupo A opera el 58,5% (n: 55) frente al 41,5% (n: 46) (Figura 22).

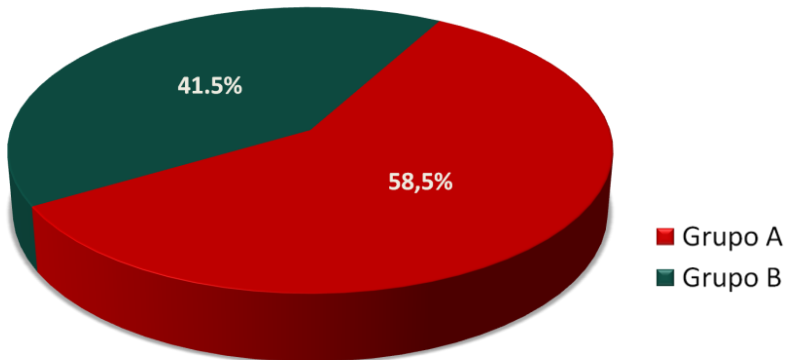


Figura 22. Porcentaje de tumores de mama malignos para cada equipo de cirujanos.

Según el abordaje quirúrgico realizado en las perras con tumores mamarios malignos (Tabla IX), la técnica quirúrgica más frecuente fue mastectomía simple con el 45,7% (n: 43) obteniendo márgenes limpios en el 79,8% (n: 75) de los casos (Tabla IX).

Tabla IX. Variables relacionadas con la técnica quirúrgica.

Variable	N	%
Técnica quirúrgica		
Nodulectomía	30	31.9
Mastectomía simple	43	45.7
Mastectomía regional /radical	21	22.3
Total	94	100.0
Margen del tumor		
Limpio	75	79.8
Sucio	19	20.2
Total	94	100.0

De las 94 pacientes con tumores malignos, el 22,6% (n: 21) tuvieron metástasis a distancia o recidiva del tumor tras la cirugía de mama (Tabla X).

El 34% (n: 32) de la población total falleció durante el periodo estudiado (Tabla X), si bien las muertes a causa de la neoplasia maligna se produjeron en el 18% (n: 17) de las perras afectadas por dicha neoplasia.

Tabla X. Variables relacionadas con el seguimiento de pacientes con tumores de mama malignos.

Variable	N	%
Metástasis a distancia/recidiva		
No	72	77.4
Sí	21	22.6
Total	93	100.0
Nuevos tumores sin metástasis		
No	82	88.1
Si	12	11.9
Total	94	100.0
Fallecimiento		
No	62	66.0
Sí	32	34.0
Total	94	100.0
Fallecimiento por el tumor		
No	77	82.0
Sí	17	18.0
Total	94	100.0

6.2.- Edad

El análisis de los tumores malignos y benignos según la edad no nos muestra una diferenciación estadística a pesar de que las perras que presentan tumores benignos son más jóvenes (7 años) que las pacientes con lesiones malignas (9 años) (Tabla XI). El estudio según los tipos histológicos nos muestra que aunque la media de edad de las perras clasificadas en tipo OTROS tumores sea inferior al resto 6.5 (3.5-9.5, IC 95%) no representa un valor estadísticamente significativo (Tabla XI).

No evidenciamos diferencias significativamente estadísticas en el análisis de las razas y la edad. Sin embargo observamos una tendencia en las razas grandes a padecer tumores antes que el resto 7,5 (6.0-9.1, IC 95%) (Tabla XI).

Al analizar la edad media de las perras que presentaban invasión vascular 8.7 (4.8-12.5, IC 95%) y las que no 9.1 (8.5-9.8, IC 95%) se refleja que no existe cambios significativos en la edad entre ambos grupos (Tabla XI).

Observamos que las pacientes que fallecen durante el estudio 10.8 (9.8-11.7, IC 95%) tienen más edad que las que siguen vivas 8.7 (4.8-12.5, IC 95%), evidenciando diferenciación estadística. Sin embargo, no se objetivan diferencias entre la edad de las pacientes que fallecen debido al tumor mamario y las que mueren por otras causas (Tabla XI).

Tabla XI. Relación de variables con la edad de las pacientes				
Variable		Media (años)	IC 95 %	
			Lim. inferior	Lim. superior
Tumores malignos	No	7.0	4.1	9.9
	Si	9.2	8.6	10.0
Tipo de tumor maligno	CCM	9.3	8.3	10.3
	CSS	10.4	8.7	12.0
	CSTP	9.0	7.9	10.2
	OTROS	6.5	3.5	9.5
Invasión vascular	No	9.1	8.5	9.8
	Si	8.7	4.8	12.5
Raza	Mestizo	9.8	8.7	10.8
	Grande	7.5	6.0	9.1
	Mediana	9.1	7.6	10.6
	Pequeña	9.1	7.7	10.6
Mortalidad	No	8.3	7.5	9.0
	Si	10.8	9.8	11.7
Mortalidad por el tumor	No	10.6	9.0	12.2
	Si	10.6	9.3	12.0

6.3.- Mortalidad

No evidenciamos diferencia estadísticamente significativa en la distribución de la mortalidad a causa o no de la neoplasia mamaria según la raza ($p=0,383$) ni estado reproductivo ($p=0,829$) (Tabla XIII).

No se reflejó una significación estadística cuando analizamos la distribución de la mortalidad según tipo histológico ($p=0,426$) ni tampoco según grado histológico ($p=0,231$) (Tabla XIII).

Aunque la variable localización del tumor no llegó a alcanzar la significación estadística, se reflejó que el 64,3% (n: 9) de las bajas por la neoplasia presentaban tumores en las mamas craneales y caudales de manera simultánea (Tabla XIII). El estudio de la mortalidad según la cadena mamaria afectada tampoco mostró diferencias significativas ($p=0,326$) (Tabla XIII).

La mortalidad según el tipo de cirugía fue incluida en el análisis. Por una parte las bajas por fallecimiento incluyendo las causas ajenas a la neoplasia ($p=0,330$) (Tabla XII) y por otro lado la mortalidad producida por el propio tumor maligno ($p=0,488$) (Tabla XIII). En ninguno de los dos casos la asociación fue estadísticamente significativa cuando se estudian dentro de cada tipo de cirugía.

Tabla XII. Mortalidad según la técnica quirúrgica					
Variable	Tipo de cirugía			Total	P
		Mastectomía simple	Nodulectomía	Mastectomía regional/radical	
Mortalidad	No	30	21	11	0,330
	Si	13	9	10	
Total		43	30	21	94

No apreciamos una diferencia estadísticamente significativa en la distribución de pacientes fallecidas según el tamaño de la neoplasia mamaria ($p=0,689$) (Tabla XIII).

Se obtuvo una asociación estadísticamente significativa al analizar la invasión vascular ($p=0,027$). El 100% (n: 5) de las pacientes con invasión vascular fallecen debido a la neoplasia mamaria (Tabla XIII).

Analizando la variable necrosis en las pacientes que fallecen durante el estudio evidenciamos asociación estadísticamente significativa en la distribución entre las que presentan necrosis tumoral y fallecen a causa de la neoplasia mamaria (58,8%) y las que fallecen por otras causas (21,4%) con un valor de $p=0,036$ (Tabla XIII).

Por otra parte la variable estudiada metástasis a linfonodo no presentó significación estadística ($p=0,052$). Observamos que el 100% (n: 4) de las pacientes con metástasis a linfonodo fallecen por del tumor maligno (Tabla XIII).

Tabla XIII. Variables estudiadas para la Mortalidad

Variables			Mortalidad por el tumor		Total	P
			No (%)	Si (%)		
Raza	Grande		1 (7.7)	2 (12.5)	3	0.383
	Mediana		4 (30.8)	4 (25.0)	8	
	Pequeña		1 (7.7)	5 (31.3)	6	
	Mestizos		7 (53.8)	5 (31.3)	12	
Total			13	16	29	
Esterilizadas	No		9 (75)	11 (78.6)	20	0.829
	Si		3 (25)	3 (21.4)	6	
Total			12	14	26	
Tipo de Tumor Maligno	CCM		4 (28.6)	3 (17.6)	7	0.426
	CSS		4 (28.6)	7 (41.2)	11	
	CSTP		6 (42.9)	5 (29.4)	11	
	OTROS		0 (0.0)	2 (11.8)	2	
Total			14	17	31	
Grado	I		2 (14.3)	1 (5.9)	3	0.231
	II		8 (57.1)	6 (35.3)	14	
	III		4 (28.6)	10 (58.8)	14	
Total			14	17	31	
Localización del tumor	Craneal		3 (30.0)	1 (7.1)	4	0.081
	Caudal		5 (50.0)	4 (28.6)	9	
	Ambas		2(20.0)	9 (64.3)	11	
Total			10	14	24	
Cadena afectada	Derecha		4 (50)	3 (25)	7	0.326
	Izquierda		1(12.5)	5(41.7)	6	
	Ambas		3 (37.5)	4 (33.3)	7	
Total			8	12	20	
Técnica quirúrgica	Mastectomía simple		6 (42.9)	6 (35,3)	12	0.488
	Nodulesctomía		5 (35.7)	4 (23.5)	9	
	Mastectomía regional/radical		3 (21.4)	7 (41.2)	10	
Total			14	17	31	
Tamaño Tumor	a (< 1 cm)		2 (14.3)	4 (23.5)	6	0.689
	b (1-2.9 cm)		5 (35.7)	4 (23.5)	9	
	c ($\geq$ 3 cm)		7 (50.0)	9 (52.9)	16	
Total			14	17	31	
Invasión vascular	No		14 (100.0)	12 (70.6)	26	0.027*
	Si		0 (0.0)	5 (29. 4)	5	
Total			14	17	31	

Tabla XIII. Variables estudiadas para la Mortalidad (continuación)

Variables		Mortalidad por el tumor		Total	P
		No	Si		
Necrosis	No	11 (78.6)	7 (41.2)	18	0.036*
	Si	3 (21.4)	10 (58.8)	13	
Total		14	17	31	
Metástasis a linfonodo	No	14 (100.0)	13 (76.5)	27	0.052
	Si	0 (0.0)	4 (23.5)	4	
Total		14	17	31	

* $P < 0,005$

6.4.- Tamaño Tumoral

A continuación analizamos las variables tipo de tumor maligno, grado histológico, invasión vascular, necrosis y metástasis a linfonodo con los distintos tamaños tumorales y exponemos las frecuencias, porcentajes y el grado de significación estadístico (Tabla XIV).

El tipo histológico del tumor maligno, en relación a el tamaño de las lesiones, no resultó estadísticamente significativo con una $p=0,893$ por lo que no existe asociación en la distribución de los tipos de tumores según su tamaño (Tabla XIV).

Aunque el grado histológico no llegó a alcanzar la significación estadística ($p=0,071$) respecto al tamaño del tumor, se reflejó que los tumores malignos grado II con ≥ 3 cm se encontraban en mayor porcentaje (64,7%) (Tabla XIV).

La variable invasión vascular resultó estadísticamente significativa para el tamaño del tumor ($p=0,002$). La totalidad de pacientes con invasión vascular (n: 7) presentó tamaños tumorales ≥ 3 cm (Tabla XIV).

A pesar de observar una mayor distribución de pacientes con necrosis tumoral en lesiones de ≥ 3 cm de diámetro (44,1%), este porcentaje no dista mucho del obtenido con lesiones de menos de 1 cm y que también presentaban necrosis (33,3%) por lo que la diferencia no resultó estadísticamente significativa ($p=0,060$) (Tabla XIV).

Al analizar las metástasis a linfonodo respecto al tamaño tumoral evidenciamos diferencia estadísticamente significativa con una $p=0,030$, obteniendo que el 83,3% (n: 5) de los pacientes con metástasis a linfonodo miden ≥ 3 cm de diámetro (Tabla XIV).

Tabla XIV. Variables estudiadas para el tamaño de los tumores malignos.

Variables		Tamaño tumores malignos			Total N=92	P
		a(< 1 cm) (%)	b(1- 2.9 cm) (%)	c($\geq$ 3 cm) (%)		
		N= 12	N= 46	N= 34		
Tipo de tumor maligno	CCM	5 (47.7)	25 (54.3)	15 (44.1)	45	0.893
	CSS	2 (16.7)	7 (15.2)	5 (14.7)	14	
	CSTP	5 (41.7)	12 (26.1)	12 (35.3)	29	
	OTROS	0 (0.0)	2 (4.3)	2 (5.9)	4	
Grado	I	5 (41.7)	9 (19.6)	2 (5.9)	16	0.071
	II	5 (41.7)	28 (60.9)	22 (64.7)	55	
	III	2 (16.7)	9 (19.6)	10 (29.4)	21	
Invasión vascular	No	12 (100.0)	46 (100.0)	27 (79.4)	85	0.002*
	Si	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (20.6)	7	
Necrosis	No	8 (66.7)	37 (80.4)	19 (55.9)	64	0.060
	Si	4 (33.3)	9 (19.6)	15 (44.1)	28	
Metástasis a linfonodo	No	11 (91.7)	46(100.0)	29(85.3)	86	0.030*
	Si	1 (8.3)	0(0.0)	5(14.7)	6	

* $P < 0,050$

Comparando el grado de diferenciación con los distintos tipos histológicos se evidencia significación estadística ($p < 0,0001$) (Tabla XV). El tipo histológico que presenta mayor grado de dediferenciación es el formado por el grupo CSS con un 61,9% (n: 13) de los tumores con Grado III. Observamos además que la totalidad de los tumores pertenecientes al grupo OTROS tienen Grado III y que se trata de un grupo muy reducido (n: 4) (Tabla XV).

Tabla XV. Grado de diferenciación según los tipos histológicos

Variable		Grado			Total	P
		I (%)	II (%)	III (%)		
Tipo histológico	CCM	7 (43.7)	38 (66.7)	2 (9.5)	47	< 0,0001*
	CSS	0 (0,0)	1 (1.8)	13 (61.9)	14	
	CSTP	9 (56.3)	18 (31.6)	2 (9.5)	29	
	OTROS	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (19.0)	4	
Total		16	57	21	94	

* $P < 0,050$

6.5.- Metástasis a distancia y /o recidivas locales

Al realizar el análisis de las variables raza ($p=0,928$) y estado reproductivo ($p=0,937$) no se observa diferencias estadísticamente significativas dentro de las pacientes que presentan o no metástasis a distancia o recidivas (Tabla XVI).

La variable tipo histológico del tumor maligno resultó ser estadísticamente significativa con una $p=0,007$. El tipo histológico que presenta mayor porcentaje de metástasis o recidiva es el formado por el grupo CSS con un 33.3% (n: 7) (Tabla XVI).

Apreciamos una significativa mayor presencia de metástasis a distancia y/o recidiva en aquellas pacientes con mayor grado histológico ($p<0,0001$). El 52,4% (n: 11) de las pacientes con metástasis/recidivas tenían Grado III (Tabla XVI).

En relación con la localización del tumor, hallamos que en el grupo de perras con metástasis/recidiva la situación más común del tumor fue en las mamas craneales y caudales de manera simultánea (58,8%). Estos valores resultaron estadísticamente significativos con una $p=0,020$, mientras que evaluando la variable cadena mamaria afectada, no observamos significación estadística en la distribución de valores entre pacientes con o sin metástasis a distancia y recidivas ($p=0,888$) (Tabla XVI).

La distribución de las pacientes con o sin metástasis a distancia/recidiva según los diferentes tamaños tumorales resultó tener diferencias estadísticamente significativas con una $p=0,004$. De las pacientes con metástasis a distancia observamos que el 61,9% (n: 13) presentaron tumores con tamaño igual o superior a 3 cm (Tabla XVI).

Al analizar la variable invasión vascular considerando las pacientes que presentan o no metástasis a distancia o recidivas del tumor observamos que existe diferencia estadísticamente significativa ($p<0,0001$). El 100% de pacientes con invasión vascular (n: 6) presentó metástasis a distancia/recidiva (Tabla XVI).

La necrosis tumoral y metástasis a linfonodo resultaron tener significación estadística con una $p=0,004$ y $0,002$ respectivamente. Observando la distribución de pacientes con metástasis a distancia o recidivas evidenciamos que más de la mitad (57,1%) tienen necrosis tumoral frente al 23,6% de pacientes sin metástasis a distancia pero con necrosis tumoral. Mientras que el 80% (n: 4) de las pacientes con metástasis a linfonodo desarrolló metástasis a distancia (Tabla XVI).

Tabla XVI. Variables estudiadas para las metástasis a distancia o recidiva tumoral.

Variables		Metástasis / Recidivas		Total	P
		No (%)	Si (%)		
Raza	Grande	10 (14.5)	3 (15.0)	13	0.928
	Mediana	10 (14.5)	4 (20.0)	14	
	Pequeña	21 (30.4)	5 (25.0)	26	
	Mestizos	28 (40.6)	8 (40.0)	36	
Total		69	20	89	

Tabla XVI. Variables estudiadas para las metástasis a distancia o recidiva tumoral. (continuación)

Variables			Metástasis / Recidivas		Total	P
			No (%)	Si (%)		
Esterilizadas	No		46 (67.6)	12 (66.7)	58	0.937
	Si		22 (32.4)	6 (33.3)	28	
	Total		68	18	86	
Tipo de tumor maligno	CCM		41 (56.9)	6 (28.6)	47	0.007*
	CSS		7 (9.7)	7 (33.3)	14	
	CSTP		23 (31.9)	6 (28.6)	29	
	OTROS		1 (1.4)	2 (9.5)	3	
Total			72	21	93	
Grado	I		15 (20.8)	1 (4.8)	16	< 0.0001*
	II		48 (66.7)	9 (42.9)	57	
	III		9 (12.5)	11 (52.4)	20	
Total			72	21	93	
Localización del tumor	Craneal		15 (26.3)	1 (5.9)	16	0.020*
	Caudal		28 (49.1)	6 (35.3)	34	
	Ambas		14 (24.6)	10 (58.8)	24	
Total			57	17	74	
Cadena afectada	Derecha		15 (28.8)	3 (20.0)	18	0.888
	Izquierda		22 (42.3)	5 (33.3)	29	
	Ambas		15 (28.8)	7 (46.7)	20	
Total			52	15	67	
Tamaño tumor	a (<1 cm)		8 (11.4)	4 (19.0)	12	0.004*
	b (1-2.9 cm)		42 (60.0)	4 (19.0)	46	
	c (≥ 3 cm)		20 (28.6)	13 (61.9)	33	
Total			70	21	91	
Invasión vascular	No		72 (100.0)	15 (71.4)	87	< 0.0001*
	Si		0 (0.0)	6 (28.6)	6	
Total			72	21	93	
Necrosis	No		55 (76.4)	9 (42.9)	64	0.004*
	Si		17 (23.6)	12 (57.1)	29	
Total			72	21	93	
Metástasis a linfonodo	No		71 (98.6)	17 (81.0)	88	0.002*
	Si		1 (1.4)	4 (19.0)	5	
Total			72	21	93	

* $P < 0,050$

6.6.- Equipos de cirujanos

No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos equipos de cirujanos en función de las razas ($p=0,076$) ni estado reproductivo ($p=0,309$) (Tabla XVII).

Al realizar el análisis de la variable tipo de tumor, considerando los dos equipos de cirujanos, observamos que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,003$) en la distribución de tumores benignos y malignos. El 100% (n: 55) de los pacientes del Grupo A se diagnosticaron como tumores malignos frente al 84,8% (n: 46) de pacientes en el Grupo B (Tabla XVII).

El tipo histológico más frecuente fue el CCM con 50,9% (n: 28) en el Grupo A y 48,7% (n: 19) en el Grupo B sin objetivar diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los tipos histológicos entre los dos equipos de cirujanos ($p=0,060$). En cambio el grado histológico resultó estadísticamente significativo con una $p=0,002$ ya que aunque el Grado II es el más frecuente con un 67,3% (n: 37) y 51,3% (n: 20) en Grupo A y B respectivamente, observamos diferencias en la distribución del Grado I siendo de 5,5% (n: 3) en el Grupo A frente a 33,3% (n: 13) en Grupo B (Tabla XVII).

No observamos diferencias estadísticamente significativas en la cadena mamaria afectada entre los dos grupos de cirujanos ($p=0,781$), pero sí en la localización del tumor ($p=0,021$). Así en el Grupo A el 48,6% (n: 18) de las perras operadas presentaban tumores tanto las mamas craneales como caudales frente al 55,3% (n: 21) de las pacientes en el Grupo B que presentaban tumores exclusivamente en las mamas caudales (Tabla XVII).

El análisis del tipo de cirugía frente a los dos equipos de cirujanos no mostró una significación estadística ($p=0,806$). Si observamos la distribución de las técnicas vemos que son similares en ambos equipos de cirujanos (Tabla XVII).

El estudio de los márgenes del tumor entre los equipos de cirujanos no resultó estadísticamente significativo con una $p=0,326$ (Tabla XVII).

Al realizar el análisis del tamaño del tumor considerando los dos grupos de cirujanos observamos una distribución estadísticamente significativa ($p=0,003$). Mientras que en Grupo A los tumores más frecuentes con un 50,9% (n: 27) son los que miden ≥ 3 cm en el Grupo B con un 69,2% (n: 27) de los tumores se clasifican entre 1 y 2,9 cm (Tabla XVII).

La invasión vascular, necrosis y metástasis a linfonodo son variables que no mostraron un valor estadísticamente significativo entre los dos equipos de cirujanos (Tabla XVII).

Aunque la mortalidad a causa del tumor maligno fue de 57,1% en el Grupo A (n: 12) frente al 50,0% del Grupo B (n: 5), la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,709$) (Tabla XVII).

Tabla XVII. Variables estudiadas para los Equipos de cirujanos.

Variables		Equipos de cirujanos		Total	P
		A (%)	B (%)		
Raza	Grande	9 (17.6)	8 (17.4)	17	0.076
	Mediana	11 (21.6)	4 (8.7)	15	
	Pequeña	10 (19.6)	19 (41.3)	29	
	Mestizos	21 (41.2)	15 (32.6)	36	
Total		51	46	97	
Esterilizadas	No	32 (65.3)	33 (75.0)	65	0.309
	Si	17 (34.7)	11 (25.0)	28	
Total		49	44	93	
Tipo de tumor	Benignos	0 (0.0)	7 (15.2)	7	0.003*
	Malignos	55 (100.0)	39 (84.8)	94	
Total		55	46	101	
Tipo histológico de tumor maligno	CCM	28 (50.9)	19 (48.7)	47	0.060
	CSS	12 (21.8)	2 (5.1)	14	
	CSTP	14 (25.5)	15 (38.5)	29	
	OTROS	1 (1.8)	3 (7.7)	4	
Total		55	39	94	
Grado	I	3 (5.5)	13 (33.3)	16	0.002*
	II	37 (67.3)	20 (51.3)	57	
	III	15 (27.3)	6 (15.4)	21	
Total		55	39	94	
Localización del tumor	Craneal	6(16.2)	10 (26.3)	16	0.021
	Caudal	13 (35.1)	21 (55.3)	34	
	Ambas	18 (48.6)	7 (18.4)	25	
Total		37	38	75	
Cadena afectada	Derecha	9 (27.3)	9 (24.8)	18	0.781
	Izquierda	14 (42.4)	15 (42.9)	29	
	Ambas	10 (30.3)	11 (31.4)	21	
Total		33	35	68	
Técnica quirúrgica	Mastectomía simple	24 (43.6)	19 (48.7)	43	0.806
	Nodulesctomía	19 (34.5)	11 (28.2)	30	
	Mastectomía regional/ radical	12 (21.8)	9 (23.1)	21	
Total		55	39	94	
Margen	Limpio	42 (76.4)	33 (84.6)	75	0.326
	Sucio	13 (23.6)	6 (15.4)	19	
Total		55	39	94	
Tamaño tumor	a (< 1 cm)	7 (13.2)	5 (12.8)	12	0.003*
	b (1-2.9 cm)	19 (35.8)	27 (69.2)	46	
	c (≥ 3 cm)	27 (50.9)	7 (17.9)	34	
Total		53	39	92	

Tabla XVII. Variables estudiadas para los Equipos de cirujanos.(continuación)						
Variables			Equipos de cirujanos		Total	P
			A (%)	B (%)		
Invasión vascular	No		50 (90.9)	37 (94.9)	87	0.471
	Si		5 (9.1)	2 (5.1)	7	
	Total		55	39	94	
Necrosis	No		36 (65.5)	29 (74.4)	65	0.357
	Si		19 (34.5)	10 (25.6)	29	
	Total		55	39	94	
Metástasis a linfonodo	No		52 (94.5)	36 (92.3)	88	0.662
	Si		3 (5.5)	3 (7.7)	6	
	Total		55	39	94	
Mortalidad	No		33 (60.0)	29 (74.4)	62	0.148
	Si		22 (40.0)	10 (25.6)	32	
	Total		55	39	94	
Mortalidad por el tumor	No		9 (42.9)	5 (50.0)	14	0.709
	Si		12 (57.1)	5 (50.0)	17	
	Total		21	10	31	

* $P < 0,050$

6.7.- Supervivencia

La supervivencia media de toda la población del estudio fue de $19,4 \pm 1,6$ meses (16,4-22,5, IC 95%), con una mediana de 17 meses $\pm 2,3$ (12,5-21,5, IC 95%) (Figura 23).

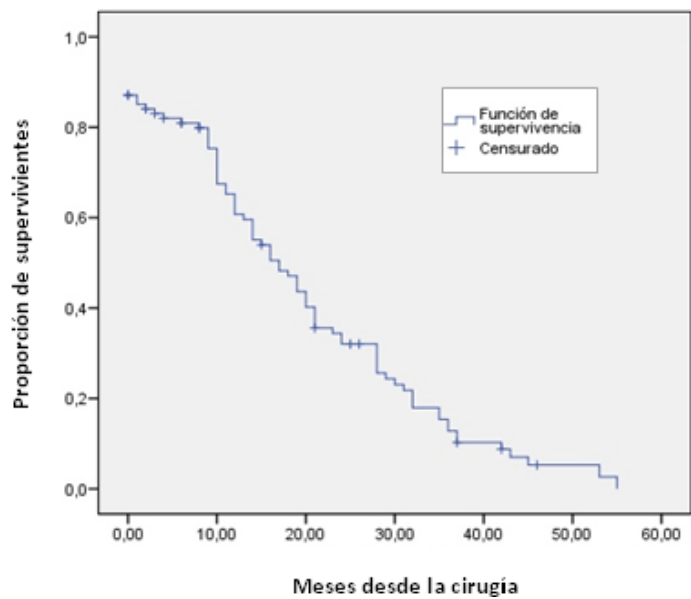


Figura 23. Supervivencia para la población total inducida en el estudio estimado por el método de Kaplan-Meier

Se realizó el análisis de supervivencia sobre el total de perras que fallecieron a causa del tumor maligno (n: 17). La media de supervivencia para este grupo fue de 15 meses $\pm$ 3,6 meses (7,8-22,2, IC 95%) (Figura 24) con una estimación de la mediana de 8 meses $\pm$ 1,4 (5,4-10,7, IC 95%).

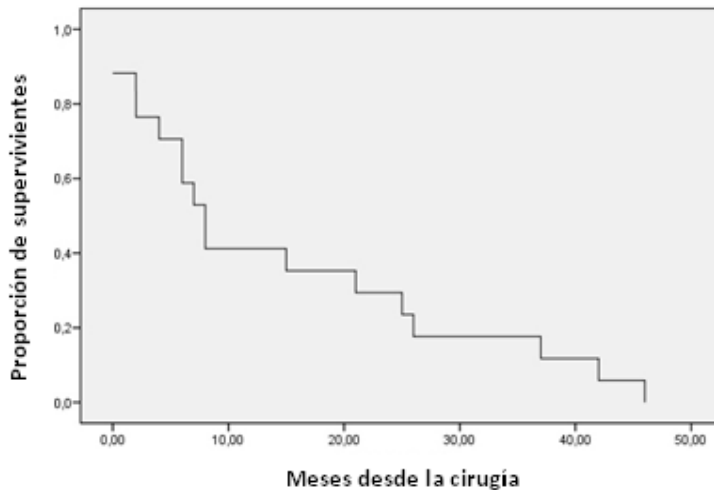


Figura 24. Supervivencia para la población fallecida por el tumor mamario maligno estimada por el método de Kaplan-Meier

De las bajas causadas por el tumor mamario (n: 17), el 76,5% (n: 13) no tenía metástasis a linfonodo frente al 23,5% (n: 4). Las perras que no presentan metástasis sobreviven 16,5 meses de media frente a los 10 meses de las que presentan metástasis a linfonodo. El 25% de las perras sin metástasis a linfonodo están vivas a los 26 meses tras la cirugía frente a los 8 meses de supervivencia presentan las perras con metástasis ganglionar. A pesar de que las perras fallecidas sin metástasis tuvieron mayor período de supervivencia 16,5 (7,5-25,4, IC 95%) que las que tenían metástasis a linfonodo 10,3 (0,3-20,2, IC 95%) no resultó ser estadísticamente significativo (Figura 25).

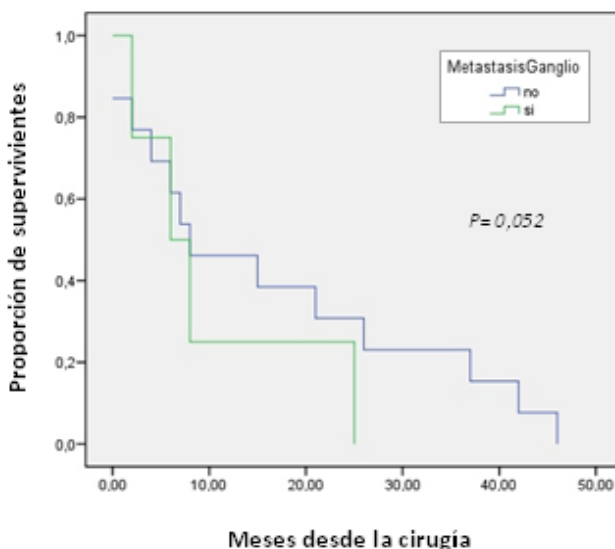


Figura 25. Supervivencia para la población fallecida a causa del tumor mamario maligno según la metástasis ganglionar.

Resultados

Las perras que fallecieron por la neoplasia y no tenían necrosis tumoral sobrevivieron una media de 17,9 meses frente a los 13 meses de supervivencia para las que no tenían necrosis. El 50% de las pacientes con necrosis estaba vivas a los 6 meses tras la cirugía frente a los 8 meses de las que no tenían necrosis tumoral. El 25% de las pacientes mostró una supervivencia de 37 meses para las perras sin necrosis frente a 25 meses de las que sí tenían tejido tumoral necrosado. Estos valores no son estadísticamente significativos para determinar si aquellas pacientes con necrosis tumoral 13 (4,4-21,6, IC 95%) tenían mayor periodo de supervivencia que las que no tenían necrosis 17,9 (4,9-30,9, IC 95%) (Figura 26).

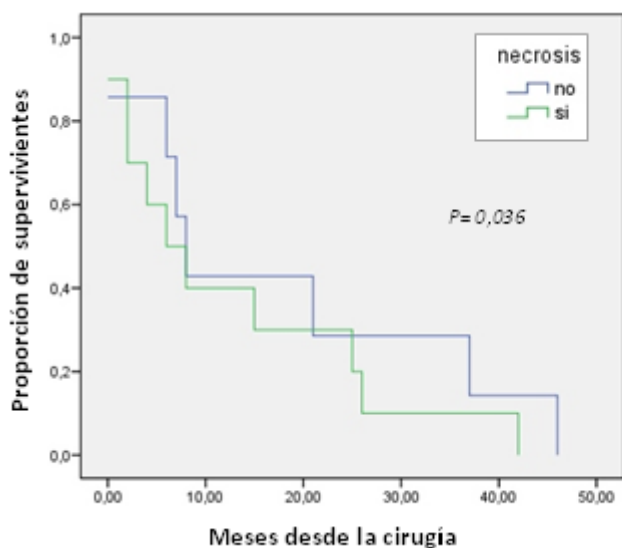


Figura 26. Supervivencia para la población fallecida a causa del tumor mamario maligno según la necrosis tumoral

DISCUSIÓN.

7.- DISCUSIÓN

La neoplasia mamaria canina es una enfermedad multifactorial cuya incidencia varía dependiendo de dónde se han realizado los estudios y de las características específicas de la población, especialmente el estado reproductivo, edad y distribución de las razas. Se trata de una enfermedad heterogénea en la que los aspectos que definen al tejido neoplásico y los constantes cambios en el fenotipo de las células tumorales en el transcurso de la enfermedad van a dificultar el establecimiento de un pronóstico a largo plazo para la misma. Se han propuesto diversas clasificaciones sobre la base de sus características histopatológicas, pero sin embargo no existe un sistema consensuado y así queda demostrado en muchos estudios (*Goldschmidt y cols., 2011; Webster y cols., 2011*). La reclasificación de los tumores de mama caninos según subtipos moleculares con el sistema de clasificación histopatológica podría ayudar a determinar el pronóstico e identificar aquellos tipos de neoplasia que van a responder adecuadamente al tratamiento, pero aún no es un sistema del todo validado (*Im y cols., 2014*).

Por otra parte, aunque el tratamiento de elección es el quirúrgico, no se dispone actualmente de unas pautas de actuación o un protocolo estandarizado. Es importante tener en cuenta que, en general, la supervivencia no está influida por la extensión del procedimiento quirúrgico, y que las actuales recomendaciones de la VSSO establecen como el principal objetivo resear toda la masa tumoral con márgenes libres usando la técnica quirúrgica más simple, lo que contrastaremos con el método tradicional.

Tendremos en cuenta además los factores que se han analizado en estudios previos y que juegan un papel importante en el riesgo de padecer tumores mamarios que, como hemos comentado, son la edad del paciente, raza y exposición hormonal, con el objeto de establecer diferencias o concordancias con nuestros resultados (*Dore y cols., 2003; Chang y cols., 2009; Rivera y cols., 2009*).

En esta tesis doctoral hemos comparado los resultados obtenidos en nuestro estudio con los de la literatura más relevante sobre el tema. Para ello hemos evaluado los factores pronósticos analizando las características epidemiológicas y clínicas de las perras incluidas en el estudio, las características morfológicas e histológicas de los tumores y finalmente comparado los procedimientos quirúrgicos empleados.

7.1.- Influencia de la edad

Las perras con edad media y avanzada son las que presentan mayor riesgo de padecer tumores de mama (*Dorn y cols., 1968; Schneider y cols., 1970 y Taylor y cols., 1976*). En nuestros datos la media de edad de las perras en el momento de la cirugía de mama fue de 9,49 años con un rango de 1 a 15 años. Estos resultados son similares a los obtenidos en estudios previos (*Sorenmo y cols., 2003; Zatloukal y cols., 2005, Horta y*

cols. 2014). Algunos autores opinan que a la edad de 7 u 8 años la predisposición a padecer tumores de mama es significativa y va incrementándose hasta la edad de 11 a 13 (Schneider y cols., 1970; Taylor y cols., 1976). En nuestra casuística los resultados fueron similares a los comentados anteriormente ya que el 75% de la población con tumores tenía edades comprendidas entre 7 y 12 años y solo un 25% más de 12 años.

Varios estudios han relacionado la aparición de tumores malignos con la edad avanzada de la paciente. Hellmén y cols. (1993) consideraron que las perras con edad avanzada tenían peor pronóstico. Otros estudios determinaron que la edad de aparición de tumores de mama malignos es de 9 a 11 años frente a 7 a 9 años en perras con tumores benignos (Goldschmidt y cols., 2001; Sorenmo y cols., 2009). Para intentar buscar una relación entre la edad de las pacientes objeto de nuestro estudio y malignidad del tumor estudiamos la relación entre las edades y el tipo, grado histológico, invasión vascular y mortalidad asociada.

Observamos que las perras que presentaron tumores malignos tenían una media de edad aproximada de 9 años frente a los 7 años de media en las perras con lesiones benignas y aunque estos resultados coinciden con la literatura consultada no fueron, en nuestro caso, estadísticamente significativos, probablemente porque el número de pacientes con lesiones benignas era muy inferior a los que presentaban lesiones malignas. No evidenciamos una diferencia estadísticamente significativa entre tipo histológico y edad de las pacientes, aunque el grupo **OTROS**, en el que se incluyen los carcinomas de células fusiformes, anaplásicos y ricos en lípidos, la edad media era de 6,5 años, lo que induce a pensar que probablemente la edad de aparición de estas neoplasias es independiente de la edad de la paciente. Al comparar la edad de las pacientes con invasión vascular respecto a las que no la presentaban observamos que las edades son muy similares, con aproximadamente 9 años de media. Hay que resaltar que aunque la edad media en el momento de la cirugía de mama entre razas tampoco mostró diferencias significativas, observamos que las razas grandes tienden a presentar tumores a edades más tempranas. Esto coincide con lo descrito en la literatura donde la incidencia de tumores de mama depende de la esperanza de vida de algunas razas, de modo que las razas grandes tienen una esperanza de vida menor y por lo tanto el diagnóstico de tumores de mama se produce cuando son más jóvenes (Egenvall y cols., 2005; Rivera y cols., 2009).

7.2.- Influencia del estado reproductivo

Aproximadamente el 70% de las perras de nuestro estudio eran enteras en el momento de la cirugía. El 21,5% se esterilizó en la misma cirugía de mama y un 8.6% lo hizo con anterioridad aunque desconocemos fecha exacta. El estado reproductivo en nuestra casuística no guardó relación con el pronóstico.

Desde hace varias décadas, es incuestionable que la esterilización a edad temprana reduce significativamente la aparición de tumores mamarios en perras (*Schneider y cols., 1969*). Sin embargo, los efectos preventivos de la ovariectomía en la misma cirugía de mama es un tema que aún crea controversia (*Simon y cols. 1996; Moe, 2001; Rutteman y cols., 2001; Dobson y cols., 2002; Sorenmo y cols., 2003*). Mientras que unos estudios reportan una supervivencia similar entre perras sometidas a resección del tumor mamario y no esterilizadas frente a las que lo son en la misma cirugía (*Allen y cols., 1989; Yamagami y cols., 1996a*), *Sorenmo y cols. (2000)* plantean que la progresión de los tumores mamarios en perras enteras está influenciada por las hormonas y que se pueden beneficiar si se realiza ovariectomía en la misma cirugía de mama. Esta afirmación se basa en el hecho de que al observar que perras castradas conjuntamente con la mastectomía como medida terapéutica para la patología mamaria, presentaron una tasa de supervivencia significativamente mayor a aquellos animales que se sometieron solo a la resección tumoral, confirmando que los pacientes que permanecen reproductivamente intactos hasta el momento de la cirugía, se benefician con la modulación hormonal lograda mediante la esterilización quirúrgica. En nuestro estudio quisimos evaluar el estado reproductivo como factor pronóstico, así que las pacientes fueron divididas en perras enteras y esterilizadas, pero no encontramos una relación entre la mortalidad y recidiva del tumor. El hecho de que solamente valoráramos la relación del estado reproductivo en relación a los tumores malignos y no a la totalidad de la población puede ser la razón para la ausencia de asociación de ambos factores.

Otro estudio compara, en tumores benignos de mama, el riesgo de desarrollar nuevos tumores de mama dependiendo de si las pacientes se habían esterilizado o no de forma simultánea a la resección tumoral (*Kristiansen y cols., 2013*). En nuestro estudio no pudimos valorar si existía un menor riesgo de padecer tumores mamarios tras la ovariectomía en perras con tumores benignos debido al limitado número de casos incluidos en este grupo.

7.3.- Influencia de las razas

En relación a las razas más predispuestas a padecer tumores de mama, nos encontramos con que las mestizas seguidas de Yorkshire Terrier, son las que presentan mayor riesgo de desarrollar tumores de mama. Esto contrasta con autores como *Zatloukal y cols. (2005)* que determinaron, en un estudio de 214 perras, que los Caniches y Cocker Spaniel tenían mayor riesgo de desarrollar tumores de mama. Sin embargo, otro estudio más reciente coincide en que los mestizos junto con Caniches y Cocker Spaniel son las razas que más padecen tumores de mama (*Horta y cols., 2014*). Esta discordancia puede deberse a la popularidad racial según el área geográfica donde se estudiaron los tumores mamarios y a que la distribución de razas difiere en los distintos estudios. Hemos de resaltar que en nuestra casuística las razas se clasificaron

según el peso y que las perras mestizas se englobaron en un grupo aparte que abarcaba desde los 5 hasta los 45 kg.

7.4.- Influencia del tipo histológico y distribución del tumor en el pronóstico

El 56% de nuestras pacientes presentaba tumores múltiples frente al 44% de perras con tumores solitarios. *Benjamin y cols. (1999)* describieron en su estudio que el 60% de los casos aproximadamente se correspondía con lesiones múltiples y que existe una correlación entre el número de lesiones y diagnósticos. En nuestro estudio, en aquellas pacientes que presentaron lesiones múltiples, tomamos como referencia la que poseía el comportamiento más agresivo y no incluimos el análisis estadístico de las lesiones menos agresivas.

Atendiendo a la proporción de tumores malignos, en nuestro estudio ésta se considera alta (93,1%), muy similar a la obtenida por *Simeonov y Stoikov (2006)* y superior a la determinada por *Sorenmo (2003)* y *Sorenmo y cols. (2013)*, de *Nardi y cols., (2002)* y *Filho y cols. (2010)* con un ratio de 50%, 68,4% y 73.3%, respectivamente. Este hecho probablemente se explica bien porque algunas muestras, tras la cirugía, no fueron remitidas al Servicio de Anatomía Patológica, ó porque desde la aparición del tumor hasta su diagnóstico o cirugía había transcurrido un largo periodo en el que la lesión benigna malignizó, manteniendo la idea de la progresión continua desde las lesiones preneoplásicas hasta carcinomas plenamente invasivos, como también se describe en el cáncer de mama humano (*Oliveira y cols., 2003; Antuofermo y cols., 2007; Sorenmo y cols., 2009*).

En cuanto al tipo histológico, el grupo CCM formado por carcinomas complejos de mama y carcinomas en tumores mixtos, que fueron clasificados conjuntamente, representaron el 50% del total de la población con tumores malignos seguido del 30,9% de los carcinomas simple tubulopapilares. Al revisar la literatura, observamos que los resultados difieren entre artículos. *Horta y cols. (2014)* obtuvieron un 47,5% de carcinomas en tumor mixto del total de tumores malignos. El tipo histológico más representativo de *Santos y cols. (2013)* con un 35,3% fue el carcinoma sólido, mientras que para *Rezaie y cols. (2009)* lo fue el carcinoma tubulopapilar con un 70,6%. Esto es debido probablemente a la falta de un método histológico estandarizado y en nuestro estudio en concreto a que hemos reunido dos tipos histológicos en un mismo grupo (carcinomas complejos y mixtos).

El tipo histológico es uno de los factores pronósticos con más valor, siendo el carcinoma sólido el que presenta peor pronóstico, al compararlo con otras neoplasias mamarias epiteliales (*Misdorp y Hart., 1976; Else y Hannant, 1979; Parodi y cols., 1983; Yamagami y cols., 1996b; Szczubial y cols., 2004*). En nuestro análisis, el tipo histológico resultó ser un factor predisponente a padecer metástasis a distancia y/o recidivas, siendo

el carcinoma simple sólido el tipo histológico más agresivo en este aspecto con un 33,3% de metástasis a distancia y/o recidivas locales. Sin embargo, no se demostró una asociación estadísticamente significativa entre el tipo histológico y mortalidad, a pesar de que casi la mitad de las pacientes que fallecieron a causa del tumor (41,2%) presentaban carcinoma simple sólido (CSS), quizás por el hecho de que en nuestro estudio el número de muertes a causa del tumor maligno es muy bajo.

Una de las publicaciones consultadas encontró que las mamas más frecuentemente afectadas en las perras eran las abdominales caudales e inguinales (*Cassali y cols., 2011*), coincidiendo con nuestro estudio, en el que un alto porcentaje afectaba a las mamas caudales (45,3%). Una explicación a este hecho es que las mamas caudales poseen mayor cantidad de tejido mamario y de receptores hormonales que favorecen la aparición de neoplasias (*Donnay y cols., 1995*). En nuestro estudio observamos que las pacientes que presentaron tumores en las mamas caudales o de manera simultánea las caudales y craneales presentan mayor probabilidad de desarrollar metástasis a distancia y/o recidiva que las que tenían tumores solamente en las mamas craneales. Sin embargo, no encontramos relación entre mortalidad y localización de los tumores.

7.5.- Influencia del tamaño tumoral

Estudiamos la importancia del tamaño tumoral como indicador pronóstico en los tumores de mama malignos de las perras incluidas en el estudio. En la serie estudiada, el tamaño tumoral más representativo fue el comprendido en el intervalo 1 a 2,9 cm con un porcentaje de 50% (n: 46), siendo el tipo histológico más común en este grupo el carcinoma complejo de mama con el 54,3% de las pacientes. Observamos una relación estadísticamente significativa del tamaño tumoral con la invasión vascular, metástasis a linfonodo y metástasis a distancia y/o recidiva. Sin embargo, no hallamos tal relación con la mortalidad, tipo ni grado histológico. En un estudio llevado a cabo por *Ferreira y cols. (2009)* encontraron una correlación significativamente estadística entre el tamaño tumoral y tiempo de supervivencia global. Otro estudio sugiere que los tumores mamarios progresan de benignos a malignos tras observar que los tumores malignos tenían un tamaño mayor que los benignos (*Sorenmo y cols., 2009*). La significación estadística para el tamaño tumoral en nuestro estudio debe interpretarse con cautela, ya que tanto el número de pacientes con invasión vascular como con metástasis a linfonodo fue muy reducido.

7.6.- Influencia de las metástasis a linfonodo

Un 6,4% de los pacientes de nuestra población presentó metástasis a linfonodo. Este porcentaje debemos considerarlo bajo al compararlo con los descritos en la literatura. *Chang y cols. (2005)* tuvieron un 44% de metástasis a linfonodo, mientras que *Santos y cols. (2013)* alcanzaron aproximadamente un 30% de metástasis ganglionar.

Corroborando estudios previos (*Kurzman y cols., 1986; Hellmén y cols., 1993; Nieto y cols., 2000*), observamos que la presencia de metástasis a linfonodos es un factor pronóstico negativo. En nuestras pacientes también observamos que la presencia de metástasis a linfonodo regional se asoció con un mayor riesgo de padecer metástasis a distancia y/o recidivas tumorales. Además, existió una asociación estadísticamente significativa con el tamaño tumoral. Sin embargo no fue posible demostrar su valor pronóstico para la mortalidad a causa de la neoplasia, probablemente por el número reducido de pacientes que presentaban metástasis a linfonodo regional y murieron.

7.7.- Influencia del grado histológico

Al analizar el grado histológico, hallamos un mayor porcentaje de tumores de grado II (60,6%) seguido de grado III (22,3%) y finalmente grado I con el 17%. Estos resultados coinciden en parte con los obtenidos por *Tavassoly y cols. (2013)*, donde el grado II con un 46,9% es el más representativo del grupo estudiado seguido de un 37,5% de grado I.

El grado histológico resultó ser un factor pronóstico negativo en nuestra casuística. Más de la mitad de las pacientes que desarrollaron recidivas locales y/o metástasis a distancia tenían grado III. Aunque el 58,8% de la población que falleció a causa del tumor era grado III, éste no resultó estadísticamente significativo. Probablemente este hecho se deba a que casi el 30% de las perras que murieron debido a otras causas independientes del tumor mamario tenían un grado histológico III. Este hecho absolutamente inesperado y que podría atribuirse al azar, ha causado un importante sesgo en la población evaluada.

La relación entre grado y tipo histológico resultó estadísticamente significativa en nuestro estudio coincidiendo con lo consultado en la literatura (*Karayannopoulou y cols., 2005*). El grupo formado por los carcinomas simples sólidos (CSS) grado III fue el más representativo, confirmando el mal pronóstico de este tipo histológico (*Misdorp, 2002*).

7.8.- Influencia de la invasión vascular

La invasión vascular juega importante valor pronóstico según algunos trabajos científicos, indicando un mal pronóstico (*Goldschmidt y cols., 2011*). *Gilberston* en 1983 realizó su propia estadificación para tumores mamarios caninos, en la que relacionó la invasión vascular con la tasa de reaparición de la enfermedad en dos años de control. Por su parte, *Misdorp y cols., (1979)* encontraron diferencia en la tasa de sobrevida a dos años de control. Coincidiendo con la literatura, en nuestro estudio existe una asociación entre invasión vascular y metástasis a distancia y/o recidivas y mortalidad. *Tavassoly y cols. (2013)* señalan que los tumores grado III tuvieron mayor invasión vascular y linfática. En nuestro caso no estudiamos tal asociación estadística, sin embargo, del total de pacientes con invasión vascular (n: 7), 6 tenían grado III, con lo

que la invasión vascular es un factor que nos sugiere una clara tendencia a metastatizar y nos ayuda a determinar el mejor tratamiento adyuvante tras la cirugía.

7.9.- Influencia de la necrosis tumoral

Coincidiendo nuevamente con la literatura consultada, el 70% de las pacientes en nuestro estudio presentó necrosis tumoral (*Santos y cols., 2013*). Por otra parte la relación entre necrosis tumoral con mortalidad y metástasis a distancia y/o recidivas fue significativa, lo que también concuerda con los resultados obtenidos en otros trabajos similares que sugiere la necrosis tumoral como factor pronóstico desfavorable (*Hellmén y cols., 1993; Pérez-Alenza y cols., 1997; Martín de las Mulas y cols., 2005*).

7.10.- Influencia de los equipos de cirujanos

A pesar de que la cirugía se considera el tratamiento de elección para los tumores de mama caninos no existe un protocolo quirúrgico estandarizado. Se han establecido diversas técnicas quirúrgicas cuyas ventajas y desventajas siguen siendo debatidas. Mientras unos autores defienden la mastectomía radical, basándose en que la eliminación del tejido mamario reduce la aparición de neoplasias mamarias, otros defienden el realizar cirugías sencillas que permitan eliminar todo el tejido tumoral con márgenes libres. Basarse exclusivamente en el drenaje linfático de las mamas a la hora del planteamiento quirúrgico no es del todo acertado ya que se ha demostrado que puede cambiar en el tejido mamario neoplásico e incluso en el tejido mamario normal (*Patsikas y Dessiris, 1996 a y b; Patsikas y cols., 2006*), y que el tejido linfático reseca en las mastectomías es solo una parte del potencialmente invadido por la neoplasia ya que la eliminación del total sería impracticable o conllevaría una elevadísima e inaceptable morbilidad.

En esta tesis doctoral comparamos las técnicas quirúrgicas realizadas por dos equipos de cirujanos y las características de la población en cada caso. Ambas poblaciones no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre raza, estado reproductivo y edad. Como diferencias a señalar el Grupo B presentó 7 pacientes con lesiones exclusivamente de carácter benigno, mientras que todas las pacientes del Grupo A presentaron al menos una neoplasia maligna. En la población general observamos que el tipo de técnica quirúrgica, ya sea nodulectomía, mastectomía simple o mastectomía regional o radical, no afectó la evolución de la paciente. Debemos recalcar que en el caso de pacientes con tumores múltiples consideramos exclusivamente el tumor de mayor agresividad, lo cual no excluye que presentasen además otros tumores de carácter benigno. En el caso del Grupo A desconocemos si en todos los casos se evaluó la totalidad de las neoplasias existentes o si el tiempo entre el hallazgo de la lesión y la intervención quirúrgica fuese superior en el caso de este grupo. También la localización del tumor fue diferente en ambos grupos ya que en el Grupo A

tanto las mamas craneales como caudales se afectaban simultáneamente en el 48,6% de las perras mientras que en el Grupo B las mamas más frecuentemente afectadas, con el 55,3% fueron las caudales.

Al comparar el grado histológico entre pacientes de los dos grupos de cirujanos obtuvimos diferencias significativas. Aunque en ambos grupos el grado II es el más frecuente, en el Grupo A solo el 5,5% de las pacientes tenían grado I frente al 33,3% del Grupo B. Esto indica que el conjunto de pacientes intervenidos por el Grupo A presentó tumores más agresivos que el del Grupo B. Al analizar el tamaño tumoral entre las poblaciones asignadas a cada equipo también observamos diferencias significativas, consistentes en que en el grupo A poco más de la mitad de los tumores analizados se sitúan en el rango ≥ 3 cm y que en el Grupo B, aproximadamente, el 70% de los casos mide entre 1 y 2,9 cm. Dada la correlación existente entre aumento del tamaño tumoral y aumento del grado histológico, parece lógico pensar que bien por razones aleatorias o por prolongar el tiempo entre la detección del tumor y su resección quirúrgica los tumores del Grupo A presentaron características más agresivas.

Los porcentajes de invasión vascular, necrosis, metástasis a linfonodo y mortalidad no variaron entre equipos de cirujanos. Las técnicas quirúrgicas realizadas por los equipos de cirujanos así como margen de los tumores no evidencian diferencias entre los dos grupos. La técnica selectiva o “a la carta” resultó ser tan eficaz como la convencional. Esta técnica conlleva una menor morbilidad postquirúrgica y permite una eliminación más precoz de todo el tejido tumoral, lo cual supone una ventaja a la hora de evitar los factores desfavorables relacionados con el crecimiento tumoral que tiene lugar en los casos de una cirugía que se aplaza para poder eliminar ambas cadenas mamarias. Además la técnica “*en mariposa*”, con resección cuidadosa del tejido mamario permite, en los casos en los que sea estrictamente necesario, la eliminación conjunta de ambas cadenas mamarias en un solo procedimiento.

7.11.- Supervivencia

La supervivencia de la población general estudiada tras la cirugía de mama es de unos 20 meses de media. Ha de tenerse en cuenta que el periodo de evaluación de los pacientes fue en algunos casos no superior a un año, afectando este hecho de forma notable a la supervivencia total de la población. En el caso de las perras que murieron por causas asociadas al tumor de mama, ésta fue de 15 meses sin presentar diferencia estadísticamente significativa con la población total del estudio. La escasa diferencia observada entre ambas supervivencias es muy probablemente debida al reducido número de pacientes estudiados que presentaron metástasis o recidiva. Otra circunstancia sin duda relevante en estos resultados es el haber trabajado sobre una población de la que previamente se habían excluido aquellos pacientes que presentaron metástasis y/o recidiva antes de la cirugía, ya que uno de los objetivos de esta tesis

doctoral fue evaluar de qué manera la técnica quirúrgica selectiva podía influir en la aparición de metástasis y recidivas. Debemos considerar por tanto la existencia de un sesgo en el número de pacientes que presentaron este tipo de complicaciones.

CONCLUSIONES.

8.- CONCLUSIONES

- 1) Los parámetros que influyeron de manera significativa en el pronóstico de las pacientes fueron: tamaño tumoral, grado histológico, invasión vascular y tipo histológico.
- 2) Edad, raza y estado reproductivo no parecen influenciar el pronóstico de las pacientes caninas afectadas por los tumores de mama
- 3) La necrosis tumoral y metástasis a linfonodo no presentaron significación estadística en cuanto al valor pronóstico.
- 4) La realización de una técnica selectiva tendente a eliminar todo el tejido tumoral de manera simultánea y de forma precoz no presenta diferencias en cuanto a supervivencia y pronóstico al compararla con el procedimiento quirúrgico convencional.

BIBLIOGRAFÍA.

9.- BIBLIOGRAFÍA

- Abrial, C., Mouret-Reynier, M., Curé, H., Feillel, V., Leheuteur, M., lemyer, S., ...Chollet, P. (2006). Neoadjuvant endocrine therapy in breast cancer. *Breast*, 15 (1), 9-19. doi: 10.1016/j.breast.2005.07.009.
- Adelfinger, M., Bessler, S., Frentzen, A., Cecil, A., Langbein-Laugwitz, J., Gentschev, I., Szalay, AA. (2015). Preclinical Testing Oncolytic Vaccinia Virus Strain GLV-5b451 Expressing an Anti-VEGF Single-Chain Antibody for Canine Cancer Therapy. *Viruses*, 7 (7), 4075-92. doi: 10.3390/v7072811.
- Ades, F., Zardavas, D., Bozovic-Spasojevic, I., Pugliano, L., Fumagalli, D., de Azambuja, E., ...Piccart, M. (2014). Luminal B breast cancer: molecular characterization, clinical management, and future perspectives. *Journal of Clinical Oncology*, 32 (25), 2794-2803.
- Ahern, T.E., Bird, R.C., Bird, A.E., Wolf, L.G. (1996). Expression of the oncogene c-erbB-2 in canine mammary cancers and tumor-derived cell lines. *American Journal of Veterinary Research*, 57 (5), 693–696.
- Al-Dissi, A.N., Haines, D.M., Singh, B., Kidney, B.A. (2010). Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 in canine simple mammary gland adenocarcinomas. *The Canadian Veterinary Journal*, 51(10), 1109–1111.
- Alexandre, L., Clark, A.B., Bhutta, H.Y., Holt, S., Lewis, M.P., Hart, A.R. (2014). Statin use is associated with reduced risk of histologic subtypes of esophageal cancer:

- a nested case-control analysis. *Gastroenterology*, 146 (3), 661–668. doi: 10.1053/j.gastro.2013.11.046.
- Allen, S.W., Prasse, K.W., Mahaffey, E.A. (1986). Cytologic differentiation of benign from malignant canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 23(6), 649–655.
- Allen, S.W., Mahaffey, E.A. (1989). Canine mammary neoplasia: prognostic indicators and response to surgical therapy. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 25, 540- 546.
- 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.
- Anreddy, N., Gupta, P., Kathawala, R.J., Patel, A., Wurperl, J.N.D., Chen, Z. (2014). Tyrosine kinase inhibitors as reversal agents for ABC transporter mediated drug resistance. *Molecules*, 19, 13848–13877.
- 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 and Prevention*, 16(11), 2247-2256.
- Araújo, M.R., Campos, L.C., Ferreira, E., Cassali, G.D. (2015). Quantitation of the Regional Lymph Node Metastatic Burden and Prognosis in Malignant Mammary Tumors of Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(5), 1360-1367. doi: 10.1111/jvim.13576.
- Baan, M., Taverne, M.A., Kooistra, H.S., de Gier, J., Dieleman, S.J., Okkens, A.C. (2005). Induction of parturition in the bitch with the progesterone-receptor blocker aglepristone. *Theriogenology*, 63(7), 1958–1972.

- Baillargeon, J., Rose, D.P. (2006). Obesity, adipokines, and prostate cancer (review). *International Journal of Oncology*, 28(3), 737–745.
- Bajetta, E., Zilembo, N., Buzzoni, R., Celio, L., Zampino, M.G., Colleoni, ...Martinetti A. (1994). Goserelin in premenopausal advanced breast cancer: clinical and endocrine evaluation of responsive patients. *Oncology*, 51(3), 262–269.
- Barone, R. (1990). *Mamelles. Tome IV: Splanchnologie II*. Ediciones Vigot, Paris.
- Barone, R. (1996). *Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tomo V: Angiologie*, (pp.687-878). Ediciones Vigot, Paris.
- Bartels, K.E., Ferguson, H.R., Gillette, E.L., Ferguson, H.L. (1978). Simultaneous bilateral mastectomy in the dog. *Veterinary Surgery*, 7(4), 97-102.
- Bearss, J.J., Schulman, F.Y., Carter, D. (2012). Histologic, immunohistochemical, and clinical features of 27 mammary tumours in 18 male dogs. *Veterinary Pathology*, 49(4), 602-607. doi: 10.1177/0300985811402843. Epub 2011 Mar 24.
- Beatson, C.T. (1896). On treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. *The Lancet*, 2, 104–7.
- Beenken, S.W., Grizzle, W.E., Crowe, D.R., Conner, M.G., Weiss, H.L., Sellers, M.T., ...Bland, K.I. (2001). Molecular biomarkers for breast cancer prognosis: coexpression of c-erbB-2 and p53. *Annals of Surgery*, 233(5), 630-638.

- Benazzi, C., Sarli, G., Galeotti, N., Marcato, P.S. (1993). Basement membrane components in mammary tumours of the dog and the cat. *Journal of Comparative Pathology*, 109(3), 241-252.
- 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(5), 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(5), 423-436.
- Bergh, J., Jönsson, P.E., Lidbrink, E.K., Trudeau, M., Eiermann, W., Brattström, D., ...Henriksson R. (2012). FACT: an openlabel randomized phase III study of fulvestrant and anastrozole in combination compared with anastrozole alone as first-line therapy for patients with receptor-positive postmenopausal breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 30(16), 1919-1925.
- 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. doi:10.1016/j.vetimm.2008.02.013.
- Bird, R.C., Deinnocentes, P. & Church Bird A.E. (2011). An autologous dendritic cell canine mammary tumor hybrid-cell fusion vaccine. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 60(1), 87-97. doi: 10.1007/s00262-010-0921-2

- Bloom, H.J. & 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(3), 359-377.
- 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.
- Boland, G.P., Butt, I.S., Prasad, R., Knox, W.F. & Bundred, N.J. (2004). COX-2 expression is associated with an aggressive phenotype in ductal carcinoma in situ. *British Journal of Cancer*, 90(2), 423-429.
- Boldizsar, H., Muray, T., Szamel, I., Szenci, O. & Csenki, J. (1992). Oestradiol and progesterone receptor binding capacity and histological type. *Acta Veterinaria Hungarica*, 4(1-2), 89-97.
- Bonkobara, M. (2015). Dysregulation of tyrosine kinases and use of imatinib in small animal practice. *The Veterinary Journal*, 205(2), 180-188. doi:10.1016/j.tvjl.2014.12.015.
- Bonovas, S., Lytras, T. & Sitaras, N.M. (2014). Statin use and breast cancer: do we need more evidence and what should this be? *Expert Opinion on Drug Safety*, 13(3), 271–275. doi: 10.1517/14740338.2014.888806.
- Bostock, D.E. (1975). The prognosis following the surgical excision of canine mammary neoplasms. *European Journal of Cancer*, 11(6), 389–396.
- Bostock, D.E. (1986). Canine and feline mammary neoplasms. *British Veterinary Journal*, 142 (6), 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(5) 381-385.
- Bremnes, R.M., Vere, R., Hirsch, F.R. & Franklin, W.A. (2002). The e-cadherin cell-cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis and prognosis. *Lung Cancer*, 36(2), 115-124.
- Brodey, R.S., Goldschmidt, M.H. & Roszel, J.R. (1983). Canine mammary gland neoplasms. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 19, 61–90.
- Brodey, R.S., Fidler, I.J. & Howson, A.E. (1966). The relationship of estrous irregularity, pseudopregnancy, and pregnancy to the development of canine mammary neoplasms. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 149(8), 1047– 1049.
- 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. *The Veterinary Record*, 166(19), 586–590.
- Burrai, G.P., Tanca, A., De Miglio, M.R., Abbondio, M., Pisanu, S., Polinas, M., ...Antuofermo, E. (2015). Investigation of HER2 expression in canine mammary tumors by antibody-based, transcriptomic and mass spectrometry analysis: is the dog a suitable animal model for human breast cancer?. *Tumour Biology*. Disponible en: <http://link.springer.com.bibproxy.ulpgc.es/article/10.1007%2Fs13277-015-3661-2>.

- Burstein, H.J. (2005). The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *The New England Journal of Medicine*, 353(16), 1652–1654.
- Callan, M.B. & Giger, U. (2002). Effect of desmopressin acetate administration on primary hemostasis in Doberman Pinschers with type-1 von Willebrand disease as assessed by a point-of-care instrument. *American Journal of Veterinary Research*, 63(12), 1700–1706.
- Camacho, L., Peña, L., Gil, A., Martín-Ruiz, A., Dunner, S. & Illera, J. (2014). Immunohistochemical vascular factor expression in canine inflammatory mammary carcinoma. *Veterinary Pathology*, 51(4), 737–748.
- Carmichael, A.R. & Bates, T. (2004). Obesity and breast cancer: a review of the literature. *Breast*, 13(2), 85–92.
- Carvalho, M.I., Guimarães, M.J., Pires, I., Prada, J., Silva-Carvalho, R., Lopes, C. & Queiroga, F.L. (2013). EGFR and microvessel density in canine malignant mammary tumours. *Research in Veterinary Science*, 95(3), 1094–1099. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.09.003.
- Cassali, G.D., Gobbi, H., Malm, C. & Schmitt, F.C. (2007). Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumours: comparative features with human tumours. *Cytopathology*, 18(3), 191–196.
- Cassali, G.D., Lavalle, G.E., De Nardi, A.B., ...Campos, C.B. (2011). Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 4(2), 153–180.

- Cataliotti, L., Buzdar, A.U., Noguchi, S., Bines, J., Takatsuka, Y., Petrakova, K., ...de Oliveira, C.T. (2006). Comparison of anastrozole versus tamoxifen as preoperative therapy in postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer: the Pre-Operative "Arimidex" Compared to Tamoxifen (PROACT) trial. *Cancer*, 106(10), 2095-2103.
- Cecil, A., Gentshev, I., Adelfinger, M., Nolte, I., Dandekar, T. & Szalay, A.A. (2014). Antigen profiling analysis of vaccinia virus injected canine tumors: oncolytic virus efficiency predicted by boolean models. *Bioengineered*, 5(5), 319-325. doi: 10.4161/bioe.32227.
- 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(4), 391–396. doi: 10.2460/javma.235.4.391
- 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.
- Cleary, M.P. & Grossmann, M.E. (2009). Minireview: obesity and breast cancer: the estrogen connection. *Endocrinology*, 150(6), 2537–2542. doi: 10.1210/en.2009-0070.
- Clemente, M., De Andrés, P.J., Peña, L. & Pérez-Alenza, M.D. (2009). Survival time of dogs with inflammatory mammary cancer treated with palliative therapy alone or palliative therapy plus chemotherapy. *The Veterinary Record*, 165(3), 78–81.

- Clemente, M., Pérez-Alenza, M.D. & Peña, L. (2010). Metastasis of canine inflammatory versus non-inflammatory mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 143(2-3), 157–163. doi: 10.1016/j.jcpa.2010.02.002
- Clemente, M., Sánchez-Archidona, A., Sardón, D., Díez, L., Martín-Ruiz, A., Cáceres, S., ...Peña, L. (2013). Different role of COX-2 and angiogenesis in canine inflammatory and non-inflammatory mammary cancer. *The Veterinary Journal* 197(2), 427–432. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.02.009.
- Cohen, D., Reif, J.S., Brodey, R.S. & Keiser, H. (1974). Epidemiological analysis of the most prevalent sites and types of canine neoplasia observed in a veterinary hospital. *Cancer Research*, 34(11), 2859–2868.
- 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(3), 373–387.
- Costa, C., Soares, R., Reis-Filho, J.S., Leitao, D., Amendoeira, I. & Schmitt, F.C. (2002). Cyclooxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 55, 429–434.
- Cox, S.K., Roark, J., Gassel, A. & Tobias, K. (2005). Determination of deracoxib in feline plasma samples using high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 819(1), 181–184,
- Crile, G. (1961). Simplified treatment of cancer of the breast early results of a clinical study. *Annals of Surgery*, 153(5), 745-758.

- Crile, G. (1965). Treatment of breast cancer by local excision. *American Journal of Surgery*, 109(4), 400-403.
- Cserni, G., Bianchi, S., Vezzosi, V., Peterse, H., Sapino, A., Arisio, R., ...Iturriagagoitia, 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., Sestak, I., Pinder, S.E., Ellis, I.O., Forsyth, S., Bundred, N.J., ...George, W.D. (2011). Effect of tamoxifen and radiotherapy in women with locally excised ductal carcinoma in situ: long-term results from the UK/ANZ DCIS trial. *The Lancet. Oncology*, 12(1): 21-9. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70266-7.
- Davidson, E.B. (2003). Treatment of Mammary Tumours in Dogs and Cats (pp.1036-1038). Proceedings of the 2003 North American Veterinary Conference, Orlando, Florida.
- Davies, C., Godwin, J., Gray, R., Clarke, M., Cutter, M., Darby, S., ... Peto, R. (2011). Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet*, 378(9793), 771–784. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60993-8.
- Davies, C., Pan, H., Godwin, J., Gray, R., Arriagada, R., Raina, V., ...Peto, R. (2013). Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptorpositivebreast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet*, 381(9869), 805-816.

- Denkert, C., Winzer, K.J., Müller, B.M., Weichert, W., Pest, S., Köbel, M., ...Hauptmann, S. (2003). Elevated expression of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor for disease-free survival and overall survival in patients with breast carcinoma. *Cancer*, 97(12), 2978-2987.
- Denkert, C., Winzer, K.J. & Hauptmann, S (2004). Prognostic impact of cyclooxygenase-2 in breast cancer. *Clinical Breast Cancer*, 4(6), 428– 433.
- Destexhe, E., Biker, E. & Coignoul, F., (1995). Image analysis evaluation of ploidy, S-phase fraction and nuclear area in canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 11(383), 205-216.
- Dileepkumar, K.M., Maiti, S.K., Kumar, N. & Shams-uz-Zama, M.M. (2015). Therapeutic evaluation of anti-angiogenic and chemotherapy with or without cox-2 inhibitor and immunomodulator drug in the management of canine mammary neoplasm. *Pakistan Veterinary Journal*, 35(3), 365-370.
- Dobson, J.M., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K. & Wood, J.L. (2002). Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 43(6), 240–246.
- Dominguez, P.A., Dervisis, N.G., Cadile, C.D., Sarbu, L. & Kitchell, B.E. (2009). Combined gemcitabine and carboplatin therapy for carcinomas in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(1), 130–137.
- Donnay, I., Rauis, J. & Verstegen, J. (1989). Epidemiology And Hormone-Dependence of Canine Mammary-Tumors. *Annales De Medecine Veterinaire* 133, 491.

- Donnay, I., Rauis, J., Wouters-Ballman, P., Devleeschouwer, N., Leclercq, G. & Verstegen, J.P. (1993). Receptors for oestrogen, progesterone and epidermal growth factor in normal and tumorous canine mammary tissues. *Journal of Reproduction and Fertility*, 47, 501–512.
- Donnay, I., Rauis, J., Devleeschouwer, N., Wouters-Ballman, P., Leclercq, G. & Verstegen, J. (1995). Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 56(9), 1188–1194.
- Doré, M., Lanthier, I. & Sirois, J. (2003). Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 40(2), 207– 212.
- 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(2), 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.
- Dutra, A.P., Granja, N.V., Schmitt, F.C. & Cassali, G.D. (2004). c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(11), 1673–1681.
- Dyce, K.M., Sack W.O., Wensing C.J.G. (2010). Textbook of veterinary anatomy, 4^aed. Missouri, Saunders.

- Egenvall, A., Bonnett, B.N., Ohagen, P., Olson, P., Hedhammar, A. & Von Euler, H. (2005). Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Preventive Veterinary Medicine*, 69(1-2), 109–127.
- Ehrhart, E.J. (2008, Enero). Mammary gland tumors: your questions answered. En Proceedings of the North American Veterinary Conference (NAVC). Orlando, Florida.
- Eiermann, W., Paepke, S., Appfelstaedt, J., Llombart-Cussac, A., Eremin, J., Vinholes, J., ...Borgs, M. (2001). Preoperative treatment of postmenopausal breast cancer patients with letrozole: A randomized double-blind multicenter study. *Annals of Oncology*, 12(11), 1527-1532.
- Eisenhauer, E.A., Therasse, P., Bogaerts, J., Schwartz, L.H., Sargent, D., Ford, R., ...Verweij, J. (2009). New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *European Journal of Cancer*, 45(2), 228–247.
- Elling, H. & Ungemach, F.R. (1983). Simultaneous occurrence for receptors of 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). Breast Pathology. En Fletcher CDM (Ed.), *Diagnostic Histopathology of Tumours Third Edition* (pp. 903- 969). Churchill Livingstone Elsevier.
- Else, R.W. & Hannant, D. (1979). Some epidemiological aspects of mammary neoplasia in the bitch. *The Veterinary Record*, 104(14), 296–304.

- Elston, C.W. & Ellis, I.O. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer, I: the value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19(5), 403-410.
- Espinosa de los Monteros, A., Hellmén, E., Ramírez, G.A., Herráez, P., Rodríguez, F., Ordás, J., ...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.
- Estrada, J. & Nicolson, G.L. (1984). Tumor-cell-platelet aggregation does not correlate with metastatic potential of rat 13762NF mammary adenocarcinoma tumor cell clones. *International Journal of Cancer*, 34(1), 101-105.
- Estrela-Lima, A., Araújo, M.S., Costa-Neto, J.M., Teixeira-Carvalho, A., Barrouin-Melo, S.M., Cardoso, S.V., ...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. doi: 10.1186/1471-2407-10-256.
- Estrela-Lima, A., Araujo, M.S.S., Costa-Neto, J.M., Ribeiro, L.G.R., Damasceno, K.A., D'Assis, M.J.M.H., ...Cassali, G.D. (2012). Understanding the immunological heterogeneity of canine mammary carcinomas to provide immunophenotypic features of circulating leukocytes as clinically relevant prognostic biomarkers. *Breast Cancer Research and Treatment*, 131(3), 751–763. doi: 10.1007/s10549-011-1452-z.
- Evans, D.G., Shenton, A., Woodward, E., Lalloo, F., Howell, A., Maher, E.R. (2008). Penetrance estimates for BRCA1 and BRCA2 based on genetic testing in a

Clinical Cancer Genetics service setting: risks of breast/ovarian cancer quoted should reflect the cancer burden in the family. *BMC Cancer*, 8, 155. doi: 10.1186/1471-2407-8-155.

Ferguson, H.R. (1985). Canine mammary gland tumors. *The Veterinary Clinics of North American Small Animal Practice*, 15(3), 501–511.

Ferreira, E., Bertagnolli, A.C., Cavalcanti, M.F., Schmitt, F.C., & Cassali, G.D. (2009). The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 7(4), 230–235.

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. doi: 10.1186/1471-2407-10-61.

Ferreira, E., Gobbi, H., Saraiva, B.S., & Cassali, G.D. (2012). Histological and immunohistochemical identification of atypical ductal mammary hyperplasia as a preneoplastic marker in dogs. *Veterinary Pathology*, 49(2), 322- 329.

Fidler, I.J., & Brodley, R.S. (1967). The biological behavior of canine mammary neoplasms. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 151(10), 1311-1318.

Fieni, F. (2006). Clinical evaluation of the use of aglepristone, with or without cloprostenol, to treat cystic endometrial hyperplasia- pyometra complex in bitches. *Theriogenology*, 66(6-7), 1550–1556.

- Filho, J.C., Kommers, G.D., Masuda, E.K., Marques, B.M.F.P.P., Fighera, R.A., Irigoyen, L.F. & Barros, C.S.L. (2010) Estudo Retrospectivo de 1647 Tumores Mamários em Cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30, 177-185. doi.org/10.1590/S0100-736X2010000200014.
- Fisher, B. (1980). Laboratory and clinical research in breast cancer-a personal adventure: The David A. Karnofsky Memorial Lecture. *Cancer Research*, 40(11), 3863-3874.
- Fitzgibbons, P.L., Murphy, D.A., Hammond, M.E., Allred, D.C., & Valenstein, P.N. (2010). Recommendations for validating estrogen and progesterone receptor immunohistochemistry assays. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 134(6), 930–935. doi: 10.1043/1543-2165-134.6.930.
- Fonseca, C.S., & Daleck, C.R. (2000). Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovari-histerectomia como terapia adjuvante. *Ciência Rural*, 30(4), 731-735.
- Fossum, T.W., & Hedlund, C.S. (1997). Mammary neoplasia. En: Duncan L. (Ed.), *Small Animal Surgery* (pp. 539-544). Don Ladig, St-Louis.
- Francis, P.A., Regan, M.M., & Fleming, G.F. (2015). Adjuvant ovarian suppression in premenopausal breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 372(17), 1673. doi: 10.1056/NEJMc1502618.
- Frandsen, R.D., Spurgeon, T.L. (1992). Anatomy of the mammary glands. En: Cann C.C. (ed.), *Anatomy and Physiology of Farm Animals* (pp. 466– 473). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

- Gabai, V., Venanzi, F.M., Bagashova, E., Rud, O., Mariotti, F., Vullo, C., ...Shneider, A. (2014). Pilot study of p62 DNA vaccine in dogs with mammary tumors. *Oncotarget*, 5(24), 12803-10.
- Galán, M., Viñolas, N., Colomer, D., Soler, G., Muñoz, M., Longarón, R., ...Estepé, J. (2002). Detection of occult breast cancer cells by amplification of CK19 mRNA by reverse transcriptase polymerase chain reaction: role of surgical manipulation. *Anticancer Research*, 22(5), 2877– 2884.
- Gama, A., Alves, A., & Schmitt, F. (2008). Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Archiv: an International Journal of Pathology*, 453(2) 123–132.
- Gama, A., Gärtner, F., & Alves, A. (2009). Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in canine mammary tissues. *Research in Veterinary Science*, 87(3), 432–437. doi: 10.1016/j.rvsc.2009.04.016
- Garona, J., & Alonso, D.F. (2014). Reciprocal interactions between tumor and endothelial cells: effects of selective vasopressin V2 receptor peptide agonists. *Cancer Cell and Microenvironment*, 1, e23.
- Gartner, L.P., & Hiatt, J.L. (Eds.) (2006). *Color Textbook of Histology*. Saunders Elsevier.
- 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(1-2), 179–193.

- Gentschev, I., Patil, S.S., Petrov, I., Cappello, J., Adelfinger, M., & Szalay, A.A. (2014). Oncolytic virotherapy of canine and feline cancer. *Viruses*, 6(5), 2122–2137.
- Geraldes, M., Gartner, F., & Schmitt, F. (2000). Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. *The Veterinary Record*, 146(14), 403–406.
- Gilbertson, S.R., Kurzman, I.D., Zachrau, R.E., Hurvitz, A.I., & Black, M.M. (1983). Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Veterinary Pathology*, 20(2), 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(6), 1351–1364.
- Gobello, C., Concannon, P.W., & Verstegen III, J. (2001). Canine pseudopregnancy: a review. En Concannon P.W., England G., Verstegen III J. & Linde-Forsberg C. (Eds.), *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. Disponible en International Veterinary Information Service.
- Goldschmidt, M.H., Shofer, F.S., & Smelstoys, J.A. (2001). Neoplastic lesions of the mammary gland. En Mohr U (Ed.), *Pathobiology of The Aging Dog* (pp. 168–178). Iowa State University Press, Ames, IA.
- Goldschmidt, M., Peña, L., Rasotto, R., & Zappulli, V. (2011). Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 48(1), 117–131. doi: 10.1177/0300985810393258.

- Graham, J.C., & Myers, R.K. (1999). The prognostic significance of angiogenesis in canine mammary tumors. *Journal Veterinary Internal Medicine*, 13(5), 416-418.
- Gray, R., Rea, D., & Handley, K. (2013). Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years in 6,953 women with early breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 31 (Suplemento).
- Griffey, S.M., Verstraete, F.J., Kraegel, S.A., Lucroy, M.D., & Madewell, B.R. (1998). Computer-assisted image analysis of intratumoral intravessel density in mammary tumors from dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 59(10), 1238–1242.
- Guil-Luna, S., Sánchez-Céspedes, R., Millán, Y., De Andrés, F.J., 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
- Guil-Luna, S., Hellmén, E., Sánchez-Céspedes, R., Millán, Y., & Martín de las Mulas, J. (2014). The antiprogestins mifepristone and onapristone reduce cell proliferatopn in the canine mammary carcinoma cell line CMT-u27. *Histology and Histopathology*, 29(7), 949-55.
- .Gupta GP, Nguyen DX, Chiang AC, Bos PD, Kim JY, Nadal C, Gomis RR, Manova-Todorova K, Massague J, 2007. Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature*. 446(7137):765-70.
- Guyton, A.C., & Hall, J.E. (2000). Lactancia. En Guyton, (Ed), *Tratado de Fisiología médica* ,10ª ed. (pp.1148-1151). México McGraw- Hill, Interamericana.

- Haigh, P.I., & Giuliano, A.E. (2000). Role of sentinel lymph node dissection in breast cancer. *Annals of Medicine*, 32(1) 51–56.
- Halsted, W.S. (1894). The results of operations for the cure of cancer of the breast performed at the Johns Hopkins Hospital from June 1889 to January 1894. *Annals of Surgery*, 20(5), 497-555.
- Halsted, W.S. (1898). A clinical and histological study of certain adenocarcinomata of the breast and a brief consideration of the supraclavicular operation and of the results of operations for cancer of the breast from 1889 to 1898 at the Johns Hopkins Hospital. *Annals of Surgery*, 28(5), 557–576.
- Halsted, W.S. (1907). The results of radical operations for the cure of cancer of the breast. *Annals of Surgery* 46(1), 1–19.
- Hammond, M.E., Hayes, D.F., & Wolff, A.C. (2010). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Journal of Oncology Practice*, 6(4), 195-197.
- Hampe, J.F., & Misdorp, W. (1974). Tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bulletin of the World Health Organization*, 50(1-2), 111–133.
- Hara, Y., Masuda, H., Taoda, T., Hasegawa, D., Fujita, Y., Nezu, Y., & Tagawa, M. (2003). Prophylactic efficacy of desmopressin acetate for diabetes insipidus after hypophysectomy in the dog. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 65(1), 17–22.

- Hartveit, F. (1990). Attenuated cells in breast stroma: the missing lymphatic system of the breast. *Histopathology*, 16(6), 533- 543.
- Hellmén, E., & Lindgren, A. (1989). The expression of intermediate filaments in canine mammary glands and their tumours. *Veterinary Pathology*, 26(5), 420-428.
- Hellmén, E., Bergström, R., Holmberg, L., Spängberg, I.B., Hansson, K., & Lindgren, A. (1993). Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Veterinary Pathology*, 30(1), 20-27.
- Hermo, G.A., Torres, P., Ripoll, G.V., Scursoni, A.M., Gomez, D.E., Alonso, D.F., & Gobello, C. (2008). Perioperative desmopressin prolongs survival in surgically treated bitches with mammary gland tumours: a pilot study. *Veterinary Journal*, 178(1), 103–108.
- 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.
- Horta, R.S., Figueiredo, M.S., Lavallo, G.E., Costa, M.P., Cunha, M.R., Araújo, R.B. (2015). Surgical stress and postoperative complications related to regional and radical mastectomy in dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica* 57(1), 34. doi: 10.1186/s13028-015-0121-3.
- Horta, R.S., Lavallo, G.E., Cunha, M.R., Moura, L.L., Araújo, R.B., & Cassali, G.D. (2014). Influence of Surgical Technique on Overall Survival, Disease Free

Interval and New Lesion Development Interval in Dogs with Mammary Tumors. *Advances in Breast Cancer Research*, 3, 38-46.

Hortobagyi, G.N. (2001). Progress in systemic chemotherapy of primary breast cancer: an overview. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, 30, 72–79.

Howell, A., Robertson, J.F.R., Abram, P., Lichinitser, M.R., Elledge, R., Bajetta, E., ...Osborne, C.K. (2004). Comparison of fulvestrant versus tamoxifen for the treatment of advanced breast cancer in postmenopausal women previously untreated with endocrine therapy: a multinational, double-blind, randomized trial. *Journal of Clinical Oncology*, 22(9), 1605-1613.

Howell, A., Cuzick, J., Baum, M., Dowsett, M., Forbes, J.F., Hoctin-Boes, G., ...Tobias, J.S. (2005). Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet*, 365(9453), 60-62.

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(1), 116–123.

Huggins, C., & Dao, T.L. (1953). Adrenalectomy and oophorectomy in treatment of advanced carcinoma of the breast. *Journal of the American Medical Association*, 151(16), 1388–94.

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.

- Hwang, D., Scollard, D., Byrne, J., & Levine, E. (1998). Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(6), 455-460.
- Hwang, C. C., Umeki, S., Kubo, M., Hayashi, T., Shimoda, H., Mochizuki, M., Maeda, K., Baba, K., Hiraoka, H., Coffey, M., Okuda, M. & Mizuno, T. (2013). Oncolytic reovirus in canine mast cell tumor. *PLoS One*, 8(9). doi: 10.1371/journal.pone.0073555.
- Hynes, N.E., & Lane, H.A. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature Reviews. Cancer*, 5(5), 341-354.
- Ilgase, M., Hwang, C.C., Coffey, M., Okuda, M., Noguchi, S., & Mizuno, T. (2015). The oncolytic effects of reovirus in canine solid tumor cell lines. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 77(5), 541-8. doi: 10.1292/jvms.14-0570.
- Illera, J.C., Pérez- Alenza, M.D., Nieto, A., Jiménez, M.A., Silvan, G., Dunner, S., & Peña, L. (2006). Steroids and receptors in canine mammary cancer. *Steroids*, 71(7), 541–548.
- Im, K.S., Kim, I.H., Kim, N.H., Lim, H.Y., Kim, J.H., & Sur, J.H. (2013). Breed-related differences in altered BRCA1 expression, phenotype and subtype in malignant canine mammary tumors. *Veterinary Journal*, 195(3), 366–372. doi: 10.1016/j.tvjl.2012.07.014
- Im, K.S., Kim, N.H., Lim, H.Y., Kim, H.W., Shin, J.I., & Sur, J.H. (2014). Analysis of a new histological and molecular-based classification of canine mammary neoplasia. *Veterinary Pathology*, 51(3), 549-559. doi: 10.1177/0300985813498780.

- Ishioka, K., Hosoya, K., Kitagawa, H., Shibata, H., Honjoh, T., Kimura, K., & Saito, M. (2007). Plasma leptin concentration in dogs: effects of body condition score, age, gender and breeds. *Research in Veterinary Science*, 82(1), 11–15.
- Jain, R.K. (2005). Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*, 307(5706), 58–62.
- Jardé, T., Caldefie-Chézet, F., Damez, M., Mishellany, F., Penault- Llorca F., guillot, J., & Vasson, M.P. (2008). Leptin and leptin receptor involvement in cancer development: a study on human primary breast carcinoma. *Oncology Reports*. 19(4), 905–911.
- John, D. Bancroft, & Marilyn Gamble. (Eds.). (2008). The hematoxilin and eosin. En *Theory and Practice of Histological Techniques* (pp. 121-135). Elsevier, Philadelphia.
- Johnston, S.D. (1993). Reproductive systems –female – mammary neoplasia. En Slatter D. (ed.), *Textbook of Small Animal Surgery* Vol. II (pp. 2185– 2190). Saunders, Philadelphia,
- Jordan, V.C. (1992). The role of tamoxifen in the treatment and prevention of breast cancer. *Current Problems in Cancer*, 16(3), 134–176.
- Kaae, S., & Johansen, H. (1969). Simple mastectomy plus postoperative irradiation by the method of McWhirter for mammary carcinoma. *Annals of Surgery*, 170(6), 895-99.
- Karayannopoulou, M., Kaldrymidou, E., Constantinidis, T.C., & Dessiris, A. (2001). Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. *Journal*

of Veterinary Medicine. A Physiology, Pathology, *Clinical Medicine*, 48(2), 85–96.

Karayannopoulou, M., Kaldrymidou, E., Constantinidis, T.C., & Dessiris, A. (2005). Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *Journal Comparative Pathology*, 133(4), 246-252.

Kaufmann, J.E., & Vischer, U.M. (2003). Cellular mechanisms of the hemostatic effects of desmopressin (DDAVP). *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1(4), 682–689.

Kealy, J.K., & McAllister, H.M. (2005). The lungs. En *Diagnostic Radiology and Ultrasonography of the Dog and the Cat* (pp. 210–213). Elsevier Saunders, Missouri.

Keegan, B.P., Akerman, B.L., Pequeux, C., & North, W.G. (2006). Provasopressin expression by breast cancer cells: implications for growth and novel treatment strategies. *Breast Cancer research and Treatment*, 95(3), 265–277.

Khalid, S., Hwang, D., Babichev, Y., Kolli, R., Altamentova, S., Koren, S., ...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.

Kim, J.H., Im, K.S., Kim, N.H., Yhee, J.Y., Nho, W.G., Sur, J.H. (2010a). Expression of HER-2 and nuclear localization of HER-3 protein in canine mammary tumors:

- histopathological and immunohistochemical study. *Veterinary Journal*, 189(3), 318-322. doi:10.1016/j.tvjl.2010.08.012.
- Kim, J.H., Yu, C.H., Yhee, J.H., Im, K.S., & Sur, J.H. (2010b). 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.
- Kim, J.H., Chon, S.K., Im, K.S., Kim, N.H. & Sur, J.H. (2013). Correlation of tumor-infiltrating lymphocytes to histopathological features and molecular phenotypes in canine mammary carcinoma: A morphologic and immunohistochemical morphometric study. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 77(2), 142–149.
- Kim, N.H., Lim, H.Y., Im, K.S., Shin, J.I., Kim, H.W., Sur, J.H. (2014). Evaluation of clinicopathological characteristics and oestrogen receptor gene expression in oestrogen receptor-negative, progesterone receptor-positive canine mammary carcinomas. *Journal of Comparative Pathology*, 151(1), 42-50. doi: 10.1016/j.jcpa.2014.04.001.
- King, M.C., Marks, J.H., & Mandell, J.B. (2003). Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science*, 302(5645), 643–646.
- Kitamura, H., Torigoe, T., Asanuma, H., Hisasue, S.I., Suzuki, K., Tsukamoto, T., Satoh, M., & Sato, N. (2006). Cytosolic overexpression of p62 sequestosome 1 in neoplastic prostate tissue. *Histopathology*, 48(2), 157-161.

- Kleer, C.G., van Golen, K.L., & Merajver, S.D. (2000). Molecular biology of breast cancer metastasis. Inflammatory breast cancer: clinical syndrome and molecular determinants. *Breast Cancer Research*, 2(6), 423–429.
- Klijn, J.G., Berns, P.M., Schmitz, P.I., & Foekens, J.A. (1992). The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocrine Reviews*, 13(1), 3-17.
- Klopfleisch, R., Schutze, M., & Gruber, A.D. (2010). Downregulation of transforming growth factor beta (TGF beta) and latent TGF beta binding protein (LTBP)-4 expression in late stage canine mammary tumours. *Veterinary Journal*, 186(3), 379–384.
- Klopfleisch, R., Von Euler, H., Sarli, G., Pinho, S.S., Gartner, F., Gruber, A.D. (2011). Molecular carcinogenesis of canine mammary tumors: news from an old disease. *Veterinary Pathology*, 48 (1), 98–116.
- Knapp, D.W., Richardson, R.C., Chan, T.C., Bottoms, G.D., Widmer, W.R., DeNicola, D.B., ...Kuczek, T. (1994). Piroxicam therapy in 34 dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 8(4), 273–278.
- Knapp, D.W., & Waters, D.J., (1997). Naturally occurring cancer in pet dogs: important models for developing improved cancer therapy for humans. *Molecular Medicine Today*, 3(1), 8-11.
- Knapp, D.W., Glickman, N.W., Widmer, W.R., DeNicola, D.B., Adams, L.G., Kuczek, T., ...Glickman, L.T. (2000). Cisplatin versus cisplatin combined with piroxicam in a

canine model of human invasive urinary bladder cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 46(3), 221–226.

Knapp, D.W., Glickman, N.W., Mohammed, S.I., DeNicola, D.B., Widmer, W.R., Bonney, P.L., & DeGortari, A.E. (2002). Antitumor effects of piroxicam in spontaneous canine invasive urinary bladder cancer, a relevant model of human invasive bladder cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 507, 377–380.

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

Knottenbelt, C., Chambers, G., Gault, E., & Argyle, D.J. (2006). The in vitro effects of piroxicam and meloxicam on canine cell lines. *Journal of Small Animal Practice*, 47(1), 14– 20.

Kristiansen, V.M., Nødtvedt, A., Breen, A.M., Langeland, M., Teige, J., Goldschmidt, M., ...Sørenmo, K. (2013). Effect of ovariohysterectomy at the time of tumor removal in dogs with benign mammary tumors and hyperplastic lesions: a randomized controlled clinical trial. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(4), 935-42.

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.

Kurzman, I.D., & Gilbertson, S.R. (1986). Prognostic factors in canine mammary tumors. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery*, 1(1), 25-32.

- Kwapien, R.P., Giles, R.C., Geil, R.G., & Casey, H.W. (1980). Malignant mammary tumors in beagle dogs dosed with investigational oral contraceptive steroids. *Journal of the National Cancer Institute*, 65(1), 137–144.
- Laflamme, D.P. (2006). Understanding and managing obesity in dogs and cats. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*. 36(6), 1283–1295.
- Lagadic, M., & Estrada, M. (1990). Tumeurs mammaires de la chienne: criteres du pronostic histologique et interet d'un grading. *Recueil de Medicine Veterinaire*, 166(11), 1035-1042.
- Lana, S.E., Rutteman, G.R., Withrow, S.J., (2007). Tumors of the Mammary Gland. En Withrow SJ and MacEwen BR, (Eds.), *Small Animal Clinical Oncology* (pp. 619-636). Missouri, USA: Westline Industrial Drive.
- 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.
- Lavalle, G.E., Bertagnolli, A.C., Tavares, W.L., & Cassali, G.D. (2009). Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. *Veterinary Pathology*, 46(6), 1275–1280.
- Lee, C.H., Kim, W.H., Lim, J.H., Kang, M.S., Kim, D.Y., & Kweon, O.K. (2004). Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Science*, 5(1), 63– 69.

- Lewis, S., Locker, A., Todd, J.H., Bell, J.A., Nicholson, R., Elston, C.W., & Blamey, R.W., Ellis, I.O. (1990). Expression of epidermal growth factor receptor in breast carcinoma. *Journal of Clinical Pathology*, 43(5), 385-89.
- Lim, H.Y., Im, K.S., Kim, N.H., Kim, H.W., Shin, J.I., Yhee, J.Y., & Sur, J.H. (2015). Effects of Obesity and Obesity related Molecules on Canine Mammary Gland Tumors. *Veterinary Pathology*, 16 de Abril. doi: 0300985815579994.
- Liu, N.F., & Zhang, L.R. (1998). Changes of tissue fluid hyaluronam (hyaluronic acid) in peripheral lymphedema. *Lymphology*, 31(4), 173– 179.
- Liu, N.F., & Zhang, L.R. (1998). Changes of tissue fluid hyaluronam (hyaluronic acid) in peripheral lymphedema. *Lymphology*, 31(4), 173– 179.
- Liu, F., Lang, R., Zhao, J., Zhang, X., Pringle, G.A., Fan, Y., ...Fu, L., (2011). CD8+ cytotoxic T cell and FOXP3+ regulatory T cell infiltration in relation to breast cancer survival and molecular phenotypes. *Breast Cancer Research and Treatment*, 130(2), 645–655. doi: 10.1007/s10549-011-1647-3.
- Liu, Y., Tang, W., Wang, J., Xie, L., Li, T., He, Y., ...Qin, X. (2014). Association between statin use and colorectal cancer risk: a meta-analysis of 42 studies. *Cancer Causes & Control*, 25(2), 237–49. doi: 10.1007/s10552-013-0326-6.
- Loar, A.S. (1989). Tumors of the genital tract and mammary gland. En Ettinger SJ (Ed.). *Text Book of veterinary Internal Medicine* Vol. II (pp. 1814- 1925). Philadelphia, WB Saunders.
- Lohr, 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.

London, C.A., Hannah, A.L., Zadovoskaya, R., Chien, M.B., Kollias-Baker, C., Rosenberg, M., ...Shenoy, N. (2003). Phase I doseescalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with spontaneous malignancies. *Clinical Cancer Research*, 9(7), 2755–2768.

London, C.A. (2013). Kinase dysfunction and kinase inhibitors. *Veterinary Dermatology* 24(1), 181–187.

Lopes, J.R., Maschio, L.B., Jardim-Perassi, B.V., Moschetta, M.G., Ferreira, L.C., Martins, G.R., ...De Campos Zuccari, D.A. (2015). Evaluation of melatonin treatment in primary culture of canine mammary tumors. *Oncology Reports*, 33(1), 311-319. doi: 10.3892/or.2014.3596.

Lorincz, A.M., & Sukumar, S. (2006). Molecular links between obesity and breast cancer. *Endocrine- Related Cancer*, 13(2), 279–292.

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.

- MacEwen, E.G., Harvey, H.J., Patnaik, A.K., Mooney, S., Hayes, A., Kurzman, I., & Hardy, W.D. Jr. (1985). Evaluation of effects of levamisole and surgery on canine mammary cancer. *Journal o Biological Response Modifiers*, 4(4), 418–426.
- MacEwen, E.G., Hayes, A.A., Harvey, H.J., Patnaik, A.K., & Mooney, S. (1984). Prognostic factors for feline mammary tumors. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 185(2), 201-204.
- MacEwen, E.G. (1986). Current concepts in cancer therapy: Biologic therapy and chemotherapy. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery*, 1(1), 5–16.
- MacNeill, A. L., Moldenhauer, T., Doty, R. & Mann, T. (2012). Myxoma virus induces apoptosis in cultured feline carcinoma cells. *Research in Veterinary Science*, 93(2), 1036–1038. doi: 10.1016/j.rvsc.2011.10.016.
- MacVean, D.W., Monlux, A.W., Anderson, P.S., Silberg, S.L., & Roszel, J.F. (1978). Frequency of canine and feline tumors in a defined population. *Veterinary Pathology*, 15(6), 700-715.
- Madden, J.L., Kandalaft, S., Bourque, R.A. (1972). Modified radical mastectomy. *Annals of Surgery*, 175(5), 624-634.
- Madewell, B.R., Theilen, G.H. (1987). Tumors of the mammary gland. En: Theilen GH., Madewell BR. (Eds.). *Veterinary cancer medicine* (pp. 327-344). Philadelphia, Lea & Febiger.
- Mainenti, M., Rasotto, R., Carnier, P., & Zappulli, V. (2014). Oestrogen and progesterone receptor expression in subtypes of canine mammary tumours in intact and

ovariectomised dogs. *Veterinary Journal*, 202(1), 62-68. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.06.003.

Mammary tumors – Canine. Veterinary Society of Surgical Oncology. Disponible en: <http://www.vssso.org/index.php/education-new/cancer-information-new/cancer-in-dogs-by-tumor-type-new/9-education/347-mammary-tumors-canine>.

Mannucci, P.M. (1997). Desmopressin (DDAVP) in the treatment of bleeding disorders: the first 20 years. *Blood*, 90(7), 2515–2521.

Mannucci, P.M., & Ghirardini, A. (1997). Desmopressin: twenty years after. *Thrombosis and Haemostasis*, 78(2), 958.

Marchetti, V., Giorgi, M., Fioravanti, A., Finotello, R., Citi, S., Canu, B., ...Bocci, G. (2012). First-line metronomic chemotherapy in a metastatic model of spontaneous canine tumours: a pilot study. *Investigational New Drugs*, 30(4), 1725-1730.

Marconato, L., Lorenzo, R.M., Abramo, F., Ratto, A., & Zini, E. (2008). Adjuvant gemcitabine after surgical removal of aggressive malignant mammary tumours in dogs. *Veterinary Comparative Oncology*, 6(2), 90–101. doi: 10.1111/j.1476-5829.2007.00143.x.

Marconato, L., Romanelli, G., Stefanello, D., Giacoboni, C., Bonfanti, U., Bettini, G.,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. doi: 10.2460/javma.235.8.967.

- Marconato, L., Buracco, P., & Aresu, L. (2015). Perspectives on the design of clinical trials for targeted therapies and immunotherapy in veterinary oncology. *Veterinary Journal*, 205(2), 238-243. doi:10.1016/j.tvjl.2015.02.020.
- 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., 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.
- Martín de las Mulas, J.M., Millan, Y. & Dios, R. (2005). A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Veterinary Pathology*, 42(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), 13-17.
- Martins, A.M.C., Tamaso, E., & Guerra, J.L. (2002). Retrospective review and systematic study of mammary tumors in dogs and characteristics of the extracellular matrix. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 39(1), 38–42.

- Masood, S. (2005). Prognostic/predictive factors in breast cancer. *Clinics in Laboratory Medicine*, 25(4), 809-825. doi: 10.1016/j.cll.2005.08.012.
- 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. *The Veterinary Record*, 158(18), 626–630.
- Mauri, D., Pavlidis, N., Polyzos, N.P., & Ioannidis, J.P.A. (2006). Survival with aromatase inhibitors and inactivators versus standard hormonal therapy in advanced breast cancer: meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute*, 98(18), 1285-1291.
- Mehta, R.S., Barlow, W.E., Albain, K.S., Vanderberg, T.A., Dakhil, S.R., Tirumali, M.R., ...Hortobagyi, G.N. (2012). Combination anastrozole and fulvestrant in metastatic breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 367(5), 435-444.
- Merlo, D.F., Rossi, L., Pellegrino, C., Ceppi, M., Cardellino, U., Capurro, C., ...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.
- Miki, Y., Suzuki, T., Tazawa, C., Yamaguchi, Y., Kitada, K., Honma, S., ...Sasano, H. (2007). Aromatase localization in human breast cancer tissues: possible interactions between intratumoral stromal and parenchymal cells. *Cancer Research*, 67(8), 3945–3954.
- 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.

Millanta, F., Citi, S., Della Santa, D., Porciani, M., & Poli, A. (2006a). COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Breast Cancer Research and Treatment*, 98(1), 115–120.

Millanta, F., Silvestri, G., Vaselli, C., Citi, S., Pisani, G., Lorenzi, D., & Poli, A. (2006b). The role of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk-1/KDR in promoting tumour angiogenesis in feline and canine mammary carcinomas: a preliminary study of autocrine and paracrine loops. *Research in Veterinary Science*, 81(3), 350–357.

Millanta, F., Caneschi, V., Ressel, L., citi, S., & Poli, A. (2010). Expression of vascular endothelial growth factor in canine inflammatory and noninflammatory mammary carcinoma. *Journal of Comparative Pathology*, 142(1), 36–42. doi: 10.1016/j.jcpa.2009.06.004.

Miller, M.E., Christensen, G.C., Evans, H.E. (1964). The mammary gland. En, *Anatomy of the Dog* (pp. 789–803). Philadelphia: W.B. Saunders.

Misdorp, W., & Hart, A.A. (1976). Prognostic Factors in canine mammary cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 56(4), 779-786.

Misdorp, W., & Hart, A.A. (1979). Canine mammary cancer. I. Prognosis. *Journal of Small Animal Practice*, 20(7), 385-394.

- Misdorp, W. (1988). Canine mammary gland tumors: Protective effect of late ovariectomy and stimulating effect of progestins. *The Veterinary Quarterly*, 10(1), 26–33.
- Misdorp, W., Else, R.W, Hellmén, E., & Lipscomb, E. (1999). Definitions and explanatory notes. Who Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat. *Washington: Armed Forces Institute of Pathology*, 18-27.
- Misdorp W., (2002). Tumors of the mammary gland. En DJ M. (Ed.), *Tumors in Domestic Animals* (pp. 575-606). State: University of California.
- Mitchell, L., de la Iglesia, F.A., Wenkoff, M.S., Van Dreumel, A.A., & Lumb, G. (1974). Mammary tumors in dogs: survey of clinical and pathological characteristics. *The Canadian Veterinary Journal*, 15(5), 131–138.
- Miyoshi, Y., Funahashi, T., Tanaka, S., Taguchi, T., Tamaki, Y., Shimomura, I., & Noguchi, S. (2006). High expression of leptin receptor mRNA in breast cancer tissue predicts poor prognosis for patients with high, but not low, serum leptin levels. *International Journal of Cancer*. 118(6), 1414–1419.
- Moe, L. (2001). Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. *Journal of Reproduction and Fertility. Suplemento*, 57, 439–443.
- Mohamed, R.A.A., Martin, D.G., Mahmmoud, A.M., Macmillan, R.D., Green, A.R., Paish, E.C., & Ellis, I.O. (2011). Objective assessment of lymphatic and blood vascular invasion in Lymph node-negative breast carcinoma: Findings from a large case series with long- term follow-up. *Journal of pathology*, 223(3), 358-365. doi: 10.1002/path.2810.

- Mohammed, S.I., Craig, B.A., Mutsaers, A.J., Glickman, N.W., Snyder, P.W., deGortari, A.E., ...Knapp, D.W. (2003). Effects of the cyclooxygenase inhibitor, piroxicam, in combination with chemotherapy on tumor response, apoptosis, and angiogenesis in a canine model of human invasive urinary bladder cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2(2), 183–188.
- Mol, J.A., van Garderen, E., Rutteman, G.R., & Rijnberk, A. (1996). New insights in the molecular mechanism of progestin induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary glands of dogs, cats and humans. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 57(1-2), 67–71.
- Monlux, A.W., Roszel, J.F., MacVean, D.W., & Palmer, T.W. (1977). Classification of epithelial mammary tumors in a defined population. *Veterinary Pathology*, 14(3), 194- 217.
- Monteiro-Riviere, N.A. (2006). Integument. En Dellmann's. Eurell, J., Frappier, B.L., (Eds.), *Textbook of Veterinary Histology* (pp. 320-349). Ames, Iowa: Blackwell Publishing,
- Morris, J.S., Dobson, J.M., & Bostock, D.E. (1993). Use of tamoxifen in the control of canine mammary neoplasia. *The Veterinary Record*, 133(22), 539– 542.
- Morris, J.S., Dobson, J.M., Bostock, D.E., & O'Farrell, E. (1998). Effect of ovariectomy in bitches with mammary neoplasms. *The 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, ER alpha and p53. *Veterinary Journal*, 179(3), 422–429. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.10.025.
- Moschetta, M.G., Maschio, L.B., Jardim-Perassi, B.V., Gelaleti, G.B., Lopes, J.R., Leonel, C., ... Zuccari, D.A. (2015). Prognostic value of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor 1 α in canine malignant mammary tumors. *Oncology Reports*, 33(5), 2345-53. doi: 10.3892/or.2015.3856.
- Moulton, J.E., Taylor, D.O., Dorn, C.R., & Andersen, A.C. (1970). Canine mammary tumors. *Pathologia Veterinaria*, 7(4), 289–320.
- Moulton, J.E., Rosenblatt, L.S., & Goldman, M. (1986). Mammary tumors in a colony of beagle dogs. *Veterinary Pathology*, 23(6), 741–749.
- Moulton, J.E. (1990). Tumors of the mammary gland. En JE Moulton (ed.), *Tumours in Domestic Animals* (pp. 518-552). Berkeley: University of California Press.
- 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), 265-274. doi: 10.1177/0300985809358603.
- Mylona, E., Alexandrou, P., Giannopoulou, I., Liapis, G., Sofia, M., Keramopoulos, A., & Nakopoulou, L. (2007). The prognostic value of vascular endothelial growth factors (VEGFs)-A and -B and their receptor, VEGFR-1, in invasive breast carcinoma. *Gynecologic Oncology*, 104(3), 557–563.

- Nardi, A.B., Rodaski, S., Souza, R.S., Costa, T.A., Macedo, T.R., Rodigheri, S.M., Rios, A. & Piekarz, C.H. (2002) Prevalência de Neoplasias e Modalidades de Tratamentos em Cães Atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. *Archives of Veterinay Science*, 7, 15-26.
- Nemanic, S., London, C.A., & Wisner, E.R. (2006). Comparison of thoracic radiographs and single breath-hold helical CT for detection of pulmonary nodules in dogs with metastatic neoplasia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(3), 508–515.
- Nguyen, S.M., Thamm, D.H., Vail, D.M., & London, C.A. (2013). Response evaluation criteria for solid tumours in dogs (v1.0): A Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) consensus document. *Veterinary and Comparative Oncology*, 13(3), 176-183. doi: 10.1111/vco.12032.
- Nickel, R., Schummer, A., & Seiferle, E. (1981). The anatomy of domestic animals. En, *The Lymphatic System* (pp. 543-562). Berlin: Verlag Paul Parey.
- 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.
- Nieto, Y., Woods, J., Nawaz, F., Baron, A., Jones, R.B., Shpall, E.J., & Nawaz, S. (2007). Prognostic analysis of tumour angiogenesis, determined by microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor, in high-risk primary breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy. *British Journal of Cancer*, 97(3), 391–397.

- Nimwegen van, S., Kirpensteijn, J. (2012). Specific disorders. En *Veterinary Surgery Small Animal*. Tobias KM, Johnston SA, St Louis Elsevier.
- Novosad, C.A. (2003). Principles of treatment for mammary gland tumors. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 18(2), 107-109.
- Nowak, M., Madej, J.P., Rossowska, J., Madej, J.A. (2007). Involvement of CD8+ cells in protective mechanisms in canine mammary adenocarcinomas. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 51(3), 445–448.
- 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.
- Ochiai, K., Ishiguro-Oonuma, T., Yoshikawa, Y., Udagawa, C., Kato, Y., Watanabe, M., ...Omi, T. (2015). Polymorphisms of canine BRCA2 BRC repeats affecting interaction with RAD51. *Biomedical Research*, 36(2), 155–158. doi: 10.2220/biomedres.36.155.
- Oliveira L.O., Oliveira R.T., Loretto A.P., Rodrigues R. & Driemeier D. (2003). Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. *Acta Scientiae Veterinariae*, 31(2),105-110.
- Olofsson, B., Jeltsch, M., Eriksson, U., & Alitalo, K. (1999). Current biology of VEGF-B and VEGF-C. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(6), 528– 535.
- Ortega García, M.V., Galán Torres, J.A., Millán Ruiz, Y., Sánchez-Céspedes, R., & Martín de las Mulas, J. (2013). Clasificación en subtipos moleculares de tumores

de mama de pequeños animales mediante métodos inmunohistoquímicos. *Sanidad militar*, 69(1), 6.

Otoni, C.C., Rahal, S.C., Vulcano, L.C., Ribeiro, S.M., Hette, K., Giordano, T., Doiche, D.P., & Amorim, R.L. (2010). Survey radiography and computerized tomography imaging of the thorax in female dogs with mammary tumors. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52, 20. doi: 10.1186/1751-0147-52-20.

Owens, L.N. (1980). *The TNM Classification of Tumors in Domestic Animals*, 1st ed. (pp20-80). World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Pagani, O., Regan, M.M., Walley, B.A., Fleming, G.F., Colleoni, M., Láng, I., ...Francis, P.A. (2014). Adjuvant exemestane with ovarian suppression in premenopausal breast cancer. *The New England Journal of Medicine* 371(2), 107-118.

Papazoglou, L.G., Tsioli, V., Karayannopoulou, M., Savvas, I., Kazakos, G., & Kaldrymidou, E. (2006). Comparison of three methods for closure of mastectomy incisions in dogs. *Australian Veterinary Practitioner*, 36(4), 156-162.

Parodi, A.L., Misdorp, W., Mialot, J.P., Mialot, M., Hart, A.A., Hurtrel, M., & Salomon, J.C. (1983). Intratumoral BCG and Corynebacterium Parvum therapy of canine mammary tumors before radical mastectomy. *Cancer Immunology and Immunotherapy*, 15(3), 172–177.

Patey, D.H., & Dyson, W.H. (1948). The prognosis of carcinoma of the breast in relation to the type of the mastectomy performed. *British Journal of Cancer*, 2(1), 7-13.

- Patil, S.S., Gentschev, I., Nolte, I., Ogilvie, G., & Szalay, A.A. (2012). Oncolytic virotherapy in veterinary medicine: Current status and future prospects for canine patients. *Journal of Translational Medicine*, 10. doi: 10.1186/1479-5876-10-3.
- Patsikas, M.N., & Dessiris, A., (1996a). 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(2), 131–138.
- Patsikas, M.N., Karayannopoulou, M., Kaldrymidoy, E., Papazoglou, L.G., Papadopoulou, P.L., Tzegas, S.I., ...Dessiris, A.K. (2006). The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: a lymphographic study. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 35(4), 228–234.
- Patsikas, M.N., & Dessiris, A. (1996b). The lymph drainage of the mammary glands in the Bitch: a lymphographic study. Part II: the 3rd mammary gland. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 25(2), 139–143.
- Payne, S.J., Bowen, R.L., Jones, J.L., & Wells, C.A. (2008). Predictive markers in breast cancer- the present. *Histopathology*, 52(1), 82–90. doi: 10.1111/j.1365-2559.2007.02897.x.
- Peleteiro, M.C. (1994). Tumores mamários na cadela e na gata. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 89(509), 10-29.
- Peña, L.L., Nieto, A.I., Pérez-Alenza, D., Cuesta, P., & Castaño, M. (1998). Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumours: relationship to clinical and pathologic variables. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10(3), 237-246.

- Peña, L., Pérez-Alenza, M.D., Rodríguez-Bertos, A., & Nieto, A. (2003a). Canine inflammatory mammary carcinoma: histopathology, immunohistochemistry and clinical implications of 21 cases. *Breast Cancer Research and Treatment*, 78(2), 141–148.
- Peña, L., Silván, G., Pérez-Alenza, M.D., Nieto, A., & Illera, J.C. (2003b). Steroid hormone profile of canine inflammatory mammary carcinoma: a preliminary study. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 84(2-3), 211-216.
- Peña, L., Gama, A., Goldschmidt, M.H., Abadie, J., Benazzi, C., Castagnaro, M., ...de las Mulas, J.M. (2014). Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, 51(1), 127–145. doi: 10.1177/0300985813509388.
- Pereira, C.T., Luiz Navarro Marquez, F., Williams, J., Wladimir De Martin, B., & Primo Bombonato, P. (1998). 99mTclabeled dextran for mammary lymphoscintigraphy in dogs. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 49(5), 487–491.
- 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(5), 282– 290.
- Pérez Alenza, M.D., Rutteman, G.R., Knipers-Dijkshoorn, N.J., Peña, L., Montoya, A., Misdorp, W., & Cornelisse, C.J. (1995). DNA flow cytometry in canine mammary tumors: the relationship of DNA ploidy and S-phase fraction to clinical and histological features. *Research in Veterinary Science* 58(3), 238-243.

- Pérez Alenza, M.D., Peña, L., Nieto, A.I., & Castaño, M. (1997). Clinical and pathological prognostic factors in canine mammary tumors. *Annali dell' Istituto Superiore di Sanità*, 33(4), 581-585
- Pérez Alenza, D., Rutteman, G.R., Peña, L., Beynen, A.C., & Cuesta, P. (1998). Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 12(3), 132–139.
- Pérez Alenza, M.D., Peña, L., del Castillo, N., & Nieto, L. (2000). Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *Journal of Small Animal Practice*, 41(7), 287-291.
- Pérez Alenza, M.D., Tabanera, E., & Peña, L., (2001). Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995–1999). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 219(8), 1110–1114.
- 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. A Physiology, Pathology, Clinical Medicine*, 52(2), 61-66.
- Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., ...Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747-752.

- Philibert, J.C., Snyder, P.W., Glickman, N., Glickman, L., Knapp, D., & Waters, D. (2003). Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17(1), 102–106.
- Poirier, V.J., Hershey, A.E., Burgess, K.E., Phillips, B., Turek, M.M., Forrest, L.J., Beaver, L., & Vail, D.M. (2004). Efficacy and toxicity of paclitaxel (Taxol) for the treatment of canine malignant tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18(2), 219–222.
- Polton, G. (2009). Mammary tumours in dogs. *Irish Veterinary Journal*, 62(1), 50–56.
- Prescott, S.M., & Fitzpatrick, F.A. (2000). Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1470(2), M69–M78.
- 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(6), 1333–1344.
- Queiroga, F., Alves, A., Pires, I., Seixas, F., Pires, M., & Lopes, C. (2001, Septiembre). The prognostic value of angiogenesis and proliferative index in canine mammary tumours. Proceedings 19th Meeting ESVP Thessaloniki, Grecia.
- Queiroga, F.L., Pérez- Alenza, M.D., Silvan, G., Peña, L., Lopes, C., & Illera, J.C. (2005). Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 94(1-3), 181–187.
- Queiroga, F.L., Alves, A., Pires, I., & Lopes, C. (2007). Expression of Cox-1 and Cox-2 in canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 136(2-3), 177–185.

- 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, 17betaestradiol) in canine mammary tumours. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 110(1-2), 76– 82.
- Queiroga, F.L., Pires, I., Lobo, L., & Lopes, C.S. (2010). The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. *Research in Veterinary Science*, 88(3), 441–445. doi: 10.1016/j.rvsc.2009.10.009.
- Queiroga, F.L., Pires, I., Parente, M., Gregorio, H., & Lopes, C.S. (2011). COX-2 over-expression correlates with VEGF and tumour angiogenesis in canine mammary cancer. *Veterinary Journal*, 189(1), 77- 82.
- Rassnick KM, 2005. How I treat canine mammary gland tumors. The North American Veterinary Conference. Orlando, Florida.
- 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(3), 233–245.
- Ressel, L., Puleio, R., Loria, G.R., Vannozzi, I., Millanta, F., caracappa, S., & Poli, A. (2013). HER-2 expression in canine morphologically normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissues and its correlation with the clinical outcome. *Research in Veterinary Science*, 94(2), 299–305. doi: 10.1016/j.rvsc.2012.09.016.

- Restucci, B., Papparella, S., Maiolino, P., & De Vico, G., 2002. Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 39(4), 488–493.
- Révillion, F., Bonnetterre, J., & Peyrat, J.P. (1998). ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *European Journal of Cancer*, 34(6), 791–808.
- Rezaie, A., Tavasoli, A., Bahonar, A. (2009). Grading in canine mammary gland carcinoma. *Journal of Biological Science*. 9(4), 333–338.
- Richards, H.G., McNeil, P.E., Thompson, H., & Reid, S.W. (2001). An epidemiological analysis of a canine-biopsies database compiled by a diagnostic histopathology service. *Preventive Veterinary Medicine*, 51(1-2), 125– 136.
- Ripoll, G.V., Giron, S., Krzymuski, M.J., Hermo, G.A., Gomez, D.E., & Alonso, D.F. (2008). Antitumor effects of desmopressin in combination with chemotherapeutic agents in a mouse model of breast cancer. *Anticancer Research*, 28(5A), 2607–2611.
- Ripoll, G.V., Garona, J., Pifano, M., Farina, H.G., Gomez, D.E., & Alonso, D.F. (2013). Reduction of tumor angiogenesis induced by desmopressin in a breast cancer model. *Breast Cancer Research and Treatment*, 142(1) 9–18.
- Rismanchi, S., Muhammadnejad, S., Amanpour, S., & Muhammadnejad, A. (2015). First pathological study of canine primary breast lymphoma and the description of its clinicopathological characteristics as an animal model for human primary breast lymphoma. *Biomedical Reports*, 3(1), 75-77.

- Ristimäki, A., Sivula, A., Lundin, J., Lundin, M., Salminen, T., Haglund, C., Joensuu, H., & Isola, J. (2002). Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Research*, 62(3), 632-635.
- Rivera, P., Melin, M., Biagi, T., Fall, T., Haggstrom, J., Lindblad-Toh, K., & von Euler, H. (2009). Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. *Cancer Research*, 69(22), 8770–8774. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1725.
- Rolland, P., Madjd, Z., Durrant, L., Ellis, I.O., Layfield, R. & Spendlove, I. (2007). The ubiquitin-binding protein p62 is expressed in breast cancers showing features of aggressive disease. *Endocrine- Related Cancer*, 14(1), 73-80.
- Romagnoli, S. (2005). Mammary gland tumors. En, Reproduction in companion, exotic and laboratory animals. ESAVS-EVSSAR Course, chapter 18, 1–12,
- Rosai, J (1996). Breast. En Rosai, J. (Ed.), *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology* (pp. 1565-1568). St. Louis: Mosby.
- Ruberte, J., Sautet, J.Y., Gine, J.M., Lopez, C., & Rodriguez, A. (1990). Tophographie des Collecteurs Lymphatiques Mammaires de la chienne. *Anatomía, Histología Embryologia*, 19(4), 347–358.
- Rungsipipat, A., Tateyama, S., Yamaguchi, R., Uchida, K., Miyoshi, N., Hayashi, T. (1999). Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB-2 oncogene products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 61(1), 27–32.

- Rutteman, G.R., Misdorp, W., Blankenstein, M.A., & van den Brom, W.E. (1988). Oestrogen (ER) and progestin receptors (PR) in mammary tissue of the female dog: different receptor profile in non-malignant and malignant states. *British Journal of Cancer*, 58(5), 594–599.
- Rutteman, G.R. (1990). Hormones and mammary tumour disease in the female dog: an update. *In Vivo* 4(1), 33–40.
- Rutteman, G.R., Withrow, S.J., & MacEwen E.G. (2001). Tumors of the mammary gland. En: SJ Withrow and BR MacEwen (Ed.), *Small Animal Clinical Oncology* (pp-455-477). WB Saunders Company, Philadelphia.
- Rutteman, 2005; BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology.
- Saba, C.F., Rogers, K.S., Newman, S.J., Mauldin, G.E., & Vail, D.M. (2007). Mammary gland tumours in male dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(5), 1056-1059.
- Saeki, K., Endo, Y., Uchida, K., Nishimura, R., Sasaki, N., & Nakagawa, T. (2012). Significance of tumour-infiltrating immune cells in spontaneous canine mammary gland tumour: 140 cases. *Journal of Veterinary Medical Science*, 74(2), 227–230.
- Saito, T., Tamura, D., & Asano, R. (2014). Usefulness of selective COX- 2 inhibitors as therapeutic agents against canine mammary tumors. *Oncology Reports*, 31(4), 1637-44. doi: 10.3892/or.2014.3010.
- Sánchez-Cespedes, 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(1), 25–30. doi: 10.1016/j.jcpa.2010.11.006.
- Sandoval, J. (2003). Glándula mamaria o mama: Generalidades y desarrollo embriológico. En J. Sandoval (Ed.), *Tratado de Anatomía Veterinaria*, Tomo IV (pp. 25- 39). Imprenta Sorles, León.
- Santos, A.A., Oliveira, J.T., Lopes, C.C., Amorim, I.F., Vicente, C.M., Gärtner, F.R., Matos, A.J. (2010). Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 143(4), 268-275. doi: 10.1016/j.jcpa.2010.04.006.
- Santos, A.A., Lopes, C.C., Ribeiro, J.R., Martins, L.R., Santos, J.C., Amorim, I.F., Gartner, F., & Matos, A.J. (2013). Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. *BMC Veterinary Research*, 9, 1. doi: 10.1186/1746-6148-9-1.
- Santos, A., Lopes, C., Gärtner, F., & Matos, A.J. (2014). VEGFR-2 expression in malignant tumours of the canine mammary gland: A prospective survival study. *Veterinary and Comparative Oncology*. doi:10.1111/vco.12107.
- Sartin, E.A., Barnes, S., Kwapien, R.P., & Wolfe, L.G. (1992). Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 53(11), 2196- 2200.
- Sassi, F., Benazzi, C., Castellani, G., Salir, G. (2010). Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *BMC Veterinary Research*. doi: 10.1186/1746-6148-6-5.

- Scazziani, 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., & Torlioni, H. (1968). Histological grading. En, *Histological Typing of Breast Tumours*. WHO Bulletin. WHO, Genova.
- Schaefer-Oskens, A.C., Ettinger, S.N., Feldman, E.C. (2005). Estrous cycle and breeding management of the healthy bitch. En: Fathman L (Ed.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine, Vol. II* (pp. 1640–1649). Elsevier Saunders, St-Louis.
- Schafer, K.A., Kelly, G., Schrader, R., Griffith, W.C., Muggenburg, B.A., Tierney, L.A., ...Hahn, F.F. (1998). A canine model of familial mammary gland neoplasia. *Veterinary Pathology*, 35(3), 168–177.
- Schneider, R., Dorn, C.R., & Taylor, D.O. (1969). Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *Journal of the National Cancer Institute*, 43(6), 1249–1261
- Schneider, R. (1970). Comparison of age, sex and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer*, 26(2), 419–426.
- Schwartz, G., Veronesi, U., Clough, K.B., Dixon, J.M., Fentiman, I.S., Heywang-Köbrunner, S.H., ...Solín, L.J. (2006). Proceedings of the Consensus Conference on Breast Conservation, April 28 to May 1, 2005, Milan, Italy. *Cancer*, 107(2), 242-50.

- Selman, P.J., van Garderen, E., Mol, J.A., & van den Ingh, T.S. (1995). Comparison of the histological changes in the dog after treatment with the progestins medroxyprogesterone acetate and proligestone. *The Veterinary Quarterly*, 17(4), 128-33.
- Shien, T., Tashiro, T., Omatsu, M., Masuda, T., Furuta, K., Sato, N., ...Hasegawa, T. (2005). Frequent overexpression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in mammary high grade ductal carcinomas with myoepithelial differentiation. *Journal of Clinical Pathology*, 58(12), 1299-304.
- 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(1), 49–60.
- Silver, I.A. (1966). The anatomy of the mammary gland of the dog and cat. *Journal of Small Animal Practice*, 7(11), 689– 696.
- Simeonov, R., & Simeonova, G. (2006a). Computerized morphometry of mean nuclear diameter and nuclear roundness in canine mammary gland tumors on cytologic smears. *Veterinary Clinical Pathology*, 35(1), 88–90.
- Simeonov, R., & Simeonova, G. (2006b). Fractal dimension of canine mammary gland epithelial tumors on cytologic smears. *Veterinary Clinical Pathology*, 35(4), 446–448.
- Simeonov, R., & Stoikov, D. (2006). Study on the correlation between the cytological and histological tests in the diagnostics of canine spontaneous mammary neoplasms. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 9(3), 211–219.

- Simon, D., Goreonzy, P., Stephan, I., Meyer-Lindenberg, A., Aufderheide, M., & Nolte, I. (1996). Mammary tumours in the dogs Frequency and course. *Praktische Tierarzt*, 77, 771-782.
- Simon, D., Schoenrock, D., Baumgartner, W., & Nolte, I. (2006). Postoperative adjuvant treatment of invasive malignant mammary gland tumors in dogs with doxorubicin and docetaxel. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(5), 1184–1190.
- Simon, D., Schoenrock, D., Nolte, I., Baumgartner, 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. doi: 10.1111/j.1939-165X.2009.00150.x.
- Singh, S., Singh, P.P., Singh. A.G., Murad. M.H., & Sanchez, W. (2013). Statins are associated with a reduced risk of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*, 144(2), 323–32.
- Sisson, S., Grossman, J.D. (2007). Mama. En Getty, R. (Ed.), *Anatomía de los animales domésticos* (pp.). Philadelphia, London, Toronto: W.B. Saunders Co.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., & McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235(4785), 177–182.
- Slattery, M.L., Potter, J., Caan, B., Edwards, S., Coates, A., Ma, K.N., Berry, T.D. (1997). Energy balance and colon cancer—beyond physical activity. *Cancer Research*, 57(1), 75–80.

- Smith, I.E., & Dowsett, M. (2003). Aromatase inhibitors in breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 348(24), 2431–2442.
- Smith, I.E., Dowsett, M., Ebbs, S.R., Dixon, J.M., Skene, A., Blohmer, J.U., ...Boeddinghaus, I. (2005). Neoadjuvant treatment of postmenopausal breast cancer with anastrozole, tamoxifen, or both in combination: the Immediate Preoperative Anastrozole, Tamoxifen, or Combined with Tamoxifen (IMPACT) multicenter double-blind randomized trial. *Journal of Clinical Oncology*, 23(22), 5108-5116.
- Soderlund, K. Skoog, L., Fornander, T., & Askmal, M.S. (2007). The BRCA/BRCA/RAD51 complex is a prognostic and predictive factor in early breast cancer. *Radiotherapy and Oncology*, 84(3), 242-251.
- 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(7), 694– 703.
- Sonzogni-Desautels, K., Knapp, D.W., Sartin, E., & Doré, M. (2011). Effect of cyclooxygenase inhibitors in a xenograft model of canine mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 9(3), 161–171. doi: 10.1111/j.1476-5829.2010.00242.x.
- Soremno, K. (2003). Canine mammary gland tumors. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 33(3), 573–596.
- Soremno, K.U., Kristiansen, V.M., Cofone, M.A., Shofer, F.S., Breen, A.M., Langeland, M., ...Goldschmidt, M.H. (2009). Canine mammary gland tumors; a histological

continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Veterinary Comparative Oncology*, 7(3), 162–172. doi: 10.1111/j.1476-5829.2009.00184.x.

Soremno, 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. doi: 10.1177/0300985810389480.

Soremno, K.U., Shofer, F.S., & Goldschmidt, M.H. (2000). Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. *Journal Veterinary Internal Medicine*, 14(3), 266–270.

Soremno, K.U., Worley, D.R., & Goldschmidt, H. (2013). Tumors of the mammary gland. En: Withrow SJ, Vail DM, Page RL (Ed.), *Small Animal Clinical Oncology* (pp. 538-551). St Louis, Elsevier.

Sørli, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J.S., Nobel, A., ...Botstein, D. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 100(14), 8418-8423.

Souza de M., C.H., 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. *The Canadian Veterinary Journal*, 50(5), 506–510.

- Stewart, K.C., & Lyster, D.M. (1997). Interstitial Lymphoscintigraphy for Lymphatic Mapping in Surgical Practice and Research. *Journal of Investigative Surgery*, 10(5), 249-262.
- 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. *The Journal of Small Animal Practice*, 40(7), 326–331.
- Stone, E.A. (2000). Mammary gland neoplasia. En Birchard, S.J., Sherding, R.G. (Eds.), *Saunders Manual of Small Animal Practice*. (pp. 207-210). Philadelphia: WB Saunders Co.
- Stovring, M., Moe, L., & Glatte, E. (1997). A population-based case-control study of canine mammary tumours and clinical use of medroxyprogesterone acetate. *APMIS. Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 105(8), 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. doi: 10.1111/j.1532-950X.2007.00351.x.
- Stricker, T.P., & Kumar, V. (2010). Neoplasias. En: *Robbins y Cotran, Patología Estructural y Funcional* (pp. 284).Ed: Elsevier Sanders.
- Stuart-Harris, R., & Davis, A. (2010). Optimal adjuvant endocrine therapy for early breast cancer. *Womens Health*, 6(3), 383–398. doi: 10.2217/whe.10.25.

- Szczubiał, M., Kankofer, M., Łopuszyński, W., Dabrowski, R., & Lipko, J. (2004). Oxidative stress parameters in bitches with mammary gland tumours. *Journal of Veterinary Medicine A Physiology, Pathology Clinical Medicine*, 51(7-8), 336-340.
- Tamura, D., Saito, T., Murata, K., Kawashima, M., & Asano, R. (2015). Celecoxib exerts antitumor effects in canine mammary tumor cells via COX-2-independent mechanisms. *International Journal of Oncology*, 46(3), 1393-404. doi: 10.3892/ijo.2015.2820.
- Tavares, W.L., Lavalle, G.E., Figueiredo, M.S., Souza, A.G., Bertagnolli, A.C., Viana, F.A., ...Cassali, G.D. (2010). Evaluation of adverse effects in tamoxifen exposed healthy female dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52, 67. doi: 10.1186/1751-0147-52-67.
- Tavasoly, A., Golshahi, H. Rezaie A, & Farhadi, M. (2013). Classification and grading of canine malignant mammary tumors. *Veterinary Research Forum*. 4(1), 25-30.
- Tavassoli, F.A., & Devilee, P. (2003). Pathology and genetics of tumors of the breast and female genital organs. Lyon: IARC Press.
- 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(8), 2740–2743.
- Terraube, V., Pendu, R., Baruch, D., Gebbink, M.F., Meyer, D., Lenting, P.J., & Denis, C.V. (2006). Increased metastatic potential of tumor cells in von Willebrand factordeficient mice. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4(3), 519–526.

- 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. (2012). Masitinib as a chemosensitizer of canine tumor cell lines: A proof of concept study. *The Veterinary Journal* 191(1), 131–134. doi: 10.1016/j.tvjl.2011.01.001.
- Thompson, H.G., Harris, J.W., Wold, B.J., Lin, F. & Brody, J.P. (2003). P62 overexpression in breast tumors and regulation by prostate-derived Ets factor in breast cancer cells. *Oncogene*, 22(15), 2322-2333.
- Thuróczy, J., Reisvaag, G.J., Perge, E., Tibold, A., Szilágyi, J., & Balogh, L. (2007). Immunohistochemical detection of progesterone and cellular proliferation in canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 137(2-3), 122–129.
- Torres, C.G., Olivares, A., & Stoore, C. (2015). Simvastatin exhibits antiproliferative effects on spheres derived from canine mammary carcinoma cells. *Oncology Reports*, 33(5), 2235-44. doi: 10.3892/or.2015.3850.
- Tsutsui, S., Ohno, S., Murakami, S., Hachitanda, Y., & Oda, S. (2002). Prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGFR) and its relationship to the estrogen receptor status in 1029 patients with breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 71(1), 67-75.

- Tuohy, J.L., Milgram, J., Worley, D.R., & Dernell, W. (2009) A review of sentinel lymph node evaluation and the need for its incorporation into veterinary oncology. *Veterinary Comparative Oncology*, 7(2) 81-91.
- Tymchuk, C.N., Tessler, S.B., & Barnard, R.J. (2000). Changes in sex hormone-binding globulin, insulin, and serum lipids in postmenopausal women on a low-fat, high-fiber diet combined with exercise. *Nutrition and Cancer*, 38(2), 158-62.
- Urbasic, A.S., Hynes, S., Somrak, A., Contakos, S., Rahman, M.M., Liu, J. & MacNeill, A.L. (2012). Oncolysis of canine tumor cells by myxoma virus lacking the *serp2* gene. *American Journal of Veterinary Research*, 73(8), 1252–1261. doi: 10.2460/ajvr.73.8.1252.
- Vail, D.M., & MacEwen, E.G. (2000). Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Investigation*, 18(8), 781–92.
- van Garderen, E., van der Poel, H.J., Swennenhuis, J.F., Wissink, E.H., Rutteman, G.R., Hellmen, E., Mol, J.A., & Schalken, J.A. (1999). Expression and molecular characterization of the growth hormone receptor in canine mammary tissue and mammary tumors. *Endocrinology*, 140(12), 5907–5914.
- Vascellari, M., Baioni, E., Ru, G., Carminato, A., & Mutinelli, F. (2009). Animal tumour registry of two provinces in northern Italy: incidence of spontaneous tumours in dogs and cats. *BMC Veterinary Research*, 5, 39.
- Veikkola, T., Karkkainen, M., Claesson-Welsh, L., & Alitalo, K. (2000). Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Research*, 60(2), 203-12.

- Velculescu, V.E. & El-Deiry, W.S. (1996). Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. *Clinical Chemistry*, 42(6 Pt 1), 858-868.
- Veldhoen, N., Watterson, J., Brash, M., Milner, J. (1999). Identification of tumour-associated and germ line p53 mutations in canine mammary cancer. *British Journal of Cancer*, 81(3), 409-415.
- Venanzi, F., Shifrin, V., Sherman, M.Y., Gabai, V., Kisilev, O., Komissarov, A., ...Schneider, A. (2013). Broad-spectrum anti-tumor and anti-metastatic DNA vaccine based on p62-encoding vector. *Oncotarget*, 4(10), 1829-1835. Ver páginas 874-876 del Manual de publicaciones
- Vermeulen, P.B., van Golen, K.L. & Dirix, L.Y. (2010). Angiogenesis, lymphangiogenesis, growth pattern, and tumor emboli in inflammatory breast cancer: a review of the current knowledge. *Cancer* 116(11), 2748-2754. doi: 10.1002/cncr.25169.
- Veronesi, M.C., Battocchio, M., Rizzi, C., & Sironi, G. (2003). Relationship between dysplastic and neoplastic mammary lesions and pseudopregnancy in the bitch. *Veterinary Research Communications*, 27, 245–247.
- Veugelers, P.J., Porter, G.A., Guernsey, D.L. & Casson, A.G. (2006). Obesity and lifestyle risk factors for gastroesophageal reflux disease, Barrett esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Diseases of the Esophagus*. 19(5), 321–328.
- Wakui, S., Muto, T., Yokoo, K., Yokoo, R., Takahashi, H., Masaoka, T., Hano, H. & Furusato, M. (2001). Prognostic status of p53 gene mutation in canine mammary carcinoma. *Anticancer Research*, 21(1B), 611-616.

- Walker, R.A., Dearing, S.J., & Brown, L.A. (1999). Comparison of pathological and biological features of symptomatic and mammographically detected ductal carcinoma in situ of the breast. *Human Pathology*, 30(8), 943-8.
- 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. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 71(11), 1413-7.
- Wauters, M., Considine, R.V., Van Gaal, L.F. (2000). Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *European Journal of Endocrinology*, 143(3), 293–311.
- Webster, J.D., Dennis, M.M., Dervisis, N., Heller, J., Bacon, N.J., Bergman, P.J., ...Kiupel, M. (2011). Recommended guidelines for the conduct and evaluation of prognostic studies in veterinary oncology. *Veterinary Pathology*, 48(1), 7-18. doi: 10.1177/0300985810377187.
- Weinberg, R.S., Grecco, M.O., Ferro, G.S., Seigelshifer, D.J., Perroni, N.V., Terrier, F.J., ...Alonso, D.F. (2015). A phase II dose escalation trial of perioperative desmopressin (1-desamino-8-d-arginine vasopressin) in breast cancer patients. *Springerplus*. 19(4), 428. doi: 10.1186/s40064-015-1217-y.
- Welle, M.M., Bley, C.R., Howard, J., & Rüfenacht, S. (2008). Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. *Veterinary Dermatology*, 19(6), 321–339.

- 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.
- Williams, C.S., Mann, M., & DuBois, R.N. (1999). The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene*, 18(55), 7908–7916.
- Withrow, S.J. (1975). Symposium on surgical techniques in small animal practice. Surgical management of canine mammary tumors. *The Veterinary clinics of North America*, 5(3), 495-506.
- Wolff, A.C., Hammond, M.E., Schwartz, J.N., Hagerty, K.L., Allred, D.C., Cote, R.J., ...Hayes, D.F. (2007). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 131(1), 18-43.
- Wu, A.H., Stram, D.O., & Pike, M.C., (1999). Meta-analysis: dietary fat intake, serum estrogen levels, and the risk of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(17), 529–534.
- Yager, J.D., & Davidson, N.E. (2006). Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *The New England Journal of Medicine*. 354(3), 270–282.
- Yamada, Y., Sato, R., Kobayashi, S., Hankanga, C., Inanami, O., Kuwabara, M., ...Yasuda, J. (2008). The antiproliferative effect of bovine lactoferrin on canine

mammary gland tumor cells. *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. *The Journal of Small Animal Practice*, 37(10), 462-464.

Yamagami, T., Kobayashi, T., Takahashi, K., & Sugiyama, M. (1996b). Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 58(11), 1079-1083.

Yamashita, H., Yando, Y., Nishio, M., Zhang, Z., Hamaguchi, M., Mita, K.,Iwase, H. (2006). Immunohistochemical evaluation of hormone receptor status for predicting response to endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Breast Cancer*, 13(1), 74–83.

Yamauchi, H., Stearns, V., & Hayes, D.F. (2001). When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 19(8), 2334–2356.

Yang, W.Y., Liu, C.H., Chang, C.J., Lee, C.C., Chang, K.J., & Lin, C.T. (2006). Proliferative activity, apoptosis and expression of oestrogen receptor and Bcl-2 oncoprotein in canine mammary gland tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 134(1), 70–79.

Yee, D., & Lee, A.V. (2000). Crosstalk between the insulin-like growth factors and estrogens in breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 5(1), 107–115.

- Yoshikawa, Y., Morimatsu, M., Ochiai, K., Ishiguro-Oonuma, T., Wada, S., Orino, K., & Watanabe, K. (2015). Reduced canine BRCA2 expression levels in mammary gland tumors. *BMC Veterinary Research*, 11, 159. doi: 10.1186/s12917-015-0483-9.
- Yoshikawa, Y., Ochiai, K., Morimatsu, M., Suzuki, Y., Wada, S., Taoda, T., ...Watanabe, K. (2012). Effects of the missense mutations in canine BRCA2 on BRC repeat 3 functions and comparative analyses between canine and human BRC repeat 3. *PLoS One*, 7(10):e45833. doi: 10.1371/journal.pone.0045833.
- Zatloukal, L., Lorenzova, J., Tichy, F., Necas, A. Kecova, H. & Kohout, P. (2005). Breed and age as risk factor for canine mammary tumors. *Acta Veterinaria Brunensis*, 74, 103-09.
- Zoran, D.L. (2010). Obesity in dogs and cats: a metabolic and endocrine disorder. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*. 40(2), 221–239.

