



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

**Trabajo Final Integrador para acceder al título de
Especialista en Clínica Médica de Perros y Gatos**

**DETERMINACIÓN DE LA SOBREVIDA EN PERRAS CON
NEOPLASIAS MAMARIAS SOMETIDAS A MASTECTOMÍA**

MV. Marina Caffaratti

DIRECTORA: MV. Esp. Dra. Griselda González

CO-DIRECTOR: MV. MSc. Guillermo Bagnis

-Río Cuarto, 2019-

Dedicado a Pia

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO.....	3
Anatomía y desarrollo de la glándula mamaria.....	3
Histología de la glándula mamaria.....	4
Incidencia de las neoplasias mamarias.....	5
Etiopatogenia.....	6
Signos clínicos	8
Diagnóstico	9
Tratamiento	12
Pronóstico.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Estudio retrospectivo.....	20
Animales:	20
Examen clínico y pruebas complementarias:	21
Obtención de muestras:	21
Histopatología:	21
Seguimiento de los animales:.....	22
Estudio prospectivo.....	22
Análisis estadístico:.....	23
RESULTADOS.....	23
Aspectos clínicos.....	23
Aspectos histopatológicos.....	24
Seguimiento clínico.....	28
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	35
REFERENCIA BIBLOGRÁFICA.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema del drenaje linfático de las glándulas mamarias normales en la perra.	4
2	Corte histológico de glándula mamaria normal activa (a) e inactiva (b) a 100x.	5
3	Mastectomía realizada en una perra con adenoma mixto (izquierda); toma de muestra de dicha masa tumoral para su estudio histopatológico (derecha).	22
4	Dos de las perras (izquierda, Dogo Argentino; derecha mestiza) que fueron atendidas por presentar masas compatibles con neoplasias mamarias.	23
5	Distribución de las NMC malignas de acuerdo al estadio clínico TNM.	24
6	Distribución de las NMC benignas de acuerdo al diagnóstico histopatológico.	25
7	Distribución de las NMC malignas según el tipo histopatológico.	25
8	Distribución de las NMC malignas de acuerdo al diagnóstico histopatológico.	26
9	Distribución de las NMC malignas según el grado histológico de malignidad.	26
10	a, Carcinoma simple tubular grado 2 (100x); b, Carcinoma simple tubulopapilar grado 3 (100x); c, Carcinoma simple cistopapilar grado 2 (40x); d, Carcinoma tipo mixto grado 1 (100x); e, Carcinoma sólido grado 3 (400x); f, Comedocarcinoma grado 3 (100x).	27
11	Radiografías de control en perra diagnosticada con carcinoma tubulopapilar grado 2, 15 meses posteriores a la mastectomía. a, proyección latero-lateral derecha; b, proyección latero-lateral izquierda; c, proyección ventrodorsal. No se observan signos radiológicos de metástasis.	28
12	Curva de supervivencia de Kaplan-Meier de las 11 perras con NMC malignas luego de 2 años de seguimiento. SLE de acuerdo al tipo histológico.	30

13	Curva de sobrevivencia de Kaplan-Meier de las 11 perras con NMC malignas luego de 2 años de seguimiento. SG de acuerdo al tipo histológico.	30
14	Curva de sobrevivencia de Kaplan-Meier de las 11 perras con NMC malignas luego de 2 años de seguimiento. SLE y grado histológico de malignidad.	31
15	Curva de sobrevivencia de Kaplan-Meier de las 11 perras con NMC malignas luego de 2 años de seguimiento. SG según el grado histológico de malignidad.	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Tamaño tumoral en cm, estadio clínico TNM, diagnóstico histopatológico, grado histológico de malignidad, cantidad de días de sobrevida libre de enfermedad (SLE) y sobrevida general (SG) de cada caso de NMC malignas.	29

RESUMEN

Las neoplasias mamarias caninas (NMC) son un motivo de consulta muy frecuente en la clínica veterinaria de pequeños animales. La tasa de incidencia de esta enfermedad es elevada y su tratamiento de elección es la mastectomía. Establecer el pronóstico de esta patología es uno de los aspectos fundamentales de la práctica médica y resulta de mucho interés para los propietarios. Existen un gran número de factores predictivos, tanto clínicos como histopatológicos, variables que son necesarias para establecer un pronóstico. El objetivo del presente trabajo fue determinar la sobrevida libre de enfermedad (SLE) y la sobrevida general (SG) de las perras sometidas a mastectomía como único tratamiento de las NMC. Además, se caracterizaron histológicamente los tumores mamarios y se definió el grado de malignidad tumoral para evaluar si existió relación con la SLE y la SG. Fueron incluidas 22 perras que presentaron masas firmes y nodulares compatibles con neoplasias mamarias en estadio I, II, III y IV. Dichas lesiones fueron extraídas quirúrgicamente y se diagnosticó el tipo histológico de acuerdo a la clasificación propuesta en el año 2011 de neoplasias mamarias caninas. Se realizó el seguimiento de las perras durante 24 meses, con controles trimestrales mediante examen físico, ecografía abdominal y radiografía de tórax en búsqueda de recidiva local o metástasis distantes. Se analizaron estadísticamente los resultados y se determinó que el 50% (11) de los tumores fueron benignos y 50% (11) malignos. En el caso de las masas benignas, se diagnosticaron las siguientes: 36,4% (4) adenomas simples, 36,4% (4) adenomas mixtos, 18,2% (2) adenoma papilar intraductal y 9% (1) adenoma papilar. Las neoplasias malignas se calificaron histológicamente como: 45,3% (5) carcinomas simple; 18,2% (2) carcinomas mixtos, 18,2 % (2) carcinomas sólidos y 18,2% (2) comedocarcinomas. La distribución de estas neoplasias en relación al grado histológico de malignidad fue: 9% (1) grado 1, 45,5% (5) grado 2 y 45,5% (5) grado 3. El período de SLE promedio fue de 318 días y de 436 días para la SG. Se encontró asociación entre el tipo histológico y el pronóstico de la enfermedad: los carcinomas simples y mixtos tuvieron un comportamiento menos agresivo que otros carcinomas. También, se observó relación entre la SLE y la SG con el grado histológico de malignidad, a menor grado, mayor SG; siendo en este caso estadísticamente significativa.

ABSTRACT

Canine mammary neoplasm (CMN) is a very frequent reason for clinical consultation. The incidence rate of this disease is high and its treatment of choice is mastectomy. In medical practice, one of the fundamental aspects is determine the prognostic of this pathology and this is an issue of interest to the owners. There are a large number of predictive factors, both clinical and histopathological, these variables are necessary to establish a prognosis. The aim of this work was to determine the disease free survival (DFS) and the overall survival (OS) of the bitches subjected to mastectomy as the only treatment of the CMN. In addition, mammary tumors were characterized histologically and the tumor malignancy grade was defined in order to evaluate whether there was a relationship with DFS and OS. Twenty-two bitches that presented firm and nodular masses compatible with stage I, II and III mammary neoplasms were included in this research. Those lesions were surgically removed and the histological type was diagnosed according to the 2011 classification of canine mammary neoplasms. The follow-up period was 24 month. The bitches were controlled quarterly after surgery by physical examination, abdominal ultrasound and chest X-ray in search of local recurrence or distant metastases. The results were analyzed statistically and it was determined that 50% (11) were benign tumors and 50% (11) were malignant tumors. In the case of benign masses, the following were diagnosed: 36.4% (4) simple adenomas, 36.4% (4) mixed adenomas, 18.2% (2) intraductal papillary adenoma and 9% (1) adenoma papillary. Malignant neoplasms were classified histologically as: 45.3% (5) simple carcinomas; 18.2% (2) mixed carcinomas, 18.2% (2) solid carcinomas and 18.2% (2) comedocarcinomas. The distribution of these neoplasms in relation to the histological grade of malignancy was: 9% (1) grade 1, 45.5% (5) grade 2 and 45.5% (5) grade 3. The average DFS period was 318 days and the mean OS was 436 days. An association between the histological type and the prognosis of the disease was found: simple and mixed carcinomas had a less aggressive behavior than other carcinomas. Furthermore, there was a relationship between DFS and OS with the tumor malignancy grade, at a lower grade, greater OS; in this last case it was significantly statistically.

INTRODUCCIÓN

En la práctica de la clínica veterinaria, las neoplasias mamarias caninas (NMC) son un motivo de consulta muy frecuente. Estudios europeos muestran que la tasa de incidencia de esta enfermedad es elevada (Dobson *et al.*, 2002; Merlo *et al.*, 2008; Vascellari *et al.*, 2009), sin embargo es mayor en aquellos países como Argentina, donde la ovariectomía temprana, que tiene un efecto protector para esta enfermedad, no es una práctica común. Por otro lado, si lo es el uso de anticonceptivos, uno de los factores de riesgo más importante de las NMC (Rutteman *et al.*, 1990).

El Hospital Escuela de Clínica de la Facultad de Agronomía y Veterinaria (FAV) de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC) recibe alrededor de 300 consultas al año en pequeños animales, (base de datos del Hospital de Clínica de la FAV – UNRC). Los motivos de consulta oncológica más frecuentes son los tumores del sistema tegumentario y de glándula mamaria: 27 y 30% respectivamente (Alcoba *et al.*, 2007; Redondo *et al.*, 2011).

El tratamiento de elección de las NMC, en todos los casos es la mastectomía, excepto en aquellos con carcinoma inflamatorio o metástasis distante. El tipo de cirugía dependerá de la extensión de la enfermedad (Lana *et al.*, 2007). El tratamiento médico, quimioterapia entre otros, solo está indicado como terapia adyuvante pre y/o postquirúrgica. Sin embargo, dado el difícil acceso a estas drogas, su elevado costo y sus numerosos efectos adversos, pocas veces resulta aplicable.

La indicación del procedimiento quirúrgico mencionado genera mucho temor y ansiedad en los propietarios, quienes suelen indagar a cerca del resultado de la misma y del pronóstico postquirúrgico del paciente. Establecer el pronóstico es uno de los aspectos fundamentales de la práctica médica (Farreras Valenti, 1967). Tal es así, que el valor pronóstico de las características clínico-patológicas, tanto en los tumores mamarios caninos como felinos, ha sido motivo de debate por los últimos 30 años entre los oncólogos veterinarios. Al mismo tiempo, la longevidad de los animales de compañía está aumentando lo que lleva a incrementar el número de animales con riesgo de padecer cáncer (Withrow, 2007).

Existen un gran número de factores predictivos, tanto clínicos (edad de presentación, tamaño del tumor, compromiso ganglionar, presencia de úlceras) como histopatológicos (tipo y grado de malignidad), variables que son necesarias para el clínico, que le permiten establecer un pronóstico de las NMC (Pérez Alenza *et al.*, 1997). De todas

maneras, a pesar de estos indicadores, el comportamiento biológico de dichos tumores es difícil de predecir. Por todo lo expuesto, brindar información certera al propietario resulta muy complejo; y si bien el “estándar de oro” continúa siendo el diagnóstico histopatológico postquirúrgico (Rosciari *et al.*, 2015), la variedad histológica de las NMC hace necesario el uso de sistemas de graduación de malignidad para su clasificación y pronóstico (Peña *et al.*, 2012).

La bibliografía señala una sobrevida en las neoplasias malignas de entre 4 a 17 meses (Misdorp *et al.*, 1999). Sin embargo, estos datos son recopilados por autores extranjeros de pacientes que habitan en un ambiente diferente al nuestro, lo que podría provocar un comportamiento distinto de las NMC. En perras atendidas en el Hospital Escuela de Clínica de la FAV sometidas a mastectomía y con diagnóstico de neoplasia maligna, se ha observado que han tenido una sobrevida mayor a la esperada de acuerdo a la bibliografía. Por este motivo, sería un aporte significativo conocer el comportamiento de los tumores mamarios en nuestra región a partir de casos atendidos en nuestro medio. Cotejar esta información con los reportes existentes y evaluar los resultados obtenidos permitirá brindar al propietario información confiable acerca del pronóstico del paciente.

El objetivo general del presente trabajo es determinar la sobrevida libre de enfermedad (SLE) y la sobrevida general (SG) de las perras sometidas a mastectomía como único tratamiento de las NMC. Los objetivos específicos son:

- Caracterizar histológicamente los tumores mamarios.
- Definir el grado de malignidad tumoral.
- Realizar el seguimiento clínico y por imágenes de las perras sometidas a mastectomía.
- Evaluar si existe relación entre la SLE y la SG y el tipo y grado histológico de las neoplasias.

MARCO TEÓRICO

Anatomía y desarrollo de la glándula mamaria

Las glándulas mamarias son glándulas sudoríparas extensamente modificadas funcionalmente asociadas al aparato genital. Comienzan a formarse durante la vida embrionaria a partir del ectodermo, su mayor desarrollo se da en la pubertad y su máxima actividad luego del parto. Se desarrollan como yemas epiteliales que crecen en el mesénquima subyacente desde engrosamientos ectodérmicos alineados que se extiende desde la axila hasta la ingle. De la proliferación del mesénquima que rodea a la yema se eleva el pezón, y de la yema mamaria crecen uno o más brotes epidérmicos dentro del tejido conectivo del pezón y comienzan a canalizarse cerca del momento del nacimiento. Cada brote dará origen a un sistema de conductos separado con un tejido glandular asociado (Dyce *et al.*, 1999). El parénquima se desarrolla por la proliferación de células epiteliales procedentes del cordón mamario primario. Con el tiempo, estas células forman unas estructuras circulares profundas denominadas alvéolos, que constituyen las unidades fundamentales de secreción de leche en la glándula mamaria (Klein, 2014). El crecimiento de los conductos y del tejido glandular se continúa después de la pubertad y especialmente durante la primera preñez. En la perra se desarrollan normalmente 5 pares, no obstante se han encontrado algunas con 4 o 6 pares. Existen 2 pares torácicos, 2 abdominales y 1 inguinal. Los 3 pares de glándulas craneales son irrigadas craneolateralmente por la arteria torácica lateral y más en profundidad por la arteria epigástrica craneal superficial y ramas perforantes de las arterias intercostales; mientras que los 2 pares caudales reciben el riego de la arteria epigástrica caudal superficial y de manera más profunda de ramas de la arteria abdominal craneal y la circunfleja ilíaca profunda. La linfa procedente de los 3 pares de mamas craneales se dirige a los nódulos axilar, axilar accesorio y esternal, y la procedente de los 2 pares caudales se dirige a los nódulos inguinales superficiales (Dyce *et al.*, 1999). Sin embargo, algunos estudios más recientes señalan que el tercer par mamario drena tanto al nódulo axilar como al inguinal (Sorenmo *et al.*, 2011) y que el quinto par puede drenar al nódulo poplíteo (Fig. 1) (Pereira *et al.*, 2003). En las perras sanas, el drenaje linfático de cada glándula se realiza al linfonodo ipsilateral, y no hay drenaje hacia las glándulas o linfonodos contralaterales, pero esto puede cambiar en caso de neoplasias (Pereira *et al.*, 2003).

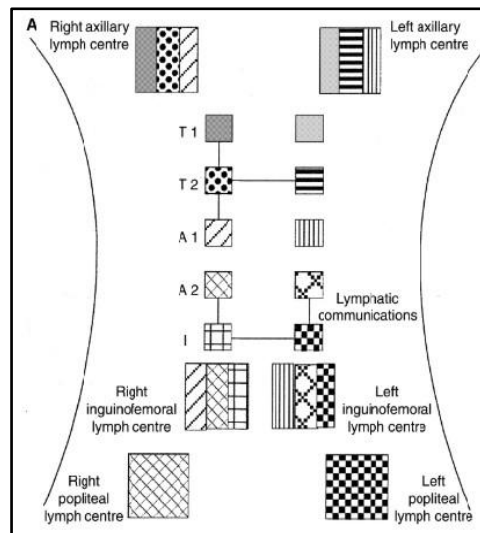


Fig. 1: Esquema del drenaje linfático de las glándulas mamarias normales en la perra.
(Pereira *et al.*, 2003)

En el control de la mamogénesis participan factores genéticos y endócrinos. El crecimiento inicial del botón mamario está controlado por el mesénquima embrionario, y es independiente de hormonas durante toda la etapa pre-puberal (Hennighausen y Robinson, 2001). Durante la pubertad comienza el desarrollo de los conductos del sistema mamario controlados por los estrógenos, la hormona del crecimiento y los esteroides adrenales; mientras que el desarrollo de los alveolos en las terminales de los conductos necesita además, progesterona y prolactina. El desarrollo de la glándula mamaria se hace evidente hacia la mitad de la gestación, comenzando con la secreción de leche al final de la misma, dado por el aumento de la prolactina en circulación (Klein, 2014).

Histología de la glándula mamaria

Histológicamente la glándula mamaria es tubuloalveolar compuesta, en la cual grupos de unidades secretoras, es decir los alvéolos glandulares, forman lóbulos separados por septos de tejido conectivo. Cada alvéolo está tapizado por un epitelio simple cúbico, que varía en su altura según la fase de la actividad secretora. En la luz de los acinos pueden aparecer células descamadas y algunos macrófagos y leucocitos que comprenden parte del producto de la secreción durante la lactancia. Entre las células epiteliales glandulares y la membrana basal del alvéolo se localizan células mioepiteliales estrelladas con abundantes filamentos citoplasmáticos de actina. Estas células se contraen en respuesta a la ocitocina, lo que permite el paso de leche desde las unidades secretoras al sistema de conductos. Alrededor de cada unidad secretora existe una capa de tejido conectivo laxo con un extenso

plexo vascular y con numerosos linfocitos infiltrados, principalmente durante la producción de calostro. El tejido conectivo que rodea a cada lóbulo es grueso, formando un septo que contiene los conductos interlobulares (Fig. 2).

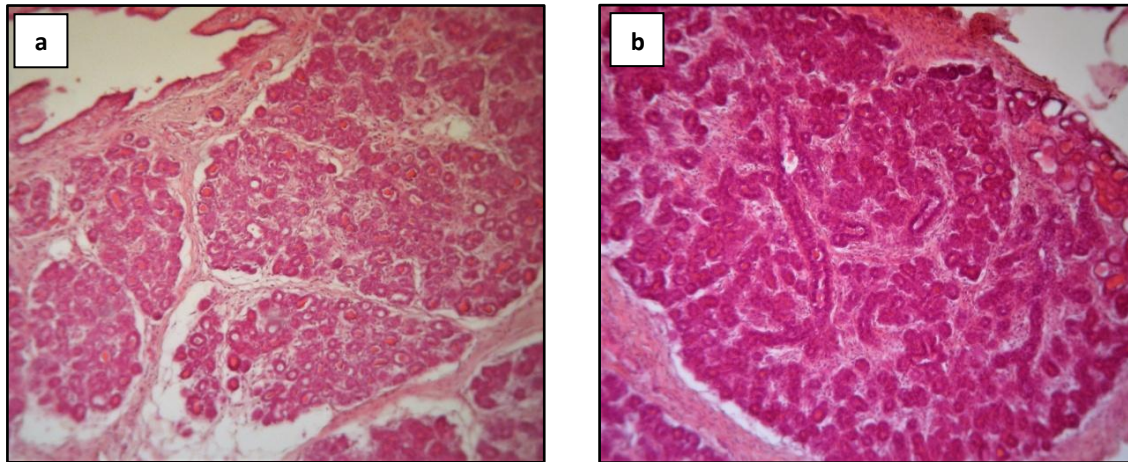


Fig. 2: Corte histológico de glándula mamaria normal activa (a) e inactiva (b) a 100x.
(Muestras brindadas por la Cátedra de Histología de la Facultad de Agronomía y Veterinaria – UNRC)

El sistema de conductos consta de un conducto intralobulillar de epitelio simple cúbico que puede estar rodeado de células mioepiteliales. Éste drena en el conducto lobulillar, formado por epitelio simple cúbico, que distalmente presenta dos capas de células. Conforme se funcionan para formar los conductos galactóforos lobulares, que es el conducto excretor primario para cada lóbulo, se rodean de fibras musculares lisas dispuestas longitudinalmente. Finalmente, los conductos galactóforos se abren separadamente sobre la superficie del pezón en varios canales externos (Espinosa de los Monteros y Zayas *et al.*, 2004).

Incidence de las neoplasias mamarias

La patología más frecuente en estas glándulas son las neoplasias, y representan el 42% de todos los tumores de la perra y el 82% de los provenientes del aparato reproductivo femenino (Brodey *et al.*, 1983; Moulton, 1990; Meuten, 2002); alrededor del 50% de ellos son malignos (Brodey *et al.*, 1983; Sorenmo, 2003). Estudios europeos muestran que la tasa de incidencia de NMC es cercana a 200/100.000 perras por año (Dobson *et al.*, 2002; Merlo *et al.*, 2008; Vascellari *et al.*, 2009). Otros investigadores llevaron a cabo una encuesta sobre 80.000 perras aseguradas en Suecia (mayormente enteras), y encontraron una incidencia general para NMC de 111/10.000 (Egenvall *et al.*, 2005). Este último dato

podría ser similar al de aquellos países como Argentina, donde la ovariectomía temprana no es una práctica común. Las perras castradas antes de su primer ciclo estral tienen un 0,5% de posibilidades de desarrollar neoplasia mamaria. Este riesgo se eleva al 8% luego del primer celo y continua aumentando hasta el 26% si se castran luego del segundo ciclo estral (Schneider *et al.*, 1969).

Etiopatogenia

El efecto protector de la ovariectomía temprana y la presencia de receptores para hormonas esteroideas en los tejidos tumorales indican que el factor hormonal está involucrado en el desarrollo de estas neoplasias (Mol *et al.*, 1999). El riesgo de NMC en los machos es del 1% o menor que el de las perras (Lana *et al.*, 2007). Además, se ha demostrado que los estrógenos y los progestágenos sintéticos, que son usados comúnmente en la práctica veterinaria, promueven el desarrollo de tumores (Rutteman, 1992).

Otros factores de riesgo importantes en las perras, además de ser enteras o castradas después de los 2,5 años de vida incluyen:

-Edad avanzada: en general las NMC afectan a perras de edad media a avanzada (Chang *et al.*, 2005), la edad promedio de ocurrencia oscila entre 8 a 10 años (Schneider, 1970). Un estudio reciente encontró diferencias en la edad de aparición de los tumores benignos y malignos. Las perras con tumores benignos tuvieron una edad promedio de 8,5 años, mientras que las perras con tumores malignos tenían una media de 9,5 años (Sorenmo *et al.*, 2009).

-Raza y predisposición genética: Si bien los tumores de mama pueden producirse en cualquier raza, hay estudios que revelan mayor predisposición en algunas en particular. Estos reportes varían de acuerdo al origen de los estudios: en Japón se llevó a cabo un estudio que encontró que la incidencia de NMC es menor en razas pequeñas que en otras (Itoh *et al.*, 2005). En República Checa, las razas que fueron reportadas con mayor riesgo de padecer esta enfermedad fueron Cocker Spaniel Inglés, Poodle y Dachshunds (Zatloukal *et al.*, 2005). En Argentina, las razas más frecuentemente diagnosticadas con tumores mamarios fueron Cocker Spaniel Inglés, Pekinés y Ovejero Alemán (Benavente *et al.*, 2013, Argentina, comunicación personal). Estos estudios muestran que las NMC tienen alguna asociación racial, y por lo tanto, probablemente un componente genético.

Para poder determinar la existencia de factores genéticos en el desarrollo de NMC se han estudiado múltiples genes. Tal es el caso del proto-oncogen c-erbB-2 que codifica

una proteína transmembrana llamada Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal 2 (EGFR- 2 o HER-2) que regula la proliferación celular. La amplificación del gen HER-2 y/o la sobreexpresión de su proteína (p185) están descritas en un 10-40% de tumores de mama en mujeres y se correlaciona con un pobre pronóstico (Ross y Fletcher, 1999), sin embargo, el rol del HER- 2 en caninos aun no es claro. En las perras se ha reportado sobreexpresión de este gen entre el 19 y el 35% de neoplasias mamarias malignas, pero no en tejido mamario normal o tumores benignos. No obstante, la bibliografía es controvertida acerca de esta condición y de su significancia como valor pronóstico. (Hsu *et al.*, 2009; Gudan Kurilj, 2011; Kim *et al.*, 2011). Aunque, en estudios previos se reportó una asociación positiva entre la sobreexpresión de HER-2 y pleomorfismo nuclear, grado histológico y recuento de mitosis (Dutra *et al.*, 2004); otros autores no encontraron correlación entre la sobreexpresión de HER-2 y la progresión tumoral o un menor tiempo de supervivencia general (Kim *et al.*, 2011; Ressel *et al.*, 2013).

El gen supresor tumoral p-53 ha sido descrito como el guardián del genoma dada su capacidad de llevar a la célula al arresto o a la apoptosis dependiendo del grado de daño celular producido. La alteración (mutación) de este gen puede resultar en un anormal crecimiento celular descontrolado que lleva a la transformación tumoral.

El gen p-53 es el más frecuentemente inactivado en neoplasias en humanos. (Argyle y Khanna, 2007). En las NMC la mutación de este gen ha sido detectada tanto en neoplasias benignas como malignas (Lee y Kweon, 2002; Kumaraguruparan *et al.*, 2006; Morris *et al.*, 2009). Sin embargo su relevancia pronóstica en aun cuestionada (Klopfleisch *et al.*, 2011).

El gen BRCA1, localizado en humanos en el cromosoma 17q21, se conserva y expresa en un amplio número de tejido de mamíferos (Yang y Lipmann, 1999). Este gen codifica una fosfoproteína que participa en la regulación negativa del ciclo celular de las células epiteliales del tejido mamario (Lee *et al.*, 1999). Su mutación resulta en la reparación defectuosa del ADN, anormal arresto del ciclo celular, inestabilidad genética y tumorigénesis (Deng y Scott, 2000). Es por esto que el BRCA1 es considerado un supresor tumoral, y la disminución de su expresión representa un paso crítico en el desarrollo del cáncer de mama. Muchos estudios han descrito la presencia de ARNm del BRCA1 o la expresión de su proteína y la mutación de este gen en NMC (Nieto *et al.*, 2003; Klopfleisch y Gruber, 2009; Rivera y von Euler, 2011). En la perra, la ausencia de su expresión nuclear está asociada a características de malignidad, incluido elevado índice de proliferación y

ausencia de la expresión de receptores de estrógeno alfa (ER α), sugiriendo que juega un rol en el comportamiento maligno de estas neoplasias (Nieto *et al.*, 2003).

-Dieta: las perras que fueron delgadas entre los 9 y 12 meses de edad tienen menor riesgo de desarrollar NMC (Sonnenschein *et al.*, 1991). Además, la obesidad al año de edad o 1 año antes del diagnóstico de nódulos mamarios está relacionada con una mayor incidencia de displasia o neoplasia mamaria (Pérez Alenza *et al.*, 1998).

-En relación a la pseudopreñez, las opiniones son controvertidas. Mientras que algunos autores consideran que no tiene efecto en el desarrollo de tumores mamarios (Brodey *et al.*, 1966; Morris *et al.*, 1998), otros hallaron una relación positiva (Donnay *et al.*, 1994). Además, se que evidenció que puede incrementar la posibilidad de la presentación de lesiones paraneoplásicas, por el incremento de las hormonas como la progesterona y consecuentemente, prolactina (Gobello y Corrada, 2001).

Signos clínicos

Las NMC se presentan clínicamente como una o más masas discretas en la mama que, en algunos casos, son descubiertas por los mismos propietarios; pero en general, se trata de pacientes de edad media a avanzada que concurren a la consulta por otros problemas médicos y que, durante el examen físico, son detectadas mediante una cuidadosa palpación de cada glándula. Un estudio reportó que cerca del 70% de las perras con NMC presentan más de una masa tumoral (Sorenmo *et al.*, 2009). Los tumores pueden afectar a cualquier mama, sin embargo cerca del 65% al 70% ocurren en las glándulas abdominales caudales e inguinales, probablemente debido al mayor volumen de tejido (Lana *et al.*, 2007).

Los tumores benignos suelen ser pequeños, bien circunscriptos y firmes; mientras que los malignos pueden incluir signos como rápido crecimiento, límites mal definidos, fijación a la piel o a capas más profundas y ulceración o inflamación (Lana *et al.*, 2007).

Las perras afectadas suelen no presentar sintomatología, más allá de la lesión nodular, sin embargo, en algunos casos pueden sufrir ulceraciones del tumor con sangrado o metástasis distantes, en cuyo caso tendrá signos propios del órgano involucrado. Las metástasis usualmente se desarrollan en los linfonódulos centinelas, pero debe considerarse que la presencia de neoplasias puede alterar el drenaje linfático normal (Patsikas *et al.*, 2006). El sitio de metástasis distante más común son los pulmones, aunque también

pueden afectarse los nódulos linfático sublumbar, esternales y preescapulares; hígado; y raramente, el hueso (Lana *et al.*, 2007).

Diagnóstico

El camino diagnóstico incluye un examen físico general completo, sumado a análisis hematológicos de rutina. Se deben evaluar los nódulos linfáticos regionales y realizar radiología torácica con incidencia ventrodorsal, laterolateral izquierda y derecha para descartar la posibilidad de metástasis regional o distante. Además, y sobre todo si están afectadas las glándulas inguinales o abdominales caudales, corresponde realizar una ecografía de abdomen para evaluar los nódulos sublumbar e ilíacos (Lana *et al.*, 2007).

El diagnóstico de certeza se obtiene por histopatología, por lo que todas las masas deberían ser extraídas quirúrgicamente, registrar su tamaño y ubicación, y ser derivadas para su análisis y clasificación. En el caso de nódulos múltiples, corresponde la evaluación de todos ellos, ya que pueden ser del mismo o diferente tipo citológico. Incluso, esta heterogeneidad histológica puede verse en distintas secciones del mismo tumor (Sorenmo *et al.*, 2009).

Las NMC pueden clasificarse de acuerdo a diferentes criterios, los cuales están relacionados con el pronóstico de la enfermedad. Históricamente se han propuestos distintos sistemas de clasificación y numerosas nomenclaturas (Hampe y Misdorp, 1974; Misdorp *et al.*, 1999). Recientemente el American College of Veterinary Pathologists ha propuesto un nuevo sistema de clasificación elaborado por Goldschmidt *et al.* (2011), que aun continúa en evaluación (Peña *et al.*, 2012; Rosciani *et al.*, 2015). En la misma se incluyen las siguientes variedades:

1. Neoplasias Epiteliales Malignas
 - 1.1 Carcinoma-in situ
 - 1.2 Carcinoma simple
 - a. Tubular
 - b. Tubulopapilar
 - c. Cistopapilar
 - d. Cribiforme
 - 1.3 Carcinoma micropapilar invasivo
 - 1.4 Carcinoma sólido
 - 1.5 Comedocarcinoma
 - 1.6 Carcinoma anaplásico
 - 1.7 Carcinoma que surge de un adenoma complejo/tumor mixto
 - 1.8 Carcinoma complejo

- 1.9 Carcinoma y mioepitelioma maligno
- 1.10 Carcinoma tipo mixto
- 1.11 Carcinoma ductal
- 1.12 Carcinoma papilar intraductal

- 2. Neoplasias epiteliales malignas de tipos especiales
 - 2.1 Carcinoma de células escamosas
 - 2.2 Carcinoma adenoescamoso
 - 2.3 Carcinoma mucinoso
 - 2.4 Carcinoma rico en lípidos
 - 2.5 Carcinoma de células fusiformes
 - Mioepitelioma maligno
 - Carcinoma de células escamosas – tipo fusiforme
 - 2.6 Carcinoma inflamatorio

- 3. Neoplasias Mesenquimales Malignas - Sarcoma
 - 3.1 Osteosarcoma
 - 3.2 Condrosarcoma
 - 3.3 Fibrosarcoma
 - 3.4 Hemangiosarcoma
 - 3.5 Otros sarcomas

- 4. Carcinosarcoma - Tumor mamario maligno mixto

- 5. Neoplasias benignas
 - 5.1 Adenoma simple
 - 5.2 Adenoma papilar intraductal
 - 5.3 Adenoma ductal
 - 5.4 Fibroadenoma
 - 5.5 Mioepitelioma
 - 5.6 Adenoma complejo
 - 5.7 Tumor mixto benigno

- 6. Hiperplasia y displasia mamaria
 - 6.1 Ectasia ductal
 - 6.2 Hiperplasia lobular
 - 6.2.1 Regular
 - 6.2.2 Con actividad secretoria
 - 6.2.3 Con fibrosis interlobular de tejido conectivo fibroso
 - 6.2.4 Con atipia
 - 6.3 Epiteliosis
 - 6.4 Papilomatosis
 - 6.5 Fibrosis Cambios fibroadenomatosos
 - 6.6 Ginecomastia

7. Neoplasias del pezón

7.1 Adenoma

7.2 Carcinoma

7.3 Carcinoma con infiltrado epidermal

8. Hiperplasia/Displasia del pezón

8.1 Melanosis de la piel del pezón

Al mismo tiempo, resulta necesario utilizar algún criterio de malignidad, para esto se utiliza el grado de malignidad histológica GMH de Peña (Clemente *et al.*, 2010). Esta graduación fue establecida en NMC siguiendo las modificaciones del método numérico utilizado por Elston y Ellis (1991) para tumores mamarios humanos. El sistema evalúa diferentes aspectos asignándoles puntaje de la siguiente manera:

-Formación de túbulos (1 a 3 puntos), 1= formación de túbulos en más del 75% del espécimen; 2= moderada formación de túbulos (10-75%); 3= mínima formación de túbulos (menor al 10%).

-Pleomorfismo nuclear (1 a 3 puntos), 1= núcleos uniformes o regulares y nucléolos ocasionales; 2= moderada variación en la forma y tamaño del núcleo, núcleos hipercromáticos, y presencia de nucléolos algunos de los cuales pueden ser prominentes; 3= marcada variación en el tamaño nuclear y núcleos hipercromáticos, a veces con uno o más nucléolos prominentes.

-Índice mitótico (1 a 3 puntos dependiendo de la cantidad de figuras mitóticas en 10 campos seleccionados de alta resolución 400x), 1= 0 a 9 figuras mitóticas; 2= 10 a 18 figuras mitóticas; 3= 20 o más figuras mitóticas.

El GMH del tumor es la suma de los puntos de cada característica evaluada, así GMH 1= 2 a 5 puntos, bien diferenciado; GMH 2= 6 a 7 puntos, moderadamente diferenciado; GMH 3= 8 a 9 puntos, pobremente diferenciado (Clemente *et al.*, 2010).

La estadificación según parámetros clínicos de las NMC se ha establecido hace ya muchos años (Owen, 1980) y resulta muy importante antes de comenzar algún tratamiento. Lana *et al.* (2007) proponen la siguiente modificación al sistema TNM:

T: Tumor primario

T1 < 3cm en su diámetro máximo

T2 3 a 5cm en su diámetro máximo

T3 >5cm en su diámetro máximo

N: Nódulos linfáticos regionales

N0 Sin metástasis (por citología o histopatología)

N1 Con metástasis (por citología o histopatología)

M: Metástasis distante

M0 Sin metástasis distante detectada

M1 Metástasis distante detectada

Estadios:

I: T1 - N0 - M0

II: T2 - N0 - M0

III: T3 - N0 - M0

IV: Cualquier T - N1 - M0

V: Cualquier T - cualquier N - M1

Tratamiento

Tal como se mencionó con anterioridad, el tratamiento de elección de las neoplasias mamarias no inflamatorias es la resección quirúrgica con márgenes seguros. Las técnicas quirúrgicas para la remoción del tumor incluyen: la lumpectomía o nodulectomía (extracción solo de la masa), mastectomía simple o regional (extracción de la o las glándulas que contienen la masa), mastectomía unilateral (extracción de toda la cadena de glándulas en el lado de la o las masas y los linfonodos asociados) y mastectomía bilateral (remoción de ambas cadenas mamarias). En este caso, la cirugía se suele llevar a cabo como procedimientos escalonados con 1 mes de intervalo entre uno y otro, para disminuir la tensión sobre la síntesis de la herida. La elección de la técnica dependerá del número, tamaño y localización del tumor (Tobias, 2011). Múltiples estudios han demostrado que la tasa de recurrencia y de sobrevida no están influenciadas por el tipo o la extensión de la cirugía realizada (Yamagami *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 2005; Betz *et al.*, 2012).

El nódulo linfático axilar, rara vez se encuentra afectado por el cáncer mamario y no debería ser removido de manera profiláctica, solo corresponde si se encuentra agrandado o con adherencias. El nódulo linfático inguinal debe ser extraído siempre que este aumentado de tamaño, sea positivo a metástasis mediante citología o se extirpe la glándula inguinal, debido a que están íntimamente relacionados (Lana *et al.*, 2007).

El beneficio de la ovariectomía realizada en perras con tumores mamarios es controversial. Mientras que muchos estudios señalan que esta técnica no logra modificar la sobrevida e intervalo libre de enfermedad (Morris *et al.*, 1998; Philibert *et al.*, 2003), un

estudio demostró una mayor sobrevida en aquellas perras castradas de manera concurrente a la mastectomía o dentro de los 2 años posteriores a la misma (Sorenmo *et al.*, 2000). Además, Chang *et al.* (2005) señaló que este beneficio sería mayor en animales con carcinomas complejos que en aquellos con carcinomas simples. Recientemente, se ha informado que no todas las perras con neoplasias mamarias se beneficiarían con la ovariectomía (u ovariectomía) al momento de la remoción del tumor; sino que aquellas con neoplasias grado 2 y positivas a RE, o con aumento sérico de estrógeno perquirúrgico, representan el grupo que más se favorecerían con la castración (Kristiansen *et al.*, 2016). En el caso de perras con tumores mamarios benignos, la ovariectomía conjunta a la mastectomía, reduciría el riesgo del desarrollo de nuevos tumores un 50% (Kristiansen *et al.*, 2013).

La quimioterapia adyuvante es utilizada rutinariamente en mujeres con cáncer de mama, sin embargo, existe escasa información disponible a cerca de la eficacia de esta terapia posoperatoria en caninos. Las perras con tumores mamarios grandes, invasivos o metastásicos pueden beneficiarse con la quimioterapia sistémica; en particular aquellas con carcinomas ductales (Moore y Ogilvie, 2008).

En un estudio realizado por Karayannopoulou *et al.* (2001) se evaluó la combinación de 5-fluorouracilo (150mg/m², EV) y ciclofosfamida (100mg/m², EV) administrada 1 vez por semana durante el postquirúrgico, durante 4 semanas, en 8 perras con carcinoma mamario en estadio 3. El promedio de sobrevida en este grupo fue de 24 meses, comparado con los 6 meses para 8 perras que no recibieron el tratamiento. Sin embargo, no se observó ningún beneficio significativo, tanto en el tiempo libre de recurrencia, tiempo a la metástasis ni sobrevida general en perros con tumores mamarios altamente invasivos que recibieron terapia adyuvante posquirúrgica con doxorubicina y docetaxel, versus aquellos que solo recibieron la intervención quirúrgica (Simon *et al.*, 2006).

Otra alternativa quimioterapéutica es el gemcitabine, el uso de esta droga como adyuvante posquirúrgico mostró controlar la recurrencia local; sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el tiempo hasta la aparición de metástasis y la SG. Dada su buena tolerabilidad y escasos efectos adversos presentados en este estudio, podría ser de utilidad en combinación con otros agentes terapéuticos (Marconato *et al.*, 2008).

La desmopresina, derivado sintético de la hormona antidiurética, tiene propiedades antimetastásicas y hemostáticas, por lo que fue probada su eficacia como terapia adyuvante perioperatoria. Su aplicación 24 horas previas y 30 minutos posteriores a la mastectomía

aumentó significativamente el tiempo libre de enfermedad y al sobrevida general sin evidenciar efectos tóxicos. Sin embargo, se requieren estudios a mayor escala para evaluar completamente este protocolo farmacológico (Hermo *et al.*, 2008).

La terapia hormonal es una opción ampliamente aceptada en el tratamiento de mujeres con cáncer de mama positivo a receptores de estrógeno. De acuerdo a Sorenmo (2003), la mayoría de las NMC expresan receptores de estrógeno, lo que los hace candidatos a esta terapia. El tamoxifeno es una droga antiestrogénica (antagonista de los receptores de estrógeno), el cual inhibe la estimulación de las células cancerosas existentes al unirse a los receptores estrogénicos. En humanos es uno de los quimioterápicos con mejor respuesta en tumores positivos a receptores de estrógeno (Karn *et al.*, 2010). Sin embargo, en perras, a diferencia de la mujer, tiene acción estrogénica, produciendo efectos colaterales tales como edema y descargas vulvares purulentas, hiperplasia endometrial quística, piómetra e hiperplasia vaginal lo que limita su uso en perras; además de provocar retinitis (Tavares *et al.*, 2010).

Pronóstico

La sobrevida total para perras con neoplasias malignas es de 4 a 17 meses. Aquellos animales con elevada probabilidad de reaparición deberían examinarse cada 2 o 3 meses mediante radiografías torácicas junto con una exploración general y en especial de las glándulas mamarias. En el caso de carcinomas in situ estos controles deberían realizarse cada 6 meses. Aquellos animales que durante más de 24 meses no muestren ningún tipo de recidiva tienen pocas posibilidades de hacerlo (Martí, 2009).

Debido a la alta incidencia y variabilidad de las NMC, resulta muy importante para los clínicos saber qué factores le van a permitir establecer un pronóstico inicial y un adecuado tratamiento. Además, es necesario poder predecir el comportamiento postquirúrgico de esta patología, no solo para brindar información confiable a los propietarios, sino también porque esto permite la selección de pacientes para tratamientos específicos individualizados.

Los factores pronósticos pueden definirse como una o más características clínicas, patológicas o biológicas del individuo o su tumor, que permiten la predicción de resultado clínico y sobrevida del paciente sin someterlo a ninguna terapia adicional o adyuvante, más allá de la cirugía inicial (Cavalcanti y Cassaldi, 2006).

Factores clínicos:

- La edad al momento del diagnóstico ha mostrado tener una asociación estadísticamente significativa con una menor SLE, es decir a mayor edad de presentación peor pronóstico (Pérez Alenza *et al.*, 1997; Peña *et al.*, 2012). Tal es así que en un estudio realizado en Brasil, donde la media de diagnóstico fue 11,76 años, el análisis estadístico reportó que por cada año que aumentaba la edad, el cociente de riesgo se incrementa un 23%, lo que indica que es un factor muy influyente en la supervivencia de las perras (Dias *et al.*, 2016). Sin embargo, cuando se tuvo en cuenta la edad fisiológica en lugar de la cronológica, no se encontraron diferencias significativas (Philibert *et al.*, 2003).
- El tamaño de las neoplasias al momento del diagnóstico y su crecimiento rápido e invasivo son parámetros clínicos muy importantes asociados a mal pronóstico según muchos estudios (Ferreira *et al.*, 2009; Sorenmo *et al.*, 2009; Peña *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2016). Los tumores de mayor tamaño (> 5cm) son generalmente malignos y se correlacionan con pérdida de receptores de progesterona y a mayores índices de proliferación, lo que indica una elevada tasa de crecimiento. Estos hallazgos fueron reforzados con la observación de períodos de supervivencia menores en aquellos animales con cáncer de mama, portadores de masas de gran tamaño (Ferrerira *et al.*, 2009). Algo similar fue descrito en un estudio donde las perras con tumores menores a 3cm tuvieron una supervivencia significativamente mayor (con una media de 22 meses versus 14 meses para aquellas que presentaban masas mayores a 3 cm (Philibert *et al.*, 2003). Además, el tamaño tumoral también influye en el intervalo libre de metástasis, recalcando la importancia del diagnóstico temprano, antes de que la enfermedad avance (Betz *et al.*, 2012). Tal es así, que Sorenmo *et al.* (2009) reportó sólo 1 tumor maligno de 97 nódulos menores a 1 cm. Mientras que el tamaño tumoral es un parámetro objetivo, la tasa de crecimiento es subjetivo, ya que esta información, al ser provista por el propietario, brinda menor información en relación al pronóstico (muchas veces los dueños no ven nódulos pequeños en perros de pelo largo).

Toda esta información demuestra la importancia que tiene en el pronóstico el correcto examen clínico durante la consulta de rutina y el valor que tiene evaluar la medida de los nódulos en caso de hallar alguno. Determinar el tamaño tumoral es simple, de bajo costo y fácilmente reproducible, pero sin embargo, pocas veces realizado por los veterinarios.

- La presencia de úlceras o necrosis en la piel de las mamas afectadas ha sido un indicador de malignidad y se considera un factor independiente fuertemente asociado a un pobre pronóstico (Pérez Alenza *et al.*, 1997; de las Mulas *et al.*, 2005). Sin embargo, en un estudio más reciente no se encontró una relación significativa de este tipo de lesión con el pronóstico (Santos *et al.*, 2013). Este autor manifiesta que, si bien la ulceración puede ser causada por el crecimiento invasivo del tumor, hay que destacar que también puede ser secundaria a trauma autoinducido, isquemia de la piel o a infecciones, características que no están necesariamente asociadas a un comportamiento biológico agresivo.
- La presencia de metástasis en los nódulos linfáticos regionales al momento de la cirugía está fuertemente asociada a menor tiempo de supervivencia general y de período libre de enfermedad, aumenta el riesgo de recurrencia o de metástasis distante y se relaciona con la mortalidad (de las Mulas *et al.*, 2005; Peña *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2013). La supervivencia en perras con metástasis en los nódulos linfáticos de carcinomas simples fue significativamente peor ($P < 0.001$) que en aquellas con linfonodos negativos a metástasis (Karayannopoulou *et al.*, 2005).
- El diagnóstico de metástasis distantes es un indicador de muy mal pronóstico, y si se hace durante el examen previo a la mastectomía esta no debería realizarse (Lana *et al.*, 2007). En caso de perras con metástasis distantes al momento del diagnóstico de la neoplasia mamaria, tuvieron un pobre pronóstico, con una supervivencia media postquirúrgica de 5 meses, comparado con 28 meses en perras sin evidencia de metástasis (Philibert *et al.*, 2003). Otro estudio reveló que, durante los 2 años de seguimiento realizado, el 30% de los animales desarrollaron recurrencia local o metástasis distante y el 25,8% murió o fue eutanasiado por este motivo. En estas perras, la supervivencia fue de $11,96 \pm 7,58$ meses (rango de 2 a 24 meses) y la media para la detección de estas recurrencias o metástasis fue de $5,29 \pm 5,68$ meses (Santos *et al.*, 2013).
- El estadio clínico por el método TNM, mencionado con anterioridad en este texto (Lana *et al.*, 2007), naturalmente depende de los factores ya expuestos (tamaño del tumor, compromiso del nódulo linfático y presencia de metástasis distante), por lo que resulta lógico darle valor pronóstico. Chang *et al.*, (2005) encontró una diferencia significativa entre perras con estadio I, II o III comparado con perras en estadio IV o V en la supervivencia 2 años posteriores a la mastectomía. Además, otro estudio previo demostró que el estadio clínico tiene valor pronóstico al observar

que los animales con estadio I tenían una sobrevida de 24 meses, lo que es significativamente mayor a los 12, 15 y 19 meses para los animales en estadio II, III, y IV respectivamente (Philibert *et al.*, 2003).

- Como se señaló anteriormente, para muchos autores, la ovariectomía al momento de la remoción quirúrgica del tumor o dentro de los 2 años previos prolongaría el tiempo de SG de las perras (Sorenmo *et al.*, 2000) por lo que la castración sería un factor pronóstico positivo en estos animales, aunque no estadísticamente significativo en todos los casos (Kristiansen *et al.*, 2016). Para Chang *et al.*, (2005) este beneficio fue mayor en perras con carcinomas complejos que en aquellas con carcinomas simples.
- Otras variables reproductivas como número de preñeces, edad de la primer preñez a término, características del ciclo estral y presencia de pseudopreñez, no afectan el pronóstico de perras que padecen NMC (Schneider *et al.*, 1969; Hellmén *et al.*, 1993). Además, existen otros factores que parecen no estar asociados al pronóstico de la enfermedad tales como raza, peso, glándula afectada, número de masas y tipo de cirugía realizada, siempre que tenga un adecuado margen quirúrgico (Yamagami *et al.*, 1996; Philibert *et al.*, 2003; Betz *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2013; Dias *et al.*, 2016).

Factores patológicos:

- En relación al valor pronóstico de los parámetros patológicos, el tipo histológico ha sido uno de los más ampliamente estudiados y es una buena herramienta para predecir el potencial metastásico de las NMC. Entre las neoplasias malignas, los sarcomas son de peor pronóstico, mientras que entre los carcinomas, los pacientes con tumores anaplásicos o sólidos tienen menor tasa de sobrevida comparado con aquellos con carcinoma papilar, tubular o in situ (Misdorp *et al.*, 1999). De manera similar, Rasotto *et al.* (2012) observaron una tendencia en aumento a producir metástasis en el siguiente orden: carcinoma tubular, tubulopapilar, sólido y anaplásico. Otro estudio, en acuerdo con lo anterior, reveló que los carcinomas sólidos son los que más frecuentemente presentan recurrencias o metastizan (40%), seguido por los comedocarcinomas (20%), carcinoma simple (13,3%), carcinoma adenoescamoso (13,3%) y carcinoma complejo (6,7%) (Peña *et al.*, 2012).

Sin embargo, no todos los autores coinciden. En un estudio en el que se investigó la sobrevida de las perras luego de la cirugía por NMC, se observó que el 63% de las pacientes diagnosticadas con carcinoma simple túbulo-papilar sobrevivió a los 18

meses y también el 53% de las que presentaron carcinomas de tipo mixto. El 50% de las perras diagnosticadas como carcinomas simples tubulares y las que padecían carcinomas y mioepiteliomas malignos, sobrevivió a los 18 meses post cirugía, mientras que los casos diagnosticados como carcinoma complejo, sólo lo hicieron en el 35%. Las dos variedades que resultaron más agresivas fueron el carcinoma anaplásico y el carcinoma micropapilar invasor, muriendo las pacientes antes del año de seguimiento (Rosciari *et al.*, 2015).

Un estudio más actual realizado en 229 casos demuestra que la clasificación propuesta por Goldschmidt (2011) tiene una asociación altamente significativa con la sobrevida general específica al tumor, obteniendo los siguientes resultados: los carcinomas anaplásicos y los carcinosarcomas fueron los tipos tumorales más agresivos, con un promedio de sobrevida total (PST) de 4,2 meses. Todos los animales diagnosticados con estos dos tipos de tumor murieron dentro del año de seguimiento y tenían un riesgo 150 veces mayor de morir a causa del tumor, que aquellos perros con carcinoma complejo. Una progresión algo más lenta se observó en los carcinomas adenoescamosos (PST = 12,6 meses), comedocarcinomas (PST = 18 meses), y en los carcinomas sólidos (PST = 15.6 meses), sin embargo el riesgo de morir por causas relacionadas al tumor se mantuvo elevada (25 veces más que en el carcinoma complejo). Las perras con carcinoma simple tubulopapilar, papilar intraductal y carcinoma y mioepitelioma maligno tuvieron una PST mayor a 19 meses y de entre 10,4 a 13 veces mayor riesgo de morir que aquellas con carcinoma complejo. Los animales diagnosticados con carcinoma tubular simple y carcinoma complejo mostraron promedios de sobrevida prolongados de 29 y 36 meses, respectivamente (Rasotto *et al.*, 2017).

- Otro indicador de malignidad tumoral es el grado histológico, originalmente se utilizaba el sistema de Elston y Ellis (1991) también conocido como el método de Nottingham, desarrollado para cáncer de mamas en humanos, pero actualmente se encuentra ampliamente aceptado el método modificado de Peña para NMC (Clemente *et al.*, 2010), el cual ha demostrado tener valor pronóstico y ser más preciso que los sistemas anteriores (Peña *et al.*, 2012; Rasotto *et al.*, 2017). Esta graduación permite, de manera más objetiva, predecir el comportamiento biológico de la enfermedad y reducen los problemas de consistencia y repetitibilidad al mínimo (Karayannopoulou *et al.*, 2005).

Se ha observado una correlación entre el grado y el tipo histológico. Los carcinomas que tiene un pronóstico comparativamente más favorables (carcinoma en tumor benigno o carcinoma complejo) fueron usualmente grado 1 o 2, mientras que los carcinomas simple fueron grado 2 o 3 (Karayannopoulou *et al.*, 2005). En este mismo estudio, la sobrevida de las perras con carcinomas grado 3 fue peor de la de aquellas con tumores grado 1 o 2. En línea con lo anterior, se observó que el grado histológico está asociado al tamaño del tumor, y por ende al estadio clínico: el tamaño tumoral fue significativamente mayor en tumores de grado 3, comparado con los de grado 1. Lo mismo sucedió con el tipo histológico: todos los comedocarcinomas fueron diagnosticados de grado 3, mientras que los carcinomas simples, complejos y tipo mixto fueron en su mayoría grado 1 (Peña *et al.*, 2012). También se puede demostrar una asociación entre el grado histológico y la sobrevida total. Los animales con tumores de grado 3 presentaron un promedio de sobrevida de 7,8 meses; mientras que los tumores de grado 1 y 2 tuvieron un comportamiento similar, ambos se asociaron a sobrevidas prolongadas, de 30,3 y 33,4 meses respectivamente (Rasotto *et al.*, 2017).

- Existen nuevos marcadores pronósticos que están siendo evaluados por numerosos investigadores, tales como los receptores de estrógeno (ER), receptores de progesterona (PR), el receptor de crecimiento epidermal humano (HER-2 o Her-2/neu), ki-67, entre otros (de las Mulas *et al.*, 2003; Millanta *et al.*, 2005; Hsu *et al.*, 2009; Klopfleisch y Gruber, 2009; Kim *et al.*, 2011). En medicina humana estos biomarcadores se analizan de manera rutinaria permitiendo su clasificación molecular y así predecir su pronóstico y guiar la terapéutica (Ross *et al.*, 2003; Iqbal y Buch, 2016; Kurbel *et al.*, 2017); sin embargo, en caninos la valoración de algunos de ellos aun no es clara.

Con respecto a los receptores hormonales, la mayoría de los autores coinciden en que el aumento de la malignidad de los tumores mamarios se asocia con la pérdida de estos receptores (Millanta *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006; Morris *et al.*, 2009). Además, se evidenció que la sobrevida de los animales fue significativamente menor en aquellos casos en los que la marcación por inmunohistoquímica (IHQ) de los ER α y PR fue inferior al 10% de las células (Mainenti *et al.*, 2014). A pesar de esto, los resultados de los diversos estudios no son contundentes, por lo que aun no cuentan con aplicación clínica (Peña *et al.* 2014). Probablemente, estas diferencias

en los hallazgos se deban a que aun no existe un procedimiento estandarizado para su detección y cuantificación.

En medicina humana, la sobreexpresión del HER-2 está correlacionada con características clinicopatológicas agresivas, tales como desarrollo de metástasis, menor sobrevida, resistencia a drogas y sensibilidad a quimioterapia específica (Ross y Fletcher, 1998; Tsutsui *et al.*, 2002). En las perras se ha reportado sobreexpresión de este gen entre el 17,6 y 29,7% de neoplasias mamarias malignas (de las Mulas *et al.*, 2003; Hsu *et al.*, 2009; Ressel *et al.*, 2013), sin embargo la bibliografía es escasa y controvertida acerca de esta condición y de su valor pronóstico. Mientras que algunos autores asocian su sobreexpresión con indicadores de mal pronóstico (de las Mulas *et al.*, 2003; Gama *et al.*, 2009), otros estudios no pudieron probarlo (Kim *et al.*, 2011; Ressel *et al.*, 2013) e inclusive fue asociado a mayor sobrevida de las perras afectadas (Hsu *et al.*, 2009).

En relación al Ki67, un marcador inmunohistoquímico de proliferación celular, los autores coinciden de manera más categórica que se asocia a progresión de la enfermedad, mal pronóstico y cortos períodos de sobrevida (Nieto *et al.*, 2000; Gudan Kurilj *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2013; Araújo *et al.*, 2016) por lo que puede ser usado como un factor pronóstico independiente. Inclusive, con mayor valor que el de otros parámetros utilizados tradicionalmente, como el tamaño tumoral y el grado histológico, por lo que podría ser aplicado de manera rutinaria en la clínica (Santos *et al.*, 2013).

Las continuas investigaciones a cerca de estos y otros marcadores moleculares permitirán encontrar predictores pronósticos de utilidad clínica o, más importante aún, podrían definir blancos potenciales para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio contó con una parte retrospectiva, que ha sido llevada a cabo por la misma autora del presente trabajo en el marco de investigaciones previas; y otra prospectiva.

Estudio retrospectivo

Animales:

Fueron incluidas en este estudio 22 perras de propietarios particulares que acudieron al Hospital Escuela de Clínica de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la

UNRC durante el período marzo 2015 – junio 2016, que durante la consulta clínica presentaron masas firmes y nodulares compatibles con neoplasias mamarias en estadio I, II, III y IV . Las perras en estadio más avanzado (V) no fueron incorporadas en este estudio ya que la cirugía está contraindicada en casos con metástasis distante.

Examen clínico y pruebas complementarias:

Durante la consulta clínica, se completó una ficha donde se recaudó información en relación a la historia reproductiva y algunos factores de riesgo como administración de anticonceptivos, abortivos o eventos de pseudopreñez. También se registró el momento de aparición de la lesión tumoral, tamaño, localización y compromiso ganglionar.

A todas estas perras, se les realizó un examen físico completo y en particular, de la glándula mamaria y nódulos linfáticos regionales. A cada perra se le realizó tres radiografías de tórax, ventrodorsal, laterolateral izquierda y derecha con el objetivo de determinar metástasis y clasificarlas según el criterio de la OMS (Lana *et al.*, 2007). Aquellas perras que presentaron lesión compatible con neoplasia mamaria y ausencia de metástasis evidente, fueron sometidas a mastectomía parcial o radical según criterio del médico cirujano.

Obtención de muestras:

A cada perra se le extrajo sangre de una vena periférica (cefálica antebraquial o safena), la que se colocó en tubos con y sin EDTA para realizar los análisis de rutina prequirúrgicos. La cirugía se llevó a cabo bajo anestesia general según criterio del anestesista actuante.

Luego de la extirpación quirúrgica de las masas tumorales, se extrajeron muestras de las mismas de 1 cm x 1 cm, incluyendo los márgenes quirúrgicos. En aquellas neoplasias mayores a 5 cm se tomaron varias muestras. Los ganglios extraídos durante la cirugía también fueron recuperados para su análisis. Todos estos tejidos fueron fijados en formaldehído al 4% tamponado pH 7,2 durante al menos 48hs. (Fig. 3).

Histopatología:

Las muestras se deshidrataron con baterías de alcoholes de graduación creciente para luego ser incluidas en parafina y, mediante un micrótopo Leica® modelo Jung® 2065 Supercut se obtuvieron especímenes de aproximadamente 4 µm de espesor, que se tiñeron con hematoxilina-eosina para el estudio estructural del tejido.

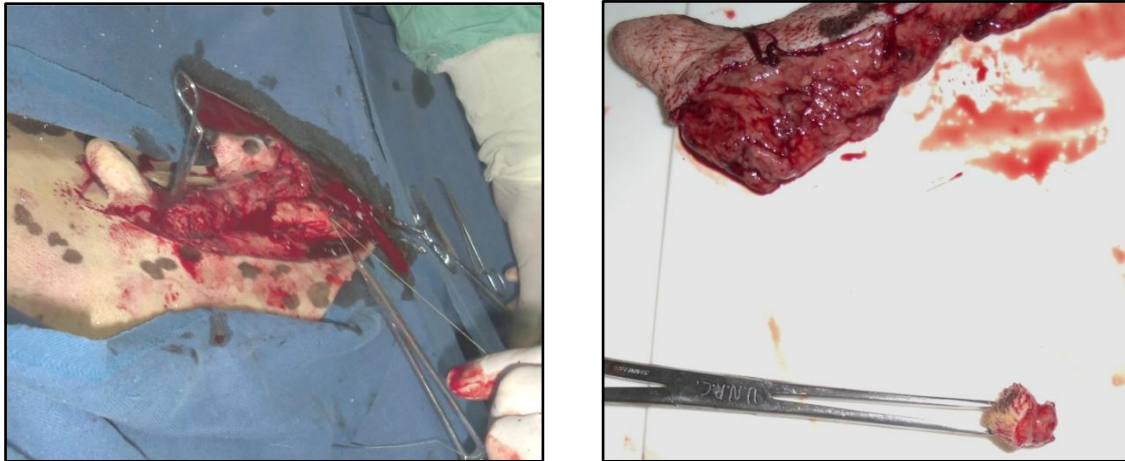


Fig. 3: Mastectomía realizada en una perra con adenoma mixto (izquierda); toma de muestra de dicha masa tumoral para su estudio histopatológico (derecha).

Los preparados se observaron con microscopía óptica a diferentes aumentos con un microscopio Zeiss Axiostar Plus. Los cortes fueron evaluados con la supervisión de un patólogo calificado del Departamento de Patología Animal (Facultad de Agronomía y Veterinaria, UNRC), y se diagnosticó el tipo histológico de acuerdo a la nueva clasificación de neoplasias mamarias caninas (Goldschmidt *et al.*, 2011).

Se obtuvieron fotografías representativas de cada tipo tumoral con una cámara Powershot G5, 5 megapixels (Canon INC, Japón) adosada al microscopio.

Seguimiento de los animales:

Las perras fueron controladas 3 meses posteriores a la cirugía y cada 3 meses mediante examen clínico general y en particular de la zona de la mastectomía, de las glándulas mamarias restantes y ganglios regionales. Además, se realizó ecografía abdominal (ecógrafo SonoEscape A6 con transductor microconvex) y radiografía de tórax laterolateral derecha, izquierda y ventrodorsal (equipo de rayos X Vetter-Rem 150Kv y 300 mA) en búsqueda de metástasis distantes.

Estudio prospectivo

El estudio se completó en forma prospectiva con la reevaluación de todos los preparados histopatológicos y se determinó el grado de malignidad expresado en 1, 2 y 3 de acuerdo al método de Peña (Clemente *et al.*, 2010).

Además, se continuó con el seguimiento clínico e imagenológico cada 3 meses (como ya se mencionó anteriormente) de cada una de las perras a fin de comprobar la

aparición de recidivas locales o metástasis distantes hasta 24 meses posquirúrgico. De este modo, se determinó el intervalo de supervivencia libre de enfermedad (SLE), que es el tiempo desde la cirugía hasta la primera recurrencia de la enfermedad en un sitio local, regional o distante y se valoró la supervivencia general (SG) que se definió como el tiempo desde la cirugía hasta la muerte del animal, sea cualquiera la causa.

Análisis estadístico:

El análisis estadístico de todos los datos obtenidos del presente trabajo se realizó con el programa estadístico InfoStat® aplicando estadística descriptiva para las variables clínicas e histopatológicas. Además, se realizaron pruebas de Chi-Cuadrado de independencia para estudiar si existía relación entre las variables categóricas linfadenopatía regional, diagnóstico histopatológico, tipo histológico, estadio clínico y grado de malignidad con la presencia o no de recidiva y la condición del animal al finalizar el estudio (supervivencia). Para el análisis de factores asociados a la SLE y la SG en cada caso se utilizaron las curvas de Kaplan-Meier.

RESULTADOS

Aspectos clínicos

Se incluyeron en este estudio 22 perras, 20 enteras y 2 castradas, a las que se les diagnosticaron clínicamente neoplasias mamarias, durante la consulta en el Hospital Escuela de la Facultad de Agronomía y Veterinaria entre marzo 2015 - junio 2016. Los animales eran 17 de razas puras (Dogo Argentino, Doberman, Ovejero Alemán, Boxer y Labrador Retriever) y 5 indefinidas, cuya edad oscilaba entre 5 y 11 años. La edad promedio para la presentación de estas neoplasias fue de 8 años para los 11 casos benignos y 9 para los 11 casos malignos. (Fig. 4).



Fig 4: Dos de las perras (izquierda, Dogo Argentino; derecha mestiza) que fueron atendidas por presentar masas compatibles con neoplasias mamarias.

Respecto a su historial reproductivo, 13 eran nulíparas y 9 habían tenido al menos 1 preñez en su vida. Del total de las perras, 11 nunca tuvieron episodios de pseudopreñez, mientras que 9 lo tuvieron al menos 1 vez en su vida y en 2 casos los propietarios no pudieron brindar esta información. Además, se indagó sobre la administración de tratamientos hormonales, ya sea como método anticonceptivo o abortivo, y solo 4 perras los habían recibido (1 de los casos benignos y 3 de los malignos).

En relación a las neoplasias, en el 50% de los casos se presentaron de forma única y en 50% múltiples; los tamaños oscilaban entre 1 y 20 cm., considerando siempre la masa de mayor tamaño, su promedio fue de 3,9 cm en los tumores benignos y de 9,45 en los malignos. Ninguna de ellas cursó con ulceraciones.

Se presentó linfadenopatía regional en 1 de las masas benignas y en 4 de las malignas, pero no se detectaron signos de metástasis en el estudio histopatológico de dichos ganglios. Por lo que, de acuerdo a estos datos y al tamaño de las neoplasias, se determinó que 1 (9%) los casos malignos se encontraba en estadio I, 2 (18%) en estadio II y 9 (73%) en estadio III (Fig. 5).

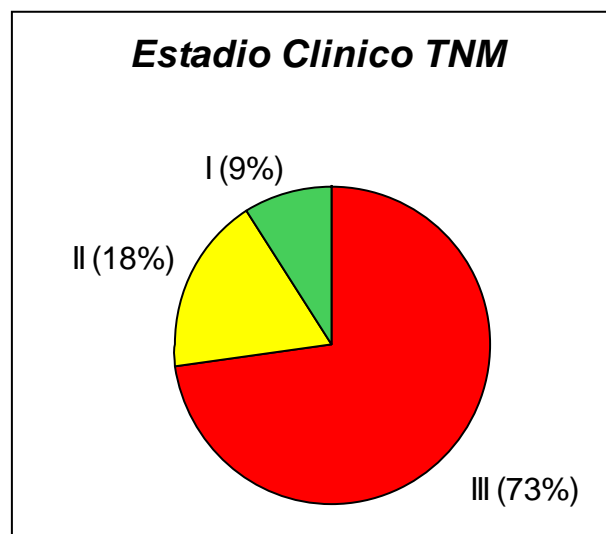


Fig. 5: Distribución de las NMC malignas de acuerdo al estadio clínico TNM.

Aspectos histopatológicos

El análisis histopatológico determinó que el 50% (11) de los tumores fueron benignos y 50% (11) malignos. En el caso de las masas benignas, se diagnosticaron las siguientes: 36,4% (4) adenomas simples, 36,4% (4) adenomas mixtos, 18,2% (2) adenoma papilar intraductal y 9% (1) adenoma papilar (Fig. 6). Las neoplasias malignas se calificaron histológicamente como: 45,3% (5) carcinomas simple (que incluyen 27,3% (3)

carcinoma tubulopapilares, 9% (1) carcinoma cistopapilar y 9% (1) carcinoma tubular); 18,2% (2) carcinomas mixtos, 18,2 % (2) carcinomas sólidos y 18,2% (2) comedocarcinomas. (Fig. 7, 8 y 10). La distribución de estas neoplasias en relación al grado histológico de malignidad fue: 9% (1) grado 1, 45,5% (5) grado 2 y 45,5% (5) grado 3 (Fig. 9).

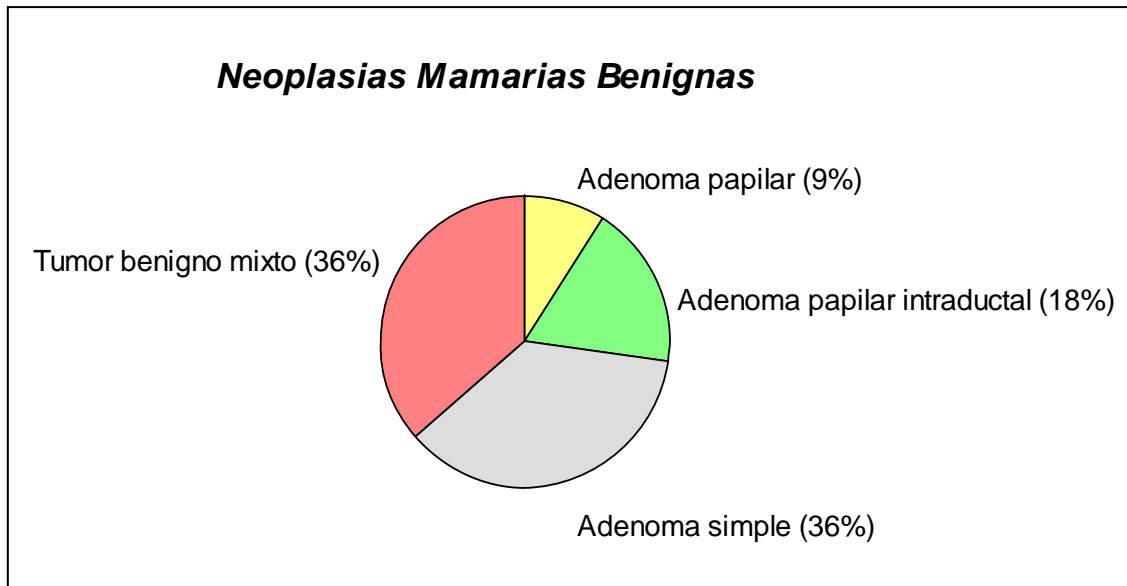


Fig. 6: Distribución de las NMC benignas de acuerdo al diagnóstico histopatológico.

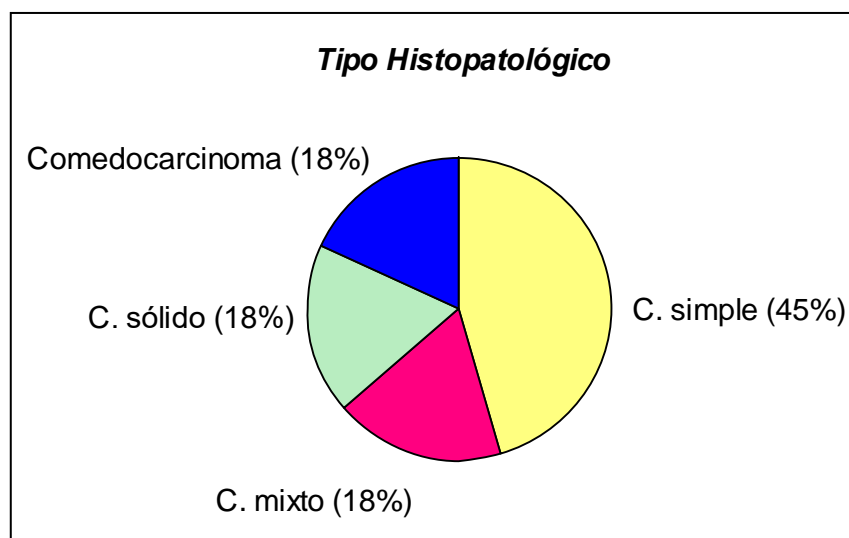


Fig. 7: Distribución de las NMC malignas según el tipo histopatológico.

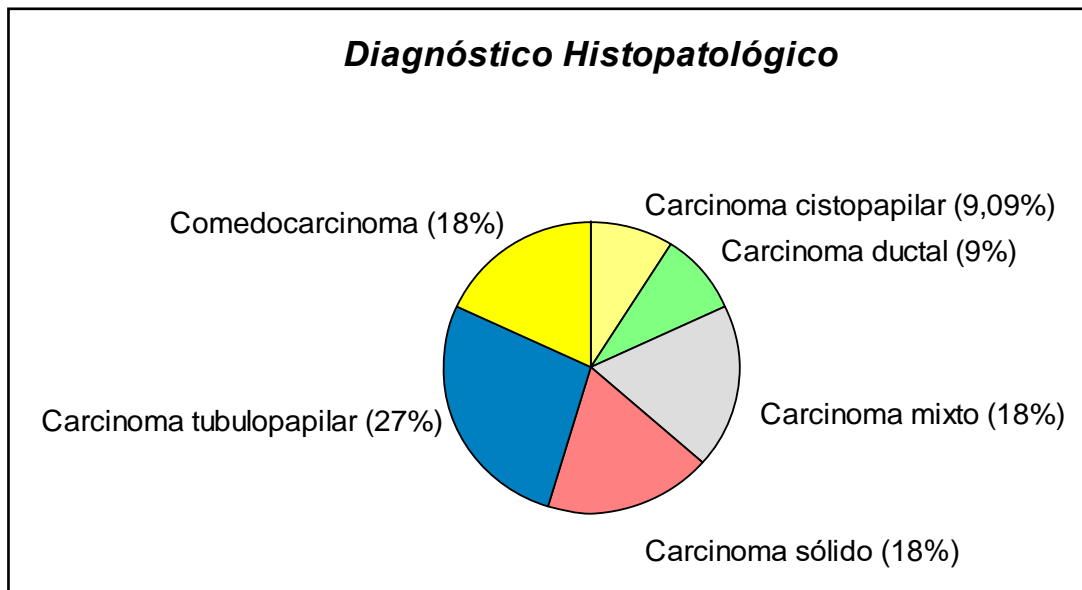


Fig. 8: Distribución de las NMC malignas de acuerdo al diagnóstico histopatológico.

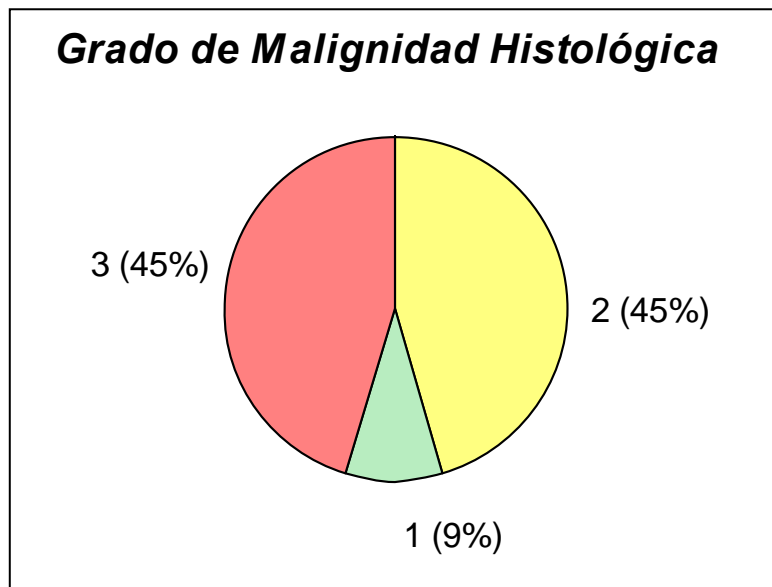


Fig. 9: Distribución de las NMC malignas según el grado histológico de malignidad.

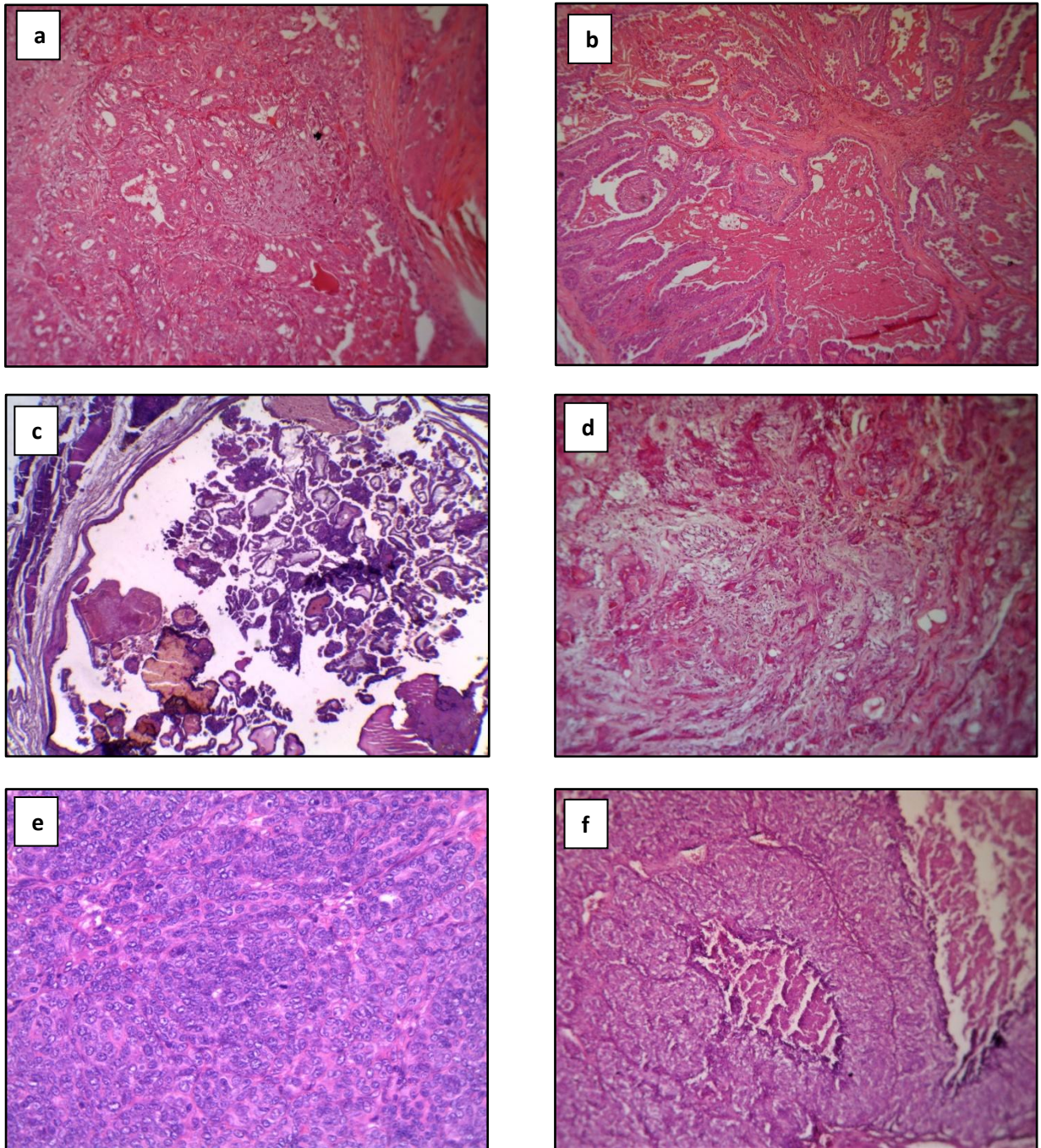


Fig. 10: a, Carcinoma simple tubular grado 2 (100x); b, Carcinoma simple tubulopapilar grado 3 (100x); c, Carcinoma simple cistopapilar grado 2 (40x); d, Carcinoma tipo mixto grado 1 (100x); e, Cacinoma sólido grado 3 (400x); f, Comedocarcinoma grado 3 (100x).

Seguimiento clínico

El seguimiento clínico llevado a cabo durante 2 años posteriores a la resección del tumor, durante el cual se realizó el examen físico, radiográfico y ecográfico reveló que 5 de los 11 casos recurrieron localmente y 6 murieron antes de finalizar el estudio, pero en ninguno se observó metástasis pulmonar ni en ganglios sublumbares o ilíacos. (Fig. 11).

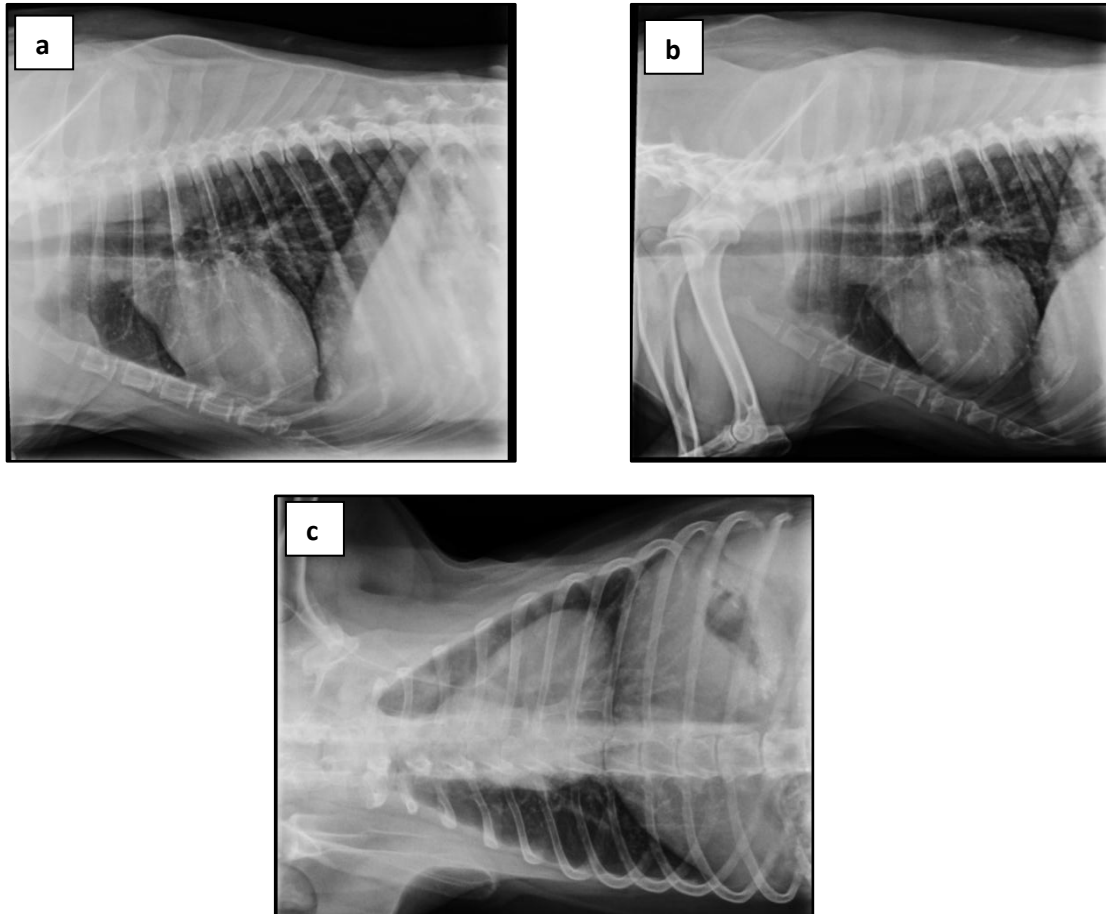


Fig.11: Radiografías de control en perra diagnosticada con carcinoma tubulopapilar grado 2, 15 meses posteriores a la mastectomía. a, proyección latero-lateral derecha; b, proyección latero-lateral izquierda; c, proyección ventrodorsal. No se observan signos radiológicos de metástasis.

El período de SLE promedio fue de 318 días y de 436 días para la SG. Los datos de cada caso están expuestos en la tabla 1.

El promedio de SLE y la SG para cada tipo histológico fue de 634 y 471 días en los carcinomas mixtos, 346 y 471 días en los carcinomas simples, 155 y 397 días en los carcinomas sólidos y 95 y 95 días en los comedocarcinomas, respectivamente.

TAMAÑO	TNM	HISTOPATOLOGÍA	Gº	SLE	SG
7	III	Carcinoma mixto	2	539	730
1	I	Carcinoma mixto	1	730	730
5	III	Carcinoma tubular	2	173	173
7	III	Carcinoma tubulopapilar	3	140	140
5	II	Carcinoma tubulopapilar	2	416	730
20	III	Carcinoma tubulopapilar	2	421	730
10	III	Carcinoma cistopapilar	2	582	582
20	III	Comedocarcinoma	3	63	63
7	III	Comedocarcinoma	3	128	128
10	III	Carcinoma sólido	3	65	65
12	III	Carcinoma sólido	3	246	730

Tabla 1. Tamaño tumoral en cm, estadio clínico TNM, diagnóstico histopatológico, grado histológico de malignidad, cantidad de días de sobrevida libre de enfermedad (SLE) y sobrevida general (SG) de cada caso de NMC malignas.

Al relacionar la SLE con el grado de malignidad, el promedio de sobrevida fue de 730 días para los grado 1; 426 días para los grado 2 y 128 días para los grado 3. De igual manera, al analizarla SG con el grado de malignidad, el promedio de sobrevida de los tumores grado 1 fue de 730 días, en los de grado 2 fue de 451 días y en los de grado 3 presentaron una SG promedio de 396 días.

Las curvas de Kaplan-Meyer para SLE y SG muestran que cuanto más agresivo es el tipo histológico y mayor el grado de malignidad, estos períodos son más breves (Fig. 12, 13, 14 y 15).

Se realizaron múltiples pruebas de Chi-Cuadrado en las cuales se pudo probar la existencia de dependencia entre la SG y el grado histológico de malignidad ($P < 0,05$). Para poder realizar este análisis se transformó la variable SG en categórica de la siguiente manera: <6 meses, sobrevida corto; entre 7 y 17 meses, sobrevida media; y >18 meses, sobrevida larga, tal como lo describe Pérez Alenza *et al.*, (1997).

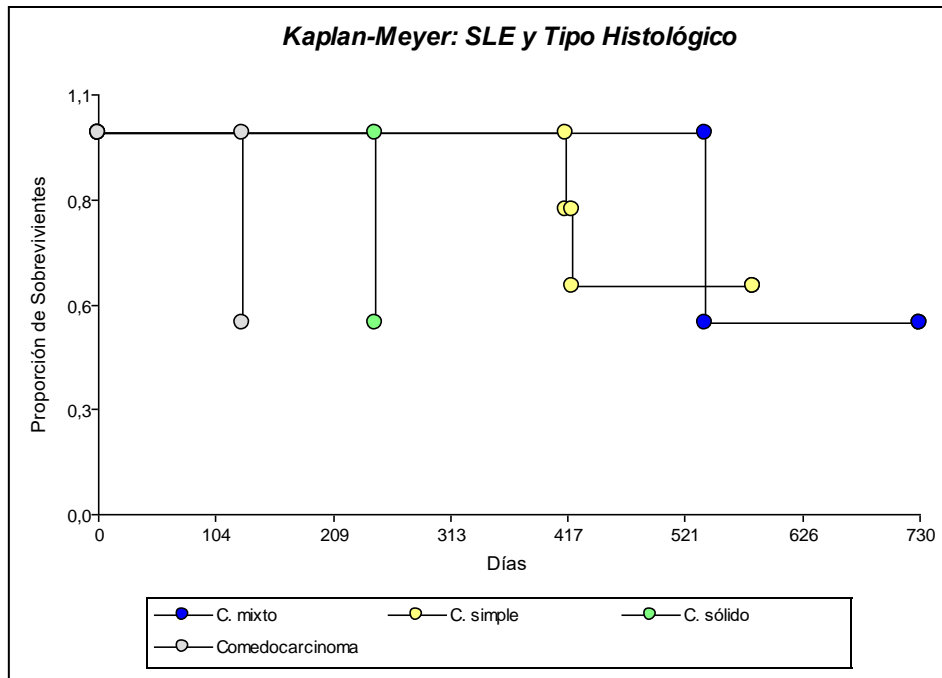


Fig. 12: Curva de sobrevida de Kaplan-Meier de las 11 perras con NMC malignas luego de 2 años de seguimiento. SLE de acuerdo al tipo histológico ($p=0,95$).

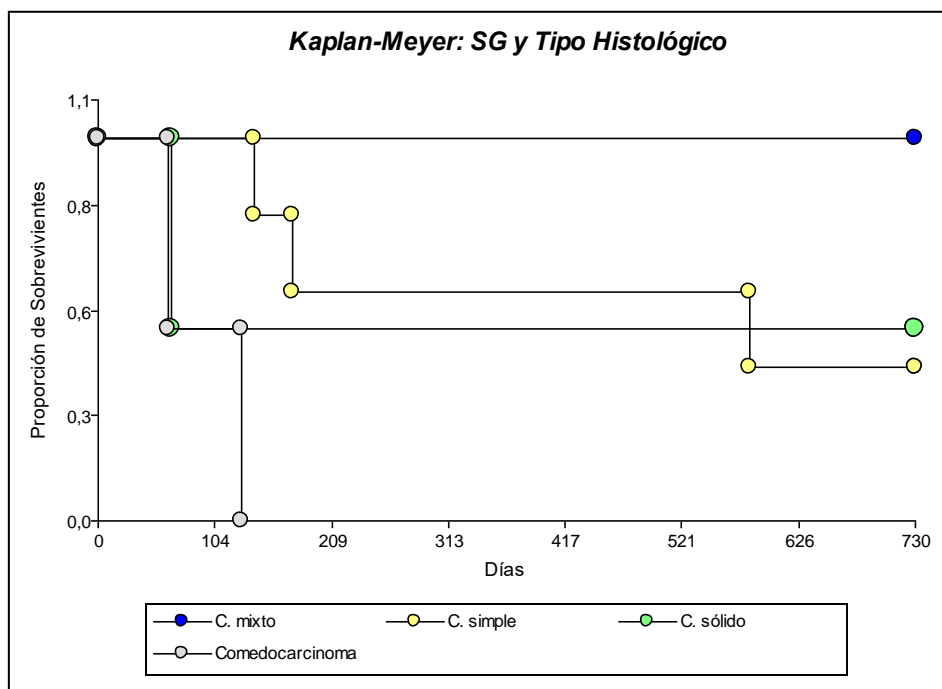


Fig. 13: Curva de sobrevida de Kaplan-Meier de las 11 perras con NMC malignas luego de 2 años de seguimiento. SG de acuerdo al tipo histológico ($p=0,04$).

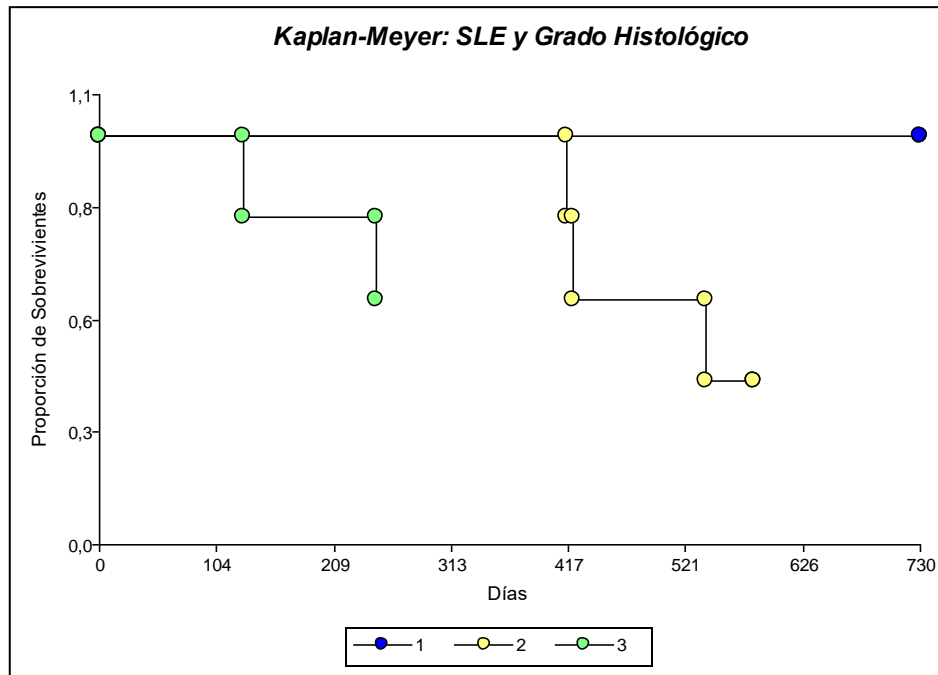


Fig. 14: Curva de sobrevida de Kaplan-Meier de las 11 perras con NMC malignas luego de 2 años de seguimiento. SLE y grado histológico de malignidad ($p=0,75$).

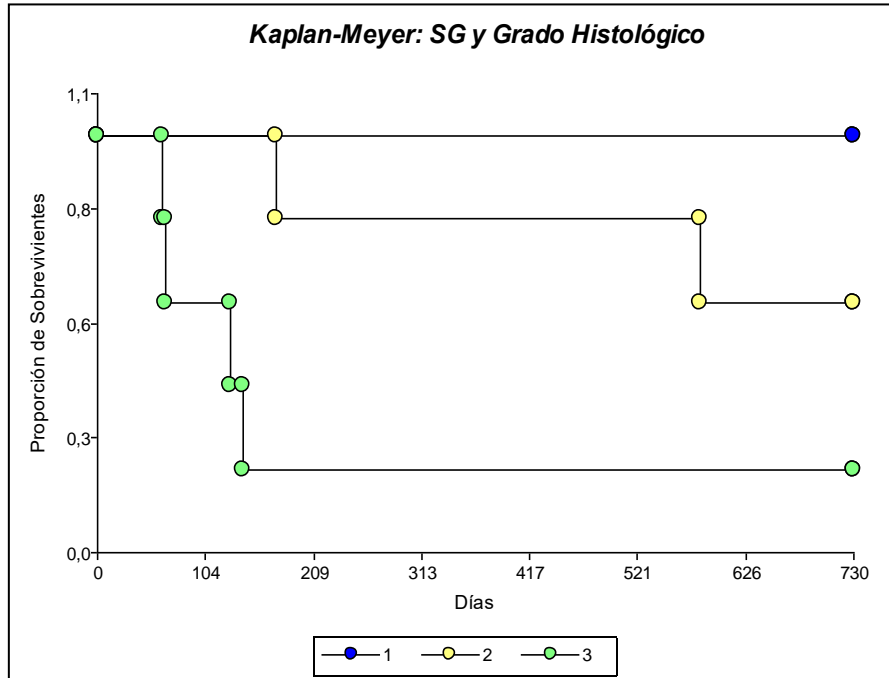


Fig. 15: Curva de sobrevida de Kaplan-Meier de las 11 perras con NMC malignas luego de 2 años de seguimiento. SG según el grado histológico de malignidad ($p=0,11$).

DISCUSIÓN

La edad promedio de presentación de las neoplasias mamarias fue de 8 años para los casos benignos y 9 para los malignos, esto está en línea con lo reportado por Sorenmo *et al.*, (2009) quienes encontraron que la edad promedio fue de 8,5 para los tumores benignos y una media de 9,5 años para los tumores malignos. En otro estudio, el hallazgo de los tumores fue a una edad levemente mayor, 8,9 años para los benignos y 10 años para los malignos (Zatloukal *et al.*, 2005). En todos los casos coincide en que las neoplasias malignas se presentan en animales algo mayores que las benignas.

Las razas puras afectadas fueron Dogo Argentino, Doberman, Ovejero Alemán, Boxer y Labrador Retriever, y 5 indefinidas; la predisposición racial no coincide totalmente con lo reportado en Argentina por Benavente *et al.*, (2013), quien menciona al Cocker Spaniel Inglés, Pekinés y Ovejero Alemán como las más frecuentemente diagnosticadas con esta enfermedad; esta diferencia estaría dada posiblemente por cuestiones de moda o tipo de razas de acuerdo a la ubicación geográfica. Si bien el número de animales es reducido, se puede observar que la mayoría corresponden a razas grandes, tal como señala Itoh *et al.*, (2005).

De acuerdo a estudios previos, alrededor del 70% de los casos se presentan como masas únicas y cerca del 30% como múltiples (Philibert *et al.*, 2003; Sorenmo *et al.*, 2009); sin embargo, en este estudio se encontró que en el 50% de las perras se diagnosticaron más de una masa tumoral. De todas maneras, este hecho no estaría relacionado al pronóstico de la enfermedad (Philibert *et al.*, 2003); como sí se la vincula a la presencia de úlceras (de las Mulas *et al.*, 2005). En ninguno de los casos de tumores malignos estudiados fueron observadas este tipo de lesiones.

En relación al tamaño tumoral, considerando siempre la de mayor tamaño cuando se presentaban masas múltiples, el promedio fue de 3,9 cm en los tumores benignos y de 9,45 en los malignos. Estos hallazgos son coincidentes con la bibliografía, que menciona que los tumores mayores a 5 cm en su mayoría son malignos (Ferreira *et al.*, 2009). Este parámetro merece una mención especial, ya que si bien está ampliamente demostrado que tiene correlación con el grado de malignidad, menor supervivencia y peor pronóstico (Chang *et al.*, 2005; de las Mulas *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2013; Dias *et al.*, 2016) en este estudio no pudo ser demostrado. Esto probablemente se deba a que la mayoría de los animales, ya sea por falta de controles de rutina, por el tipo de pelaje o por

no existir un contacto estrecho del propietario con su mascota, lleva a que se descubran las deformaciones cuando las mismas ya tienen un tamaño considerable. Tal es así, que todas las perras fueron llevadas a la consulta con masas mayores a 3 cm, y se ha comprobado que existe una diferencia muy significativa en la sobrevida de perras con tumores menores a 3 cm, no existiendo gran diferencia en los mayores a 3 cm (Philibert *et al.*, 2003). Se destaca de esta manera la importancia del diagnóstico precoz para disminuir los riesgos de metástasis, mejorar la sobrevida, y por lo tanto el pronóstico de esta enfermedad (Sorenmo *et al.*, 2009; Betz *et al.*, 2012).

La proporción de casos de acuerdo al estadio clínico fue similar a la descrita por Ferreira *et al.*, (2009) quien encontró 18.4% como T1, 20.1% como T2 y 60.5% como T3; observándose a su vez, mayor SG a menor estadio clínico, tal como lo describe Yamagami *et al.*, (1996).

El estudio histopatológico de las muestras reveló que el 50% de tumores eran benignos y 50% malignos, resultados algo diferentes a los que menciona la bibliografía en las que predominan las neoplasias malignas (Vascellari *et al.*, 2016; Rasotto *et al.*, 2017); aunque muy similar a lo descrito por Salas *et al.*, (2015), quienes, en su estudio llevado a cabo en México, analizaron más de 1900 muestras de glándula mamaria, encontrando 47,8% neoplasias benignas, 47,5% de neoplasias malignas y 4,7% de lesiones no neoplásicas. Sin embargo, en un estudio realizado en Alemania con 134 perras, predominaron las lesiones benignas (76%) en lugar de las malignas (24%) (Betz *et al.*, 2012).

El diagnóstico histopatológico se realizó en base a la nueva clasificación propuesta por Goldschmidt *et al.*, (2011), por lo que al no haber muchos estudios publicados que utilicen este criterio, el porcentaje de los diferentes tipos histológicos que menciona la bibliografía no son totalmente comparables con los hallados en esta investigación. Además, es importante considerar que las poblaciones son diferentes, con distinta proporción de hembras castradas y enteras y edades diversas, lo cual hace dificultosa la comparación.

En relación a las neoplasias benignas, las más frecuentemente halladas en este estudio fueron los adenomas simples (36,4%) y los adenomas mixtos (36,4%), similar a lo publicado por Rasotto *et al.*, (2017), quien describe 33% de cada una de ellas, y el 33% restante correspondieron a adenomas complejos. Este último tipo tumoral no fue

diagnosticado en el presente trabajo. En otro estudio (Dias *et al.*, 2016), los adenomas mixtos también fueron los más frecuentemente diagnosticados, seguido por los adenomas y fibroadenomas.

En esta investigación, el diagnóstico histopatológico de las neoplasias malignas evidenció un mayor porcentaje de carcinomas simples (45,3%), que incluyen carcinoma tubulopapilar, carcinoma cistopapilar y carcinoma tubular; esto fue similar a lo descrito por otros autores (Caicedo *et al.*, 2012; Rasotto *et al.*, 2017), pero muy diferente a lo informado en un estudio realizado en Argentina, en el que los tipos predominantes fueron los carcinomas de tipo complejo y mixto (Roscianni *et al.*, 2015). En el resto de los tumores hallados, si bien los carcinomas mixtos, sólidos y comedocarcinomas también se describieron en las publicaciones mencionadas anteriormente, no en las proporciones halladas en esta investigación.

De acuerdo al grado histológico de malignidad, predominaron las de altos índices, esto podría estar relacionado con el estadio clínico, ya que aquellos casos en estadio I, son grado 1; los en estadio II, son grado 2 o 3; y todos los estadio III, son grado 3. Esta situación difiere a lo que menciona la bibliografía (Peña *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2016; Rasotto *et al.*, 2017), probablemente debido a que en dichas investigaciones, ya sea porque son originarias de países donde las mascotas tienen controles médicos con frecuencia o porque la relación entre el propietario y su perro es más estrecha, lo que permite un diagnóstico precoz, predominan las masas menores a 3 cm. Como ya se mencionó anteriormente, el tamaño es un parámetro ampliamente vinculado al pronóstico y al grado de malignidad (Chang *et al.*, 2005; de las Mulas *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2013; Dias *et al.*, 2016). Si bien debido al número de muestras, no se pudo demostrar una diferencia estadísticamente significativa, se observó que los carcinomas simples y mixtos fueron Grado 1 o 2, mientras que los carcinomas sólidos y comedocarcinomas fueron todos grado 3, tal como lo describe la bibliografía (Peña *et al.*, 2012; Roscianni *et al.*, 2015; Dias *et al.*, 2016); lo que indica que los carcinomas simples y mixtos tienen un comportamiento más benigno que otros carcinomas.

Al finalizar el seguimiento clínico, llevado a cabo durante 2 años posteriores a la resección del tumor, el único caso que permaneció vivo y sin recurrencia de la enfermedad fue el de menor tamaño (T1), correspondiente a un carcinoma tipo mixto, que es descripto de buen pronóstico; mientras que los carcinomas sólidos y comedocarcinomas presentaron

períodos de SLE o SG más breves, tal como lo señala la bibliografía (Peña *et al.*, 2012; Rosciani *et al.*, 2015; Dias *et al.*, 2016). Este hecho quedó evidenciado de manera gráfica en las curvas de Kaplan-Meyer; aunque no se pudo demostrar una relación estadísticamente significativa, debido al tamaño de la muestra (Fig. 12 y 13), al analizar las curvas de SG, se pudo observar que el 60% de las perras con carcinomas mixtos y simples sobrevivieron más allá de los 18 meses postquirúrgicos, hallazgo similar a lo publicado por Rosciani *et al.*, (2015). Todo esto indicaría la existencia de una asociación entre el tipo histológico y el pronóstico de la enfermedad, tal como ya ha sido demostrado por otros autores anteriormente (Peña *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2016).

De manera similar, se pudo observar gráficamente (Fig. 14 y 15), aunque no es estadísticamente significativa, que existe relación entre la SLE y la SG con el grado de malignidad histológico, ya que a mayor grado se reducen dichos intervalos. Esta información se encuentra en línea con lo descrito por la bibliografía (Peña *et al.*, 2012; Rasotto *et al.*, 2017), aunque fueron algo menores a las referidas por Santos *et al.*, (2015), quien registró una SLE media de 23 meses para perras con tumores grado 1; 21 meses en perras con tumores grado 2; y 14 meses para aquellas con tumores grado 3, comparado con el presente estudio, en el cual fueron de 24, 14 y 4 meses respectivamente; y la SG media de dicho autor fue de 24 para el grado 1; 21 meses para el grado 2 y 17 meses para el grado 3; mientras que las de esta investigación fueron de 24, 15 y 13 meses respectivamente.

Se comprobó estadísticamente que hay dependencia entre la SG y el grado de malignidad ($p < 0,05$) al transformar la variable en tres períodos (sobrevida corta, media y larga) tal como aplica Pérez Alenza *et al.*, (1997), encontrando coincidencias con el autor.

CONCLUSIONES

Las neoplasias mamarias son una patología de gran importancia debido a su elevada frecuencia de presentación en la clínica diaria. Por tal motivo, es fundamental lograr un diagnóstico precoz, para realizar un correcto tratamiento y mejorar de manera radical su pronóstico.

Los resultados hallados demuestran la importancia de evaluar el tamaño de las masas de las perras con NMC malignas para el pronóstico. Además, la medición, junto al examen físico, permite realizar una correcta estadificación de la enfermedad (TNM). Esta

maniobra simple, de bajo costo y elevada reproducibilidad, es sin embargo pocas veces utilizada de manera rutinaria por los veterinarios.

Cabe destacar, que el diagnóstico temprano de las NMC con masas menores a 3 cm, mejoran de forma significativa la sobrevida luego de la mastectomía como único tratamiento. En este sentido, cobran fundamental importancia los controles periódicos en perras enteras mayores a 7 años.

El diagnóstico histopatológico de las neoplasias malignas más frecuentemente hallado fue el carcinoma simple y, de acuerdo al grado histológico de malignidad, predominaron las de altos índices, probablemente debido a los diagnósticos tardíos. Los casos que tuvieron mejor pronóstico fueron los carcinomas mixtos y simples: el 60% de las perras que presentaron este tipo tumoral sobrevivieron más allá de los 18 meses postquirúrgicos.

Si bien sería necesario ampliar este estudio con un mayor número de casos, debido a la amplia heterogeneidad de las NMC, pudo comprobarse que existe relación entre la SLE y la SG con el tipo y el grado histológico de los tumores mamarios. En esta investigación, el grado de malignidad histológico resultó más predictivo del comportamiento tumoral que el diagnóstico histopatológico.

La información del tamaño y el estadio clínico, de manera conjunta, con el diagnóstico histopatológico y el grado histológico de malignidad permitirá a los médicos clínicos veterinarios brindar información confiable a los propietarios acerca del pronóstico de su mascota, en relación a esta frecuente enfermedad.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Alcoba, A., Toledo Osorio, M., Wheeler, JT., Agüello, C. (2007). Caracterización de la Población Oncológica Canina y Felina en el Hospital de Clínica de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la UNRC durante el período 2002-2006. Publicado en poster en las XVI Jornadas Veterinarias en Pequeños Animales organizadas por Intermedica.
- Araújo, MR., Campos, LC., Damasceno, KA., Gamba, CO., Ferreira, E., Cassali, GD. (2016). HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 expression in lymph node metastasis of canine mammary carcinomas: Association with clinical-pathological parameters and overall survival. *Res. in Vet. Sci.* 106: 121–130.
- Argyle, DJ., Khanna, C. (2007). Tumor biology and metastasis. En: Withrow, SJ y Vail, DM. (Eds.) *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, 4° Ed. (pp. 31-53). St. Louis, MO, USA. Saunders Elsevier.
- Benavente, MA; Bianchi, CP; Aba, MA. (2013) Aspectos clínicos observados en perras con tumores mamarios de la provincia de Buenos Aires. Octavas Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica. Colegio de Veterinarios de la Provincia de Buenos Aires.
- Betz, D., Schoenrock, D., Mischke, R., Baumgärtner, W., Nolte, I. (2012). Postoperative treatment outcome in canine mammary tumors. Multivariate analysis of the prognostic value of pre- and postoperatively available information. *Tierärztliche Praxis Kleintiere* 4; 40(K): 235–242.
- Brodey, RS., Fidler, IJ., Howson, AE. (1966). The relationship of estrous irregularity, pseudopregnancy and pregnancy to the development of canine mammary neoplasms. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 149, 1047-1049.
- Brodey, RS., Goldschmidt, M.A., Roszel, J.R. (1983). Canine mammary gland neoplasms. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 19: 61-90.
- Caicedo, JA., Iregui, CA., Cabarcas, M., Acosta, G. (2012). Estudio comparativo de la frecuencia de tumores mamarios según sexo, edad y tipo histológico en caninos y humanos en los laboratorios de patología anatómica de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. *Rev. Colomb. Ciencia Anim.* 5: 37-46.
- Cavalcanti, MF., Cassali, GD. (2006). Fatores pronósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas - revisão. *Rev. Clin. Vet.* 11, 56-64.
- Chang, SC., Chang, CC., Chang, TJ., Wong, ML. (2005) Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998–2002). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227: 1625–1629.
- Clemente, M., Pérez Alenza, MD., Illera, JC., Peña, L. (2010). Histological, immunohistological, and ultrastructural description of vasculogenic mimicry in canine mammary cancer. *Vet. Pathol.* 47:(2) 265-274.
- de las Mulas, JM., 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 Res. Tr.* 80: 363–367.
- de las Mulas, J., Millán, Y., Dios, R.. (2005). A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor α and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the Dog. *Vet. Pathol.* 42: 200–212.
- Deng, CX., y Scott, F. (2000). Role of the tumor suppressor Brca1 in genetic stability and mammary gland tumor formation. *Oncogene* 19: 1059-1064.

- Dias, MLM., Andrade, JML., Castro, MB., Galera, PD. (2016). Survival analysis of female dogs with mammary tumors after mastectomy: epidemiological, clinical and morphological aspects. *Pesq. Vet. Bras.* 36(3):181-186. DOI: 10.1590/S0100-736X2016000300006
- Di Rienzo, JA., Casanoves, F., Balzarini, MG., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, CW. *InfoStat versión 2018*. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Dobson, JM., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K., Wood, JL. (2002). Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J. Small Anim. Pract.* 43: 240–246.
- Donnay, I., Rauis, J., Verstegen, J. (1994). Effect of hormonal history on clinical emergence of mammary tumors in the bitch - an epidemiological study. *Ann. Med. Vet.* 138: 109-177.
- Dutra, AP., Granja, NV., Schmitt, FC., Cassali, GD. (2004). "c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors." *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37(11): 1673-1681.
- Dyce, KM., Sack, WO., Wensing, CJG., Rodriguez Veiga, E., Camón Urgel, J. (1999). *Anatomía Veterinaria* (2da ed) Mexico: McGraw-Hill Interamericana.
- Egenvall, A., Bonnett, BN., Ohagen, P., Olson, P., Hedhammar, A., von Euler, H. (2005) Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Prev. Vet. Med.* 69: 109–127.
- Elston, CW., Ellis, IO. (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: 403–410.
- Espinosa de los Monteros y Zayas, A., Fernández Rodríguez, A., Herráez Thomas, P., Rodríguez Guisado, F. (2004). Piel y Anexos Cutáneos (Capítulos 18) En: Gázquez Ortiz A., Blanco Rodríguez A. *Tratado de histología Veterinaria* (pp 401-415). Barcelona, España. Masson S.A.
- 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. *Vet. Comp. Oncol.* 7(4): 230–235.
- Farreras Valenti, P. (1967) *Medicina interna. T.I.* La Habana, Instituto del Libro. p. 91.
- Gama, A., Gärtner, F., Alves, A., Schmitt, F. (2009). Immunohistochemical expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in canine mammary tissues. *Res. Vet. Sci.* 87: 432–437.
- Gobello, C. y Corrada, Y. (2001). Canine Mammary Tumors: An Endocrine Clinical Approach. *Comp. Cont. Educ. Pract.* - North American Edition 23(8):705-709.
- Goldschmidt, M., Peña, L., Rasotto, R., Zappulli, V. (2011). Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet. Pathol.* 48: 117-131.
- Gudan Kurilj, A., Hohsteter, M., Artukovic, B., Severin, K., Sostaric-Zuckermann, IC., Beck, A., Seiwerth, S., Sabocanec, R., Grabarevic, Z. (2011). Histopathological evaluation and immunohistochemical study of estrogen receptor α , HER-2 and Ki-67 in canine neoplastic mammary lesions. *Veterinarski Arhiv* 81 (6): 709-722.
- Hampe, JF, Misdorp, W. (1974) IX: tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bull World Health Organ* 50:111–133.
- Hellmén, E., Bergstrom, R., Holmberg, L., Spangberg, IB., Hansson, K., Lindgren, A. (1993). Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Vet. Pathol.* 30: 20–27.
- Hennighausen L., Robinson GW. (2001). Signaling Pathways in Mammary Gland Development. Review. *Developmental Cell*, 1: 467–475.

- Hermo, GA., Torres, P., Ripoll, GV., Scursioni, AM., Gomez, DE., Alonso, DF., Gobello, C. (2008). Perioperative desmopressin prolongs survival in surgically treated bitches with mammary gland tumours: A pilot study. *Vet. J.* 178: 103–108.
- Hsu, W-L., Huang, H-M., Liao, JW., Wong, ML., Chang, SC. (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. *Vet. J.* 180: 116–123.
- Iqbal, BM. y Buch, A. (2016). Hormone receptor (ER, PR, HER2/neu) status and proliferation index marker (Ki-67) in breast cancers: Their onco-pathological correlation, shortcomings and future trends. *Med. J. DY. Patil. Univ.* 9: 674-9.
- Itoh, T., Uchida, K., Ishikawa, K., Kushima, K., Kushima, E., Tamada, H., Moritake, T., Nakao, H., Shii, H. (2005). Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: differences between small-breed dogs and others. *J. Vet. Med. Sci.* 67(3): 345-347.
- Karayannopoulou, M., Kaldrymidou, E., Constantinidis, TC., Dessiris, A. (2001) Adjuvant Post-operative Chemotherapy in Bitches with Mammary Cancer. *J. Vet. Med. A.* 48: 85-96.
- Karayannopoulou, M., Kaldrymidou, E., Constantinidis, TC., Dessiris, A. (2005). Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *J. Comp. Pathol.* 133: 246–252.
- Karn, A., Jha, AK., Shrestha, S., Acharya, B., Poudel, S., Bhandarai, RB.(2010). Tamoxifen for breast cancer. *J. Nepal. Med. Assoc.* 49, 177: 62-67.
- Kim, JH., Im, KS., Kim, NH., Yhee, JY., Nho, WG., Sur, JH. (2011). Expression of HER-2 and nuclear localization of HER-3 protein in canine mammary tumors: Histopathological and immunohistochemical study. *Vet J.* 189 (3): 318-322. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.08.012.
- Klein, BG. (2014). *Cunningham Fisiología Veterinaria*. 5ª ed. Elsevier España, S.L. Barcelona, España.
- Klopfleisch, R., Gruber, AD. (2009). Differential expression of cell cycle regulators p21, p27 and p53 in metastasizing canine mammary adenocarcinomas versus normal mammary glands. *Res. Vet. Sci.* 87: 91–96.
- Klopfleisch, R., Gruber, AD., (2009). Increased expression of BRCA2 and RAD51 in lymph node metastases of canine mammary adenocarcinomas. *Vet. Pathol.* 46: 416–422.
- Klopfleisch, R., von Euler, H., Sarli, G., Pinho, SS., Gärtner, F., Gruber, AD. (2011). Molecular carcinogenesis of canine mammary tumors: news from an old disease. *Vet. Pathol.* 48 (1): 989-116.
- Kristiansen, VM., Nodtvedt, A., Breen, AM., Langeland, M., Teige, J., Goldschmidt, M, Jonasdottir, TJ., Grotmol, T., Sorenmo, 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. *J. Vet. Intern. Med.* 27(4): 935-942.
- Kristiansen, VM., Peña, L., Díez Córdova, L., Illera, JC., Skjerve, E., Breen, AM., Cofone MA., Langeland, M., Teige, J., Goldschmidt, M., Sorenmo, KU. (2016) Effect of Ovariohysterectomy at the Time of Tumor Removal in Dogs with Mammary Carcinomas: A Randomized Controlled Trial. *J. Vet. Intern. Med.* 30: 230–241.
- Kumaraguruparan, R., Prathiba, D., Nagini, S. (2006). Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. *Res. Vet. Sci.* 81: 218–224.
- Kurbel, S., Dmitrović, B., Marjanović, K., Vrbaneć, D., Juretić, A. (2017). Distribution of Ki-67 values within HER2 & ER/PgR expression variants of ductal breast cancers

- as a potential link between IHC features and breast cancer biology. *BMC Cancer* 17: 231. DOI 10.1186/s12885-017-3212-x
- Lana, SE, Rutteman, GR., Withrow, SJ. (2007). Tumors of the Mammary Gland. En: Withrow, SJ y Vail, DM. *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, 4° Ed. (pp. 619-636). St. Louis, MO, USA. Saunders Elsevier.
- Lee, WY., Jin, YT., Chang, TW., Lin, PW., Su, IJ. (1999). Immunolocalization of BRCA1 protein in normal breast tissue and sporadic invasive ductal carcinomas: a correlation with other biological parameters. *Histopathology* 34: 106-112.
- Lee, CH., Kweon, OK. (2002). Mutations of p53 tumor suppressor gene in spontaneous canine mammary tumors. *J. Vet. Sci.*, 3 (4): 321-325.
- Marconato, L., Lorenzo, RM., Abramo, F., Ratto, A., Zini, E. (2008) Adjuvant gemcitabine after surgical removal of aggressive malignant mammary tumours in dogs. *Vet. Comp. Oncol.* 6, (2): 90 – 101.
- 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. *Vet. J.* 202: 62–68.
- Martí, JA. (2009). Proceedings of the Southern European Veterinary Conference, Barcelona.
- Merlo, DF., Rossi, L., Pellegrino, C., Ceppi, M., Cardellino, U., Capurro, C., Ratto, A., Sam- bucco, PL., Sestito, V., Tanara, G., Bocchini, V. (2008). Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *J. Vet. Intern. Med.* 22: 976– 984.
- Meuten, DJ. (2002). *Tumors in domestic animals* 4th edition. Iowa State Press. Ames, USA.
- 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. *Res. Vet. Sci.* 79: 225–232.
- Misdorp, W., Else, R., Hellman, E. (1999). Histologic classification of mammary tumors of the dog and cat. En: *World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals*, Series 2, vol 7, no. 2. Washington DC, Armed Forces Institute of Pathology.
- Mol, J., Lantinga-van Leeuwen, I., van Garderen, E., Selman, PJ., Oosterlaken-Dijksterhuis, MA., Schalken, JA., Rijnberk, A. (1999). Mammary growth hormone and tumorigenesis-lesions from the dog. *Vet Quarterly.* 21: 111-115.
- Moore. AS. y Ogilvie, GK. (2008). Neoplasia Mamaria. En: Ogilvie GK. y Moore AS. *Manejo del paciente canino oncológico. Guía práctica para la atención compasiva.* (pp. 675-689) Avellaneda, Buenos Aires, Argentina. Ed. Inter-Médica.
- Morris, JS., Dobson, JM., Bostock, DE., O'farrell, E. (1998) Effect of ovariohysterectomy in bitches with mammary neoplasms. *Vet. Rec.* 142: 656-658.
- Morris, JS., Nixon, C., King, OJA., Morgan, IM., Philbey, AW. (2009). Expression of TopBP1 in canine mammary neoplasia in relation to histological type, Ki67, ER α and p53. *Vet J.* 179: 422-429.
- Moulton, J.E. (1990). Tumors of the mammary gland En: Moulton JE. (Ed.) *Tumours in Domestic Animals*, 3rd eds. (pp. 518-552). Berkeley, University of California Press
- Nieto, A., Peña, L., Pérez Alenza, MD., Sánchez, MA., Flores, JM., Castaño, M. (2000). Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet. Pathol* 37: 239-247.

- Nieto, A., Pérez Alenza, MD., Del Castillo, N., Tabanera, E., Castaño, M., Peña, L. (2003). BRCA1 expression in canine mammary dysplasias and tumours: relationship with prognostic variables. *J. Comp. Pathol.* 128(4): 260-268.
- Owen, LN. (1980). TNM classification of tumours in domestic animals, Geneva, World Health Organization.
- Patsikas, MN., Karayannopoulou, M., Kaldrymidoy, E., Papazoglou, LG., Papadopoulou, PL., Tzegas, SI., Tziris, NE., Kaitzis, DG., Dimitriadis, AS., Dessiris, AK. (2006). The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: a lymphographic study. *Anat. Histol. Embryol.* 35, 228–234. doi: 10.1111/j.1439-0264.2005.00664.x
- Peña, L., De Andrés, PJ., Clemente, M., Cuesta, P., Pérez Alenza, MD. (2012). Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. *Vet. Pathol.* 50 (1):94-105.
- Peña, L., Gama, A., Goldschmidt, MH., Abadie, J., Benazzi, C., Castagnaro, M., Díez, L., Gärtner, F., Hellmén, E., Kiupel, M., Millán, Y., Miller, MA., Nguyen, F., Poli, A., Sarli, G., Zappulli, V., de las Mulas, MJ. (2014). Canine Mammary Tumors: A Review and Consensus of Standard Guidelines on Epithelial and Myoepithelial Phenotype Markers, HER2, and Hormone Receptor Assessment Using Immunohistochemistry. *Vet. Pathol.* 51(1): 127-145.
- Pereira, CT., Rahal, SC., de Carvalho Balieiro, JC., Ribeiro, AA. (2003). Lymphatic drainage on healthy and neoplastic mammary glands in female dogs: can it really be altered? *Anat Histol Embryol* 32: 282–290.
- Pérez Alenza, D., Peña, L., Nieto, A., Castaño, M. (1997). Clinical and pathological prognostic factors in canine mammary tumors. *Ann 1st. Super. Sanitá*, 33 (4): 581-585.
- Pérez Alenza, D., Rutteman, GR., Pena, L. (1998). Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. *J Vet Intern Med* 12: 132–139.
- Philibert, JC., Snyder, PW., Glickman, N., Glickman, LT., Knapp, DW., Waters, DJ. (2003). Influence of Host Factors on Survival in Dogs with Malignant Mammary Gland Tumors. *J. Vet. Intern. Med.* 17:102–106.
- Rasotto, R., Zappulli, V., Castagnaro, M., Goldschmidt, MH. (2012). A Retrospective Study of Those Histopathologic Parameters Predictive of Invasion of the Lymphatic System by Canine Mammary Carcinomas. *Vet. Pathol.* 49(2): 330-340.
- Rasotto, R., Berlato, D., Goldschmidt, MH., Zappulli, V. (2017) Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes: An Observational Cohort Study of 229 Cases. *Vet. Pathol.* 54(4): 571-578.
- Redondo, E., Schleef, N., Maffrand, C., Alcoba, A., Bagnis, G. (2011) *Histopathological diagnosis frequency of neoplasms in companion animals*. Jornada; Segunda Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina. San Juan.
- Ressel, L., Puleio, R., Ruggero, Loria, G., 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. *Res. Vet. Sci.* 94: 299–305.
- Rivera, P., von Euler, H., (2011). Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors. *Vet. Pathol.* 48: 132–146.
- Rosciani, AS., Merlo, WA., Insfrán, RM., Rodríguez, YN. (2015). Tumores mamaros caninos. *Rev. Vet.* 26 (2): 99-102.
- Ross, JS. y Fletcher, JA. (1998). The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *Stem Cells* 16 :413-428.

- Ross, JS. y Fletcher, JA. (1999). HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* 112: 53-67.
- Ross, JS., Fletcher, JA., Linette, GP., Stec, J., Clark, E., Ayers, M., Frasers Symmans, W., Puzstal, L., Bloom, KJ. (2003). The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *The Oncologist* 8: 307-325.
- Rutteman, GR., Foekens, JA., Blankstein, MA., Vos, JH, Misdorp, W. (1990). EGF receptors in non affected and tumorous dog mammary tissues. *Eur. J. Cancer.* 26: 182-186.
- Rutteman, GR. (1992). Contraceptive steroids and the mammary gland: Is there a hazard? Insights from animal studies. *Breast Cancer Res. Treat.* 23(1-2): 29-41.
- Salas, Y., Márquez, A., Diaz, D., Romero, L. (2015) Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem. *PLoS ONE* 10(5): e0127381. doi:10.1371/journal.pone.0127381.
- Santos, AA., Lopes, CC., Ribeiro, JR., Martins, LR., Santos, JC., Amorim, IF., Gärtner, F., Matos, AJ. (2013). Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. *Vet. Res.* 9:1.
- Schneider, R., Dorn, CR., Taylor, DON. (1969). Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J. Natl. Cancer Inst.* 43: 1249-1261.
- Schneider, R. (1970). Comparison of age, sex and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer* 26: 419-426.
- Simon, D., Schoenrock, D., Baumgärtner, W., Nolte, I. (2006) Postoperative adjuvant treatment of invasive malignant mammary gland tumors in dogs with doxorubicin and docetaxel. *J. Vet. Intern. Med.* 20: 1184–1190.
- Sonnenschein, EG., Glickman, T., Goldschmidt, MH., McKee, LJ. (1991) Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study. *Am. J. Epidemiol.* 133: 694-703.
- Sorenmo, KU., Shofer, FS., Goldschmidt, MH. (2000). Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. *J. Vet. Intern. Med.* 14: 266–270.
- Sorenmo, K., (2003). Canine mammary gland tumors. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 33: 573–596.
- Sorenmo, KU., Kristiansen, VM., Cofone, MA., Shofer, FS., Breen, AM., Langeland, M., Mongil, CM., Grondahl, AM., Teige, J., Goldschmidt, MH. (2009). Canine mammary gland tumors; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Vet. Comp. Oncol.* 7: 162–172.
- Sorenmo, KU., Rasotto, R., Zappulli, V., Goldschmidt, MH. (2011). Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms. *Vet. Pathol.* 48(1): 85-97.
- Tavares, WLF., Lavalle, GE., Figueiredo, MS., Souza, AGH., Bertagnolli AC., Viana, FAB., Paes, PRO., Carneiro, RA., Cavalcanti, GAO, Melo, MM., Cassali, GD. (2010). Evaluation of adverse effects in tamoxifen exposed healthy female dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52-67.
- Tobias, KM. Matectomía. (2011). En: Tobias KM. *Manual de Cirugía de Tejidos Blandos en Pequeños Animales*. 1° Ed. (pp 49-57). Bs. As. Argentina. Intermédica.
- Tsutsui, S., Ohno, S., Murakami, S., Hachitanda, Y., Oda, S. (2002). Prognostic value of c-erbB2 expression in breast cancer. *J. Surg. Oncol.*; 79(4): 216-23.

- 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 Vet. Res.* 5, 39.
- Vascellari, M., Capello, K., Carminato, A., Zanardello, C., Baioni, E., Mutinelli, F. (2016). Incidence of mammary tumors in the canine population living in the Veneto region (Northeastern Italy): Risk factors and similarities to human breast cancer. *Preventive Veterinary Medicine* 126: 183–189.
- Withrow, S.J.(2007). Why worry about cancer in pets? En: Withrow, SJ y Vail, DM. *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, 4° Ed. (p. xv). St. Louis, MO, USA. Saunders Elsevier.
- Yamagami, T., Kobayashi, T., Takahashi, K. (1996). Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. *J. Vet. Med. Sci.* 58: 1079–1083.
- Yang, X. y Lippman, ME. (1999). BRCA1 and BRCA2 in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 54: 1-10.
- Yang, WY., Liu, CH., Chang, CJ., Lee, CC., Chang, KJ., Lin, CT. (2006). Proliferative activity, apoptosis and expression of oestrogen receptor and Bcl-2 onco- protein in canine mammary gland tumours. *J. Comp. Pathol.* 134: 70–79.
- Zatloukal, J., Lorenzová, J., Tichy, F., Necas, A., Kecová, H., Kohout, P. (2005). Breed and age as risk factors for canine mammary tumours. *Acta Vet. Brno.* 74: 103-109.