



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

”CARCINOMAS MAMARIOS DE CANINOS: INFLUENCIA DE VARIABLES
HISTOLÓGICAS E INMUNOHISTOQUÍMICAS EN EL PRONÓSTICO”

Méd. Vet. DIESSLER, Mónica Elizabeth

DIRECTOR

Prof. Dr. IDIART, Julio Roberto

CODIRECTORA

Prof. Dra. CASTELLANO, María Cecilia

LUGAR DE TRABAJO

Cátedra de Patología Especial. FCV. UNLP.

MIEMBROS DEL JURADO:

Prof. Dr. BARBEITO, Claudio Gustavo

Prof. Dr. GIMENO, Eduardo Juan

Prof. Dr. MARTÍN, Carlos Alberto

2009

Dedico este trabajo

a Gabriel

a Valeria y Damián

a mi Amor

a la memoria de mis padres

a la memoria del Ing Zoot Fernando N Dulout



Gracias:

a mis Directores los Dres. Profesor Julio Roberto Idiart y Profesora María Cecilia Castellano por su guía, ánimo, disposición y respaldo. Por la pertinencia de sus consejos, aportes y sugerencias.

a todo el personal que lleva adelante el servicio de Patología, que hizo posible la financiación de este trabajo

a los Méd. Vet. Norberto López, Alicia del Amo, Mirian Allende, Carlos Catrambone y Marcelo Piella que colaboraron con la protocolización y seguimiento de los casos clínicos

al Dr. Profesor Enrique L. Portiansky, por brindarme generosamente sus conocimientos y su tiempo. Por enseñarme y permitirme disponer del equipamiento y software necesarios para el análisis de gran parte de los resultados

a la Cátedra de Histología y Embriología por brindarme el tiempo, espacio y equipo necesarios para llevar adelante la redacción del manuscrito

a mis muy queridos compañeros de las Cátedras de Patología Especial y de Histología y Embriología. Todos ellos me enseñan, toleran y acompañan fraternalmente hace años. A Pablo Piñeyro Piñeiro y Javier Cappuccio, en particular, por su ayuda con el análisis de los datos

*a mis amigos, algunos ya aludidos o mencionados, que han soportado mis angustias.
Gracias por su cariñoso aliento y comprensión*

al personal del Proyecto de Enlace de Bibliotecas (PrEBi) de la UNLP, en la persona de Carlos Nusch, por su entusiasta colaboración

a los Dres Julio De Luca y Pilar Peral García por comenzar a mostrarme la actividad del investigador y compartirla conmigo desde momentos muy tempranos de mi carrera de grado.

Agradezco especialmente a mi familia, que es mi sostén, por su colaboración y tolerancia, particularmente a Gabriel, ya que la mayor parte de este trabajo fue realizado en tiempo que debió ser suyo.

Finalmente, a mi Maestro: ¡MUCHAS GRACIAS!

Citas bibliográficas correspondientes a las publicaciones parciales del trabajo de tesis

Publicación en revistas

** De trabajo completo*

Diessler ME, Idiart JR, Portiansky EL. **“Metástasis y angiogénesis en carcinomas mamarios invasivos de perras diagnosticados entre 1980 y 2003. Estudios histológico e inmunohistoquímico”**. *Analecta Veterinaria*, 27 (1):5-10, 2007

** De resumen*

Diessler ME, Portiansky EL, Castellano MC, Idiart JR. **“Canine mammary carcinomas: VEGFR-2 expression and microvessel density correlation. Eventual influence in metastasis development”**. *Ciencias Morfológicas*, 10 (2), 2008. En prensa.

Publicación en actas de Congresos

** De trabajos completos*

-Allende MG, del Amo AN, Castellano MC, Idiart JR, Diessler ME, Bonzo EB, Massone AR, Quiroga MA, Machuca MA, Risso MA. **“Análisis Estadístico de Tumores Mamarios en Perras a través de una Perspectiva Bayesiana”**
Presentado en el “VI Congreso Internacional de las Ciencias Veterinarias”. Palacio de Convenciones de La Habana, La Habana, Cuba, 10-13 de abril 2007.

** De resúmenes*

-Diessler ME, Portiansky EL, Idiart JR. **“Metástasis y angiogénesis en carcinomas mamarios en perras. Estudio histológico e inmunohistoquímico”**. Presentado en la Quinta Reunión Argentina de Patología Veterinaria (V RAPAVE). Facultad de Ciencias Veterinarias. UNL. Esperanza, Argentina, 1 al 3 de junio de 2006.

-Diessler M.E, Idiart J.R, Castellano M.C, Gimeno E.J, Portiansky E.L. **“Proliferación en tumores mamarios invasivos de caninos: compromiso de VEGFR-2 en la señalización autocrina”**. Presentado en el XIII Encontro Nacional de Patología Veterinária e II Simposio Brasileiro da C.L. Davis Foundation, Campo Grande, Brasil, 14-19 julio 2007.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	PÁGINA
RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN	4
-Conceptos sobre biología tumoral	
- <i>Carcinogénesis</i>	5
- <i>Crecimiento</i>	8
- <i>Transformación maligna</i>	13
- <i>Invasión y metástasis</i>	14
- <i>Abastecimiento sanguíneo de las neoplasias primarias y secundarias</i>	22
-Conceptos sobre desarrollo y anatomía mamaria.....	38
-Incidencia del cáncer. Neoplasias mamarias en distintas especies.....	41
-Neoplasias mamarias en los caninos: generalidades.....	44
-Clasificaciones de las neoplasias mamarias.....	50
-Marcadores tumorales y pronóstico	
- <i>Antecedentes en la medicina humana y valor pronóstico en caninos</i>	53
- <i>Consideraciones acerca de algunas variables pronósticas</i>	
Sistema TNM.....	56
Tamaño.....	57
Estado del linfonódulo.....	58
Tipo histológico.....	61
Grado histológico.....	64
Proliferación celular.....	66
Invasión tumoral a los vasos.....	71
Abastecimiento sanguíneo.....	72
-Agentes antiangiogénicos: su utilización terapéutica.....	78
HIPÓTESIS MÁS RELEVANTES	81

OBJETIVOS	81
------------------	-----------

	PÁGINA
MATERIALES Y MÉTODOS	

1. Criterios de inclusión de los casos en grupos I y II.....	82
2. Estudios retrospectivos en material de archivo	
<i>A. De la masa tumoral</i>	
A. 1. Estudios histopatológicos.....	82
A. 2. Estudios inmunohistoquímicos.....	83
<i>B. De los linfonódulos</i>	
B. 1. Estudios histopatológicos.....	86
B. 2. Estudios inmunohistoquímicos.....	86
3. Estudios en nuevos casos	
<i>A. Pacientes. Su selección y seguimiento.....</i>	87
<i>B. Estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos de las neoformaciones y los linfonódulos.....</i>	88
4. Métodos de análisis estadístico de los datos obtenidos.....	88

RESULTADOS	91
-------------------	-----------

- Características histopatológicas de las neoformaciones.....	101
Estudios inmunohistoquímicos	
<i>Proliferación celular.....</i>	106
<i>Angiogénesis.....</i>	107
- Muestras de linfonódulos	
Estudios histopatológico e inmunohistoquímico.....	109
- Comparaciones de parámetros histopatológicos e inmunohistoquímicos entre sí.....	111
- Características generales del grupo II.....	129
- Relación de las características estudiadas con el tiempo de supervivencia.....	135

DISCUSIÓN	143
------------------	------------

CONCLUSIONES	160
BIBLIOGRAFÍA	162
ANEXO	193

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Los términos en plural que se consignen mediante abreviaturas y símbolos llevarán una “s” final (en este apartado se definen en singular). Aquellos que corresponden a términos en idiomas distintos del español se consignan en cursiva.

2D-PAGE: electroforesis en dos dimensiones en geles de poliacrilamida.

(+): positivo.

(-): negativo.

-/- : ausencia de ambos alelos de un gen, en células o individuos noqueados para ese gen.

A

AAF : aspiración con aguja fina.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AE1/AE3: anticuerpo de amplio espectro anticitoqueratinas.

AgNOR: región organizadora nucleolar afin por la plata.

AJCC: Comité Americano sobre Cáncer.

AM: adrenomedulina.

AMT: área microvascular total.

AMR: área microvascular relativa.

ANM: área nuclear media.

APC: adenomatosis poliposa colónica.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

ATP: adenosina 5'-trifosfato.

B

Bax: proteína pro-apoptótica de la familia de *Bcl-2*.

Bcl: proteínas del linfoma de células B, familia de proteínas antiapoptóticas.

bFGF: factor de crecimiento de fibroblastos básico.

BMI-1: represor transcripcional involucrado en la regulación de la proliferación de células madres.

BMP: proteína morfogenética del hueso

BRCA-1: gen asociado a la susceptibilidad para cáncer de mama y ovario.

BrdU: bromodesoxiuridina.

BT: brote terminal.

C

c-erbB-2: protooncogen del *erbB-2* (origen del oncogen: virus de eritroblastosis aviar).

c-fos: protooncogen del *fos* (origen del oncogen: virus de osteosarcoma murino).

c-myc: protooncogen del *myc* (origen del oncogen: virus de *myelocitomatosis*).

c-ras: protooncogen del *ras* (origen del oncogen: virus del sarcoma de la rata).

c-src: protooncogen del *src* (origen del oncogen: virus del sarcoma de Rous).

Ca⁺⁺: ión calcio.

CA-125: glicoproteína del epitelio celómico ovárico durante el desarrollo embrionario.

caPCNA: *PCNA* acídica.

CC: carcinoma complejo.

CCE: carcinoma de células escamosas.

CCR7: receptor 7 de quimioquinas.

Cdk: quinasa dependiente de ciclinas.

CD: *cluster* de diferenciación.

CE: célula endotelial.

CEA: antígeno carcinoembrionario.

CPE: célula progenitora endotelial.

CRHL: Laboratorio Colaborativo Radiológico de Salud.

Cs: carcinoma simple.

CS: carcinosarcoma.

CXCR4: receptor 4 de quimioquinas.

D

DAB: 3,3' diaminobencidina.

DE: desvío estándar de las medias.

DMV: densidad de microvasos.

DOI: densidad óptica integrada.

DOI/mm²: densidad óptica integrada/mm².

DOI/IM: densidad óptica integrada/ máxima intensidad de marcación.

E

ECM: matriz extracelular.

EE.UU.: Estados Unidos de América.

EGF: factor de crecimiento epidérmico.

EMA: antígeno epitelial de membrana.

Erk: quinasa regulada por señales extracelulares.

EN: émbolo neoplásico.

F

Fak: quinasa de adhesión focal.

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos.

Fig.: figura.

Flk-1: quinasa del hígado fetal, homólogo murino del *VEGFR-2*.

Flt (1, 4): tirosinquinasa tipo *fms*, equivalente a *VEGFR-1*.

G

G_0 : *gap 0*, fase del ciclo celular.

G_1 : *gap 1*, fase del ciclo celular.

GF: factor de crecimiento.

GFR: receptor para un factor de crecimiento.

GH: grado histológico.

H

H-E: hematoxilina y eosina.

H_0 : hipótesis nula.

HER-2: receptor del *EGF*, equivalente a *c-erbB-2*.

HGF: factor de crecimiento del hepatocito.

HIF (1 α , 1 β , 2): factor de transcripción inducido por hipoxia.

HQ: histoquímica.

HRE: elementos de respuesta a la hipoxia.

I

IA: índice de apoptosis.

IAM: índice de actividad mitótica.

IGF: factor de crecimiento similar a la insulina.

IHQ: inmunohistoquímica/o.

IP: índice de proliferación.

ISH: hibridación *in situ*.

IVS: invasión a vasos sanguíneos.

J

JNK/SAPK: cinasa c-jun n-terminal/proteinquinasa asociada a estrés.

K

kDa: kilodaltones.

KDR: receptor con dominio de inserción de quinasa, equivalente a *VEGFR-2*.

L

LN: linfonódulo.

LN+ (RH): linfonódulo positivo (con metástasis) luego de la revisión histopatológica.

LN+ (IHQ): linfonódulo positivo mediante IHQ.

LSAB- HRP: sistema de detección estreptavidina biotina con peroxidasa de rábano picante.

LYVE-1: receptor de hialuronano presente en los endotelios de los vasos linfáticos.

M

mab: anticuerpo monoclonal.

MAPK: proteinquinasa activada por mitógenos.

microARN: pequeña secuencia de ARN (no codificante).

MMO: micrometástasis ocultas.

MMP: metaloproteínasa de la matriz.

MMTV: virus del tumor mamario del ratón.

MnSOD: enzima superóxidodismutasa dependiente de manganeso.

N

N₁...: como término en el TNM, estado del LN.

nib: pequeña molécula inhibidora de receptores de tipo tirosinquinasa.

nmPCNA: *PCNA* de células mamarias normales.

NOR: región organizadora del nucleolo

Notch: gen cuyo producto está involucrado en la transducción de señales durante el desarrollo, determinando rutas específicas.

O

O₂: oxígeno.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

ON: óxido nítrico.

oncomir: microARN involucrado en la regulación de genes relacionados con el cáncer.

OR: *odds ratio*, razón de probabilidad.

P

p: probabilidad.

p53, p21, p16, p27: proteínas de 53, 21, 16, 27 kDa.

PAMP: proadrenomedulina.

PAR: receptor asociado a proteasas.

PBS: solución de *buffer* fosfato.

PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PET: tomografía por emisión de positrones.

pH: concentración de iones hidronio, medida de acidez o basicidad.

pI: punto isoeléctrico.

PI3K: quinasa de fosfatidilinositol.

PKM2: piruvato quinasa M2, enzima involucrada en la glicólisis.

PIGF: factor de crecimiento placentario.

pN_{1..3}: estado del linfonódulo determinado durante el estudio anatomopatológico.

PSA: antígeno soluble prostático.

PTEN: gen supresor tumoral homólogo de fosfatasa y tensina.

pTNM: estadificación anatomopatológica según sistema TNM.

px: píxeles.

R

Rb: retinoblastoma.

RE: receptor de estrógenos.

RER: retículo endoplasmático rugoso.

RGB: color real de una imagen digital (rojo, verde, azul).

RN: relacionada con la neoplasia (muerte RN).

ROS: especies reactivas del oxígeno.

RP: receptor de progesterona.

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

S

S/P: sin particularidades.

S: fase S, de replicación del ADN.

SA: supervivencia alta.

SB: supervivencia baja.

SM: supervivencia media.

SOD: enzima superóxidodismutasa.

sp: especificidad.

ss: sensibilidad.

SV: supervivencia.

I

T₁...: como término del sistema TNM, tamaño de la neoformación.

TCOT: teoría del campo de la organización tisular.

TEM: transición epitelial-mesenquimática.

TGF- β : factor de crecimiento transformante β .

TH: tipo histológico.

TIMP: inhibidor tisular de MMP.

TK: enzima tirosinquinasa.

TM: tumor mamario.

TME: transición mesenquimática-epitelial.

TMS: teoría de la mutación somática.

TNM: tumor-nódulo-metástasis.

TPA: antígeno oncofetal que deriva de proteínas citoesqueléticas.

TrKB: receptor para neurotrofinas, de tipo tirosinquinasa.

TTPA: activador tisular del plasminógeno.

U

UICC: Unión Internacional Contra el Cáncer.

UEA-1: aglutinina 1 de *Ulex europaeus*, lectina.

uPA: activador de plasminógeno tipo pro-uroquinasa.

V

VCAM: moléculas de adhesión celular vascular.

VEGF: factor de crecimiento de células endoteliales.

VEGFR: receptor para el factor de crecimiento de células endoteliales.

VPF: factor de permeabilidad vascular.

vWf: factor de von Willebrand.

W

Wnt: familia de inductores morfógenos (contracción de dos miembros de la familia: *wingless* e *Int*).

X

χ^2 : chi cuadrado.

Z

Zn^{++} : ión zinc.

CARCINOMAS MAMARIOS DE CANINOS: INFLUENCIA DE VARIABLES HISTOLÓGICAS E INMUNOHISTOQUÍMICAS EN EL PRONÓSTICO

Palabras clave: caninos – carcinomas mamarios – angiogénesis – proliferación – pronóstico

Resumen

Se estudiaron 136 carcinomas mamarios de perras y sus linfonódulos satélites. Se evaluaron la proliferación celular (mediante la marcación inmunohistoquímica del antígeno nuclear de proliferación celular) y la actividad angiogénica (mediante la inmunomarcación del receptor para el factor de crecimiento de endotelios vasculares 2 -*VEGFR-2*- y el recuento de microvasos). Se relacionaron ambos procesos y su repercusión en el estado del linfonódulo. Se estableció la asociación entre estas características y el tipo y grado histológicos, y la presencia de émbolos neoplásicos en los vasos tumorales. Para determinar su significación en el pronóstico, estos parámetros se relacionaron con el estado del linfonódulo (merced a la observación de cortes procesados mediante la técnica histopatológica de rutina y a la marcación inmunohistoquímica de citoqueratinas) y con la supervivencia de un grupo de pacientes.

Los tipos histológicos pudieron clasificarse en dos grupos teniendo en cuenta su comportamiento proliferativo, angiogénico e invasivo: uno constituido por carcinomas complejos, simples tubulares y de células escamosas, y el otro por carcinomas simples papilares, sólidos y anaplásicos y carcinosarcomas. A menor diferenciación histológica correspondieron mayores actividades proliferativa, invasiva y angiogénica. Con respecto a esta última, en neoplasias con mayor expresión del *VEGFR-2*, la densidad de microvasos y la proliferación fueron mayores. La mayor densidad de vasos favorece la invasión vascular. La presencia de émbolos, el grado histológico, el índice de proliferación, la expresión del *VEGFR-2* y la densidad de microvasos permitieron predecir la capacidad metastásica. El tipo histológico no se relacionó con la supervivencia de manera independiente. Los

carcinosarcomas y los carcinomas simples anaplásicos presentaron mayor riesgo de metástasis que los carcinomas simples tubulares, complejos y de células escamosas. La probabilidad de supervivencia a 18 meses fue alta y estuvo influenciada por el estado del linfonódulo y la presencia de émbolos neoplásicos.

CANINE MAMMARY CARCINOMAS: INFLUENCE OF HISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL FEATURES ON PROGNOSIS

Key words: canine – mammary carcinoma – angiogenesis – proliferation – prognosis

Summary

One hundred and thirty six canine mammary carcinomas and their satellite lymph nodes were studied. Proliferation and angiogenic activities were evaluated by means of immunohistochemical procedures. For the former, proliferating cell nuclear antigen was labelled. Vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) expression and microvessel density were measured to estimate angiogenesis. Both processes were related and their influence on the status of the lymph nodes was investigated. An association was established between these characteristics and the histological type and grade, and the presence of neoplastic cells within tumor vessels. In order to determine their prognostic significance, these parameters were related to the lymph node status (defined after histopathological and immunohistochemical studies with anticytokeratin antibodies) and survival of a group of patients.

According to their proliferative, angiogenic, and invasive behavior, histological types could be classified into two groups: one comprising complex, simple tubular, and squamous cell carcinomas, and the other comprising simple papillary, solid, and anaplastic carcinomas, and carcinosarcomas. A lower histological differentiation corresponded to higher proliferative,

invasive, and angiogenic activities. Tumors with higher expression of VEGFR-2 exhibited more density of microvessels and higher proliferation rates. Vascular density favored vascular invasion. Metastatic potential could be predicted according to the presence of emboli, histological grade, proliferation index, expression of VEGFR-2, and density of microvessels. Independent correlation between histological type and survival was not found. Carcinosarcomas and simple anaplastic carcinomas presented a higher risk of metastasis than simple tubular, complex, or squamous cell carcinomas. Probability of survival at 18 months was high and was influenced by the status of the lymph node and the presence of neoplastic emboli.

INTRODUCCIÓN

Según Virchow, los tejidos de nueva formación, o neoplasmas, se desarrollaban en el organismo de manera similar a los procesos fisiológicos, "...siguiendo las leyes que presiden el desarrollo del embrión...". "Toda especie de neoplasia tiene por punto de partida elementos celulares preexistentes a los que reemplaza" (1). Así, la carcinogénesis es un fenómeno patológico, pero que implica la ejecución de procesos conocidos en células propias. La alteración reside, fundamentalmente, en la regulación de esos procesos.

El crecimiento neoplásico es excesivo y relativamente autónomo. El mayor volumen que el tejido adquiere le ha valido la denominación de tumor, término que se aplicaba antiguamente a la tumefacción inflamatoria. El sentido no neoplásico de "tumor" constituye un arcaísmo, de manera que esta palabra se utiliza con connotación equivalente a la de "neoplasia".

"Cáncer" es la forma habitual de designar a todos los tumores malignos.

* * *

Los desórdenes propios de la carcinogénesis y la progresión del tumor constituyen un campo de conocimiento ampliamente estudiado en medicina humana y, en mucha menor medida, en medicina veterinaria. Su investigación en los caninos puede aportar conocimientos acerca de la patogenia y de los patrones de comportamiento de las neoplasias en esta especie, de particular utilidad para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento.

Conceptos sobre biología tumoral

Carcinogénesis

Como planteó Theodor Boveri en 1914, un problema importante en el estudio de la carcinogénesis es que es imposible identificar una neoplasia en el organismo *in statu nascendi*. Por lo tanto, los investigadores postulan narraciones hipotéticas con respecto a lo que debió haber ocurrido en la transición de la normalidad al cáncer (2).

Existieron diferentes teorías acerca de la carcinogénesis, algunas se centraron en el nivel celular y consideraron al cáncer como un problema de proliferación o de diferenciación celular. Otros lo localizaron a nivel tisular, como un problema relacionado con la histogénesis. Las alteraciones cromosómicas y mutaciones somáticas observadas en neoplasias avanzadas se consideraron la causa. Algunos interpretaron estas alteraciones como epifenómenos y consideraron la carcinogénesis como un proceso epigenético, ampliando el campo más allá de la molécula del ácido desoxirribonucleico (ADN), pero restringiéndolo, de todas maneras, al medio intracelular (2,3). Estas teorías coexistieron durante el siglo XX. Los avances metodológicos en biología molecular a partir de la década del 50', y el descubrimiento de los oncogenes dos décadas después, inclinaron la balanza hacia la aceptación de la teoría de la mutación somática (TMS) como la doctrina prevalente acerca del origen de los tumores. Se trata de una postura de reduccionismo genético, en la que la explicación de los fenómenos se da en el nivel de los genes o sus productos. La premisa principal de la TMS es que el cáncer deriva de una célula que ha acumulado mutaciones múltiples del ADN a lo largo del tiempo, por lo que los tumores serían monoclonales. Una segunda premisa es que el estado de las células por defecto (entendido como el estado en que las células se encontrarían en ausencia de control) es la quiescencia. Una tercera premisa es que el cáncer es una alteración en la proliferación (2).

Según la TMS, el daño genético producido por carcinógenos es azaroso y, aunque muchas mutaciones pueden no tener consecuencias, puede desarrollarse una neoplasia al ocurrir mutaciones no letales para una célula en una pequeña parte del genoma, en caso que se trate de genes críticos como los de protooncogenes (*c-ras*, *c-myc*, *c-erbB*, entre otros) o los genes supresores tumorales (p53, proteína del retinoblastoma -Rb-). En la actualidad, se han

identificado más de 100 oncogenes y de 15 genes supresores tumorales. Los oncogenes retrovirales o su contraparte celular, los protooncogenes, codifican proteínas que actúan como factores de crecimiento, sus receptores, transductores de señales intracelulares, factores de transcripción y ciclinas, que regulan procesos celulares como la proliferación, diferenciación y muerte (4,5).

La concepción de la TMS solo ofrece una explicación parcial del fenómeno del cáncer. Se la critica porque bajo ese paradigma los fenómenos orgánicos fueron reducidos a fenómenos celulares y moleculares, las neoplasias a células transformadas y la carcinogénesis a la proliferación aumentada de células en una placa. La verificación del potencial tumorigénico de las células transformadas fue realizada, ocasionalmente, inyectando millones de células en el tejido subcutáneo de animales singénicos o ratones “desnudos” inmunodeficientes (2). Tiempo después, algunos experimentos pusieron en evidencia ciertas inconsistencias, tales como el fenómeno de la normalización de las células cancerígenas (6). Se observó que células de teratocarcinoma inyectadas en embriones tempranos (en estadio de blastocisto) generaron tejidos y órganos normales. Por lo tanto células embrionarias que habían originado neoplasias, al encontrarse en tejidos adultos, revirtieron a la normalidad en embriones tempranos (7).

Estos experimentos demostraron la reversibilidad del fenotipo neoplásico y contradicen la teoría que afirma que el cáncer es causado por mutaciones de ADN, ya que algunas células tumorales pudieron ser normalizadas. Por lo tanto, se invalidó el *dictum* “una vez que es una célula cancerosa, será siempre una célula cancerosa”.

Si bien la TMS sigue siendo prevalente, no es la única teoría respecto del origen tumoral. Algunos grupos de trabajo han generado datos que, de manera explícita o implícita, desplazaron el énfasis de la investigación de los blancos intracelulares a las interacciones entre las células epiteliales y del estroma y su matriz (3). Existe un programa de investigación alternativo enmarcado en la denominada “teoría del campo de la organización tisular” (TCOT) que se centra en las premisas que afirman que la carcinogénesis representa un problema de organización tisular, y que el estado celular por defecto es la proliferación. Se trata de una

postura “organicista” que considera el análisis de diferentes niveles de organización sin saltar del genotipo al fenotipo. Propone que un organismo es un sistema abierto en el que, desde el comienzo del desarrollo ontogénico, los procesos ocurren en las células o en las poblaciones celulares debido a la inducción por parte de sus células o grupos celulares vecinos. Los resultados de la investigación de la patogenia del cáncer de colon relacionados con el gen de la adenomatosis poliposa colónica (APC), por ejemplo, más que avanzar en sentido del control del ciclo celular o de la proliferación, se centran en la relación de la célula afectada con sus vecinas, tema de la competencia de la TCOT (2).

Carcinogénesis en la glándula mamaria. No hay consenso acerca de si la iniciación y la promoción del cáncer de mama siguen un modelo de múltiples pasos como el aceptado para el cáncer de colon (8). Las primeras alteraciones genéticas podrían ocurrir en las células madres expuestas a agentes carcinogénicos por largos períodos, seguida por otras alteraciones en las células ya determinadas (9,10). La iniciación tumoral resultaría de la desregulación de la auto-renovación de estas células, en la que intervienen vías como *Notch*, *Wnt* y *BMI-1*, entre otras (9). El balance entre divisiones asimétricas y simétricas de las células madres (que mantienen o expanden, respectivamente, el número de células madres) está involucrado en la carcinogénesis y en su regulación intervienen proteínas como p53. Como en otras neoplasias, existe evidencia de la existencia de células madres tumorales en cáncer de mama (9).

Un individuo puede presentar predisposición hereditaria para el cáncer si, por ejemplo, ocurrieron mutaciones de tipo germinal (en las células sexuales de sus padres) que afectaron a uno de los alelos de genes supresores tumorales. En humanos se estima que entre el 5 y el 10 % de las pacientes con tumores mamarios tenían predisposición hereditaria para esta enfermedad (4). Los factores de riesgo genético para cáncer de mama familiar lo constituyen, principalmente, las mutaciones de los genes *BRCA-1* y *2*. La mutación de otros genes también se ha asociado con aparición temprana de cáncer de mama (síndrome de Li Fraumeni por

mutación del gen de p53, enfermedad de Cowden -mutación del *PTEN*- y ataxia-teleangiectasia por mutación del gen homónimo) (11).

Recientes estudios identificaron polimorfismos en nucleótidos individuales en 5 *loci* asociados a susceptibilidad para cáncer de mama, que involucran genes o bloques de genes relacionados con receptores de tipo tirosinquinasa (*TK*) y quinasas de proteínas activadas por mitógenos (*MAPK*) (12).

Crecimiento

Generalmente, cuando una neoplasia es detectada la mayor parte de su crecimiento se ha completado. Un objetivo del estudio de la biología tumoral es la comprensión de los factores que gobiernan el crecimiento de la masa tumoral y el uso de esa información para su detección temprana o la supresión de su crecimiento. Guiot y su grupo de trabajo sostienen que en las neoplasias se observan las mismas curvas exponenciales de crecimiento universales con respecto al crecimiento ontogénico, tanto de mamíferos como de otras clases de animales (13). Se considera, sin embargo, que solo el crecimiento inicial de una neoplasia es exponencial. Luego, una menor proporción de células entran al *pool* replicativo y se incrementa la muerte celular. De no ser así, luego de 10 duplicaciones de cada célula de una masa detectable de 1 g, se originaría una masa celular de 1 kg, lo que resulta incompatible con la vida (4,5).

La tasa de crecimiento depende de tres factores: la tasa de mitosis de las células individuales, la proporción de células en el *pool* de replicación y la tasa de muerte celular o de diferenciación a un estadio posmitótico. No todas las neoplasias presentan una alta tasa de replicación y este parámetro no siempre es indicativo de anaplasia ni de grado de malignidad. Por ejemplo, la tasa de replicación de poblaciones normales como las de las criptas intestinales es muy alta, en tanto que algunas neoplasias con alto índice mitótico (como el tumor venéreo transmisible de los caninos) tienen un buen pronóstico en la mayoría de los casos.

Las células con insuficiente aporte de oxígeno suelen permanecer en la fase G₀ del ciclo hasta que éste se encuentre disponible al establecerse una nueva red vascular. Finalmente, la tasa de crecimiento tumoral está determinada por el balance entre división celular y pérdida de células. Este crecimiento no es regular sino que pueden ocurrir súbitos picos de crecimiento luego de periodos de aparente latencia. Esto ocurre cuando ciertos subclones de células con mayor habilidad replicativa emergen de la población neoplásica general (5).

Proliferación celular en poblaciones normales y neoplásicas

“La célula debe dividirse cuando se necesitan células nuevas de ese tipo y evitar dividirse cuando no es necesario; debe vivir tanto tiempo como sea apropiado y autodestruirse cuando se requiera su muerte; debe mantener su especialización y ocupar el lugar que le corresponde, sin extraviarse en territorios ajenos a su naturaleza.”

“La más importante de las enfermedades asociadas con anomalías en la renovación tisular es el cáncer” (14).

La biología de la proliferación celular y del crecimiento es bastante similar entre células normales y neoplásicas. Lo que caracteriza a estas últimas es su desregulación (5).

Se entiende por proliferación celular al incremento de la cantidad de células que resulta del cumplimiento del ciclo celular. El paso a través de las cuatro fases del ciclo está regulado por la acción coordinada de quinasas y proteasas (14). Desde principios del siglo XX se sabe que estos procesos no dependen enteramente del programa intrínseco, sino que involucran eventos de comunicación célula-célula y célula-matriz. Por lo tanto, se ve influenciado por un

gran número de factores solubles (hormonas y factores de crecimiento, entre otros) además de componentes de la matriz extracelular (*ECM*) (15,16).

Si se asume que el estado de defecto celular es la quiescencia, entonces la regla es que las células normales de los mamíferos sólo se multiplican (o “prolifera”) si este proceso es estimulado por señales (14, 17, 18).

Las sustancias que estimulan la proliferación celular se denominan, en general, mitógenos. Muchos son también factores de crecimiento (*GFs*), esto es, activan vías que determinan la acumulación de proteínas y otras macromoléculas de manera de asegurar que la célula conserve un tamaño apropiado (14).

Luego de su interacción con una variedad de receptores *TK*, los *GFs* desencadenan una cascada que involucra proteínas G acopladas a receptores y diferentes vías de señalización. Esa serie de acontecimientos conduce al desbloqueo de la transición de la fase G_1 a la fase S del ciclo celular (14). Los eventos dependientes de *GFs* necesarios para completar un ciclo ocurren antes del punto R, que consiste en la fosforilación de la proteína Rb, mediante la regulación de la activación de las quinasas dependientes de ciclinas (*CdKs*) de G_1 . Consecuentemente, el potencial mitogénico de los *GFs* es inherente a su capacidad de promover la fosforilación de la proteína Rb, lo que resulta en la liberación de factores de transcripción de la familia E2F. Esto conduce a la expresión de genes de fase S, como las ciclinas G_1/S y S. Horas después de la estimulación comienza a ejecutarse el programa del ciclo celular. No obstante, la temprana aparición de señales es insuficiente para la progresión del ciclo y deben existir estímulos adicionales que los *GFs* realizan en momentos más tardíos (14, 18).

Los efectos de los *GFs* no se logran únicamente por la ruta clásica (estimulación de receptores de superficie) sino que, para la transformación celular, puede ser necesaria la presencia de *GFs* tanto en el medio extracelular como en el citosol. Luego de la unión ligando-receptor por la vía habitual, el proceso de transducción de señales estaría limitado debido a la

internalización, degradación o regulación hacia abajo del receptor, o a la aparición de enzimas capaces de antagonizar la señal (17).

Las células malignas, por el contrario, tienen una mayor autonomía con respecto a las señales de crecimiento (si bien son sensibles en distinto grado a los estímulos del medio), a señales inhibitoras y estimuladoras, y pueden ser capaces de evadir la apoptosis (16). Además de generar sus propias señales de crecimiento, pueden inducir la estimulación de otras células por mecanismos paracrinos, como las endoteliales, originando neovascularización en el microambiente local (19). Esta liberación relativa de la dependencia de señales exógenas desmantela un mecanismo homeostático de importancia crítica que normalmente opera para asegurar un comportamiento celular apropiado. Las células no sólo sintetizan, sino que también son estimuladas por *GFs* mitogénicos. Bajo circunstancias normales, esta vía de comunicación autocrina también ocurre, por ejemplo, para amplificar una respuesta, pero es estrechamente controlada por programas internos y estímulos externos (16). Entre los *GFs*, la importancia del factor de crecimiento de endotelios vasculares (*VEGF*) para la multiplicación celular se puso en evidencia al observar que las células noqueadas para el gen del *VEGF* (*VEGF*^{-/-}) tienen un potencial replicativo limitado y se acumulan en las fases G₁/G₀ del ciclo celular (18, 20).

Si los receptores son activados de manera constitutiva (independiente de ligando, como en la activación del protooncogen *c-ras*) entonces la sobreestimulación puede originar una poderosa señal de transformación. Es posible también que ocurra una unión prematura de los *GFs* con los receptores presentes en la cara luminal de la membrana del retículo endoplasmático rugoso (RER) y del complejo de Golgi. La producción aberrante de *GFs* por las células transformadas promueve la estimulación autocrina y la vascularización, de manera que se extienden los límites del medio ambiente permisivo para la progresión tumoral (17).

En la oncología moderna, la cinética celular es un campo de gran interés, pero el control de la división celular es solo una parte del problema. En el otro platillo de la balanza operan mecanismos de control que determinan si una célula sobrevive o se suicida (14).

El desarrollo de neoplasias involucra la acumulación aberrante de células anormales causada por excesiva proliferación, insuficiente apoptosis y/o desregulación de la diferenciación celular (16). El cociente entre el compartimiento proliferativo y las células totales se denomina fracción de crecimiento o índice de proliferación (IP), que indica una activa multiplicación celular. Los inhibidores naturales de la proliferación y migración podrían estar involucrados en la latencia tumoral (21).

Si bien en tejidos neoplásicos se esperaría obtener el índice de apoptosis (IA) disminuido y el IP aumentado, esto no es lo que ocurre frecuentemente. En 2001, Bai y sus colaboradores realizaron un estudio de tejidos mamarios siguiendo el modelo de un continuo “epitelio normal-hiperplásico-neoplásico benigno-neoplásico maligno” e informaron un acelerado recambio celular creciente a lo largo de continuo. Ambos índices (IA e IP) fueron significativamente mayores en alvéolos mamarios hiperplásicos que en normales. Los carcinomas *in situ* mostraron un comportamiento cinético similar al tejido hiperplásico. Se observó correlación positiva entre ambos índices, si bien en carcinomas invasivos el aumento del IP es aun mayor que el del IA (8). En carcinomas mamarios agresivos, con menor supervivencia de las pacientes, se encontraron altos IA, como así también en sus recidivas y metástasis (22).

En aquellas neoplasias en las que no se pudo constatar regulación negativa de las vías apoptóticas es posible especular con que hubiese inhibición de otros tipos de muerte. Entre ellas se ha descrito una vía de muerte celular no apoptótica, llamada entosis, en cultivos de células mamarias epiteliales que se han separado de la *ECM*. Durante la entosis, una célula invade a otra y es degradada en lisosomas por vías diferentes de las de la fagocitosis. La muerte celular por entosis podría ser un mecanismo de supresión tumoral. *In vivo*, se han descrito neoplasias con características citológicas de canibalismo (como, por ejemplo, células de carcinomas mamarios obtenidas a partir de efusiones pleurales) pero los mecanismos involucrados y su significado siguen siendo motivo de controversia (23).

Transformación maligna

Debido a los cambios genéticos y epigenéticos ocurridos, el fenotipo celular se transforma. El proceso mediante el cual la célula adquiere el fenotipo de una célula maligna se denomina transformación o conversión maligna. En el momento del diagnóstico las células ya son heterogéneas. Algunos de estos cambios son letales, mientras que otros les confieren ventajas inherentes al crecimiento. Algunos de los clones que se generan son localmente más agresivos, o tienen mayor probabilidad de generar metástasis o resistir ciertas drogas, otros tienen diferente expresión antigénica (4, 5).

Hanahan y Weinberg en su artículo "*The hallmarks of cancer*" enumeran y describen seis alteraciones principales en la fisiología celular de las células transformadas que consideran los sellos distintivos de ese acontecimiento. Ellas son: autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitorias, evasión de apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida e invasión y metástasis (16).

En función de sus nuevos productos (productos de secreción, receptores y otras glicoproteínas de membrana, entre otros) algunas de estas células adquieren características deletéreas para el huésped como, en el caso de los epitelios transformados, la capacidad de desorganizar la lámina basal, sobrevivir en tejidos conectivos de manera aislada o en grupos, evadiendo la *anoikis*¹, degradar la *ECM*, sobrevivir en medios hipóxicos (al inducir la expresión de genes de supervivencia por niveles constitutivamente elevados del factor de transcripción 1α inducido por hipoxia -*HIF1* α -, por ejemplo) y proseguir con el fenómeno metastásico.

Algunos cambios son morfológicos, con microscopía óptica se observan cambios en el tamaño y en la forma de las células y sus núcleos, con modificación en la organización de la cromatina (variación espacial que conlleva trastornos en la expresión génica) y en la cantidad, tamaño y forma del/los nucleolo/s (con consecuentes trastornos en la actividad transcripcional)

¹ Se entiende por *anoikis* la muerte celular por apoptosis debida a la pérdida de contacto de las células con la *ECM* (por pérdida de señales de supervivencia dependientes de integrinas). El término es un grecismo que alude a la "condición de sin hogar", en los textos en inglés se presenta como equivalente a "*homelessness*". Esta capacidad se atribuye a la mayor expresión del receptor para neurotrofinas TrkB, que de manera indirecta produce bloqueo de las caspasas (24).

(25). El análisis de las características morfológicas nucleares como el área nuclear media (ANM) puede ser de utilidad en caninos para detectar neoplasias individuales con más alto potencial metastásico (26).

Otros cambios son metabólicos, como el efecto Warburg (por Otto Warburg, su descubridor) que consiste en un alto consumo de glucosa por parte de las células tumorales con producción de ácido láctico, debido a la expresión en células tumorales de una de las formas de piruvato quinasa, la *PKM2*. El aumento de captación de glucosa por las células tumorales es el fundamento de la tomografía por emisión de positrones (*PET*), de rutina en el diagnóstico oncológico en medicina humana. La adaptación al pH 6 propio del ambiente tumoral es un ejemplo de la modulación recíproca de las células y del medio ambiente (25).

Invasión y metástasis

Una vez que ocurrió la transformación neoplásica se produce un desequilibrio patológico, de manera que en la zona de contacto entre células tumorales y normales se crea un microsistema invasor por interacción y cooperación entre células tumorales y células normales del mismo y otros tejidos (unidad estroma-tumor) (27,28). Un subclon inicialmente invasivo, y eventualmente metastásico, puede aparecer dentro del tumor. Dentro de esta población heterogénea y genéticamente inestable, ocurriría una selección darwiniana a favor de las células que tuviesen atributos que les facilitaran el crecimiento, la supervivencia y la adaptación a otros entornos. La invasión, entendida como la migración a través de una matriz obstructiva, ocurre en una zona focalizada. Un mecanismo propuesto para explicar la migración de células de carcinomas mamarios durante la infiltración local y la intravasación es la llamada transición epitelial-mesenquimática (TEM), que consiste, entre otros cambios, en la pérdida de características epiteliales como la adhesión celular, y en el cambio a la expresión de vimentina como principal filamento intermedio. Su “reversión”, la transición mesenquimática-epitelial (TME), ocurriría al establecerse como tumor secundario en otro órgano. Ambas transiciones, en sentido estricto, aluden a los cambios en la forma y

comportamiento migratorio y recuerdan la migración a larga distancia durante el desarrollo embrionario (29). Está descrita la expresión de reguladores negativos de la transcripción de E-cadherina durante la TEM. Las investigaciones en este sentido allanaron el camino para el descubrimiento significativo de que la pérdida de heterocigocidad para el gen de la E-cadherina es un evento crítico en el 85 % de las pacientes con cáncer de mama lobulillar. La modulación de la expresión de E-cadherina precede la invasión y su rol no se limita a la adhesión sino que influye en otros procesos como la proliferación y la diferenciación celular (mediante la forma libre de la β -catenina) (28, 30). La dinámica de organización de los microfilamentos del citoesqueleto (que tiene como consecuencia los cambios de forma y la emisión de podosomas o “invadopodios”) está mediada por integrinas. Se ha demostrado que el producto del gen Goosecoide, el mayor “orquestador” del movimiento durante la gastrulación, activa propiedades como la movilidad de las células tumorales y promueve el desarrollo de metástasis (31).

Aunque los principales tipos de proteasas (de serina, aspartato, cisteína, treonina y metaloproteinasas) están involucrados en los procesos de invasión y metástasis, durante la última década el mayor énfasis se ha puesto en el rol de las metaloproteinasas de la matriz (*MMP*). Los miembros de la familia de las *MMPs* tienen como característica común la capacidad de degradar por lo menos un componente de la lámina basal y se dividen en grupos en función de su sustrato. Actúan a pH fisiológico, requieren de dos átomos de Zn^{++} para su activación, son inhibidas por quelantes e inhibidores tisulares y son secretadas como zimógenos que requieren activación extracelular (32).

Durante la transición de carcinomas *in situ* a infiltrativos ocurre un cambio en la expresión génica que genera, entre otras actividades celulares, la secreción y exposición en la membrana plasmática de proteasas que remodelan la lámina basal. Luego, las células son capaces de migrar a través de la *ECM*. Este proceso no consiste meramente en cavar un túnel en la *ECM*, sino que también implica su reorganización. Ella posibilita diferentes interacciones célula-célula y célula-matriz, y la vinculación de la actividad proteolítica extracelular con la

transducción de señales mediada, entre otros, por los receptores activados por proteasas (*PARs*) que funcionan como “sensores” de la actividad proteolítica del medio (33, 34).

Algunos tejidos conectivos especializados, como el cartílago hialino, son menos susceptibles a la invasión ya que en su matriz abundan los inhibidores de proteasas (5). Se ha postulado que, paralelamente a la degradación de *ECM*, las células tumorales inducen la formación de un estroma ricamente vascularizado que luego invaden. En las neoplasias más agresivas ocurriría mayor respuesta estromal (35).

Según Cotran el término “metástasis” se refiere a los implantes tumorales que no guardan continuidad con el tumor primario (4). La metástasis es un proceso complejo e ineficiente. Alrededor de 10^6 células por gramo de tumor se liberan por día y sólo un 0,01% es capaz de completar el proceso (5). Se trata de una cascada de eventos que comienza con la invasión del entorno (antes descrita) sumada a la supervivencia en el sistema circulatorio, al establecimiento en la microvasculatura del órgano blanco y a la supervivencia y la proliferación en este nuevo medio. Este proceso se reanuda al liberarse nuevas células para formar metástasis adicionales (36).

En el mercado existen micromatrices para detectar la expresión de más de 100 genes relacionados con la habilidad metastática de las neoplasias, cuyos productos están involucrados principalmente con la adhesión celular, el crecimiento y proliferación y la apoptosis. A los genes cuyos productos facilitan el desarrollo de metástasis se los denomina metastogenes. A aquellos cuyos productos lo inhiben se los llama genes supresores de metástasis (25). La capacidad metastática del cáncer mamario se ha asociado recientemente con la elevada expresión de algunos microARNs que, mediante diferentes mecanismos, silencian la expresión de genes supresores de metástasis (37). Estos pequeños ARNs no codificantes involucrados en la regulación postranscripcional de genes relacionados con cáncer son denominados “oncomirs”. Diez de estos microARNs de caninos siguen el mismo patrón de expresión que en los humanos (38).

La diseminación de las neoplasias ocurre por las vías linfática y sanguínea o por siembra directa en las cavidades. Se duda acerca de si la intravasación de células tumorales es un proceso activo o pasivo (39). En cualquier caso, se facilita por el incremento de permeabilidad de los vasos tumorales. La intravasación en vasos sanguíneos normales solo es posible luego de la degradación de su lámina basal, que en los vasos linfáticos está ausente o es discontinua (4). Se demostró que las células tumorales residen temporariamente en la pared del microvaso en su tránsito hacia la luz (40, 41).

La mera presencia de células tumorales en los vasos no asegura que eventualmente originarán poblaciones metastásicas. El fenotipo epitelial, aun transformado, no está adaptado para la circulación. Además, las células deben evadir la destrucción tumoral inmunomediada (por interacción con elementos del hospedador, como plaquetas y fibrina), por lo que la mayor parte de las células diseminadas tiene poca supervivencia en el torrente sanguíneo (4, 5).

La formación de la red linfática intratumoral promueve las metástasis porque incrementa las posibilidades de intravasación (39, 42, 43). Se informó que existe correlación entre la expresión aumentada del *VEGF-C*, involucrado en la linfangiogénesis, y el incremento en la tasa de metástasis en varias neoplasias en humanos, como el cáncer mamario, colónico, gástrico, pulmonar, tiroideo y prostático (44, 45).

La vía linfática es la más temprana y la más frecuentemente involucrada ya que, por la permeabilidad consecuente a la ultraestructura de estos vasos, constituye el drenaje natural. Por lo tanto, los linfonódulos (LNs) regionales son habitualmente los primeros sitios en desarrollar metástasis, lo que justifica la importancia de la linfadenectomía del ganglio centinela (42, 46, 47).

Sleeman utiliza una analogía que compara las metástasis en el LN regional con una “posición de avanzada en territorio enemigo”, debido a que las células que la forman superaron la presión de selección y realizaron metástasis exitosas. Por lo tanto, poseen las propiedades requeridas para originar otros tumores en sitios secundarios menos favorables (46).

Por otra parte, la presencia de metástasis en los LNs no necesariamente significa que las células que la formaron llegaron por vía linfática. El arribo de células carcinomatosas pudo realizarse por la sangre de manera temprana, mediante comunicaciones venolinfáticas o, más tardíamente, desde la circulación sistémica (en este caso las metástasis son típicamente hiliares) (46, 47).

La ocurrencia de linfangiogénesis durante el crecimiento tumoral fue motivo de controversia. Hasta principios de este siglo se postulaba que no existía un sistema linfático intratumoral. Esta afirmación podía obedecer a la ausencia de técnicas para poner en evidencia estos vasos de manera específica (44, 45, 48). Más recientemente se ha estandarizado el procesamiento inmunohistoquímico (IHQ) con anticuerpos anti-podoplanina, el receptor para hialuronano *LYVE-1*, el factor de transcripción Prox-1, y el anticuerpo anti M2A (D2-40).

De todos modos, no siempre los vasos linfáticos neoformados son funcionales. Las metástasis ocurrirían tanto por invasión a los vasos linfáticos peritumorales preexistentes como a los intratumorales neoformados (42, 49, 50, 51, 52). Debido a peculiaridades metodológicas (como la imposibilidad de acceder al dominio basal de membrana de las células endoteliales en las monocapas de cultivo) existen relativamente escasos datos acerca del proceso de intravasación, si se compara con la cabal comprensión que se tiene del de extravasación celular (50). La invasión a los vasos linfáticos podría realizarse pasivamente, por destrucción o como un fenómeno activo de reconocimiento y adhesión entre las células tumorales, la *ECM* y glicoproteínas de la membrana de los endotelios linfáticos, como el receptor *LYVE-1* (39, 50).

La localización de las metástasis no es azarosa. A principio del siglo XIX ya se había descubierto que los tumores ahora denominados secundarios eran “sembrados” por diseminación de células que se originaban en un tumor primario. Las autopsias revelaban que en algunos órganos estas neoplasias secundarias eran más abundantes que en otros. Hacia finales de ese siglo, Stephen Paget publicó “*The distribution of secondary growths in cancer of the breast*” (Lancet 1889; 1: 571-573), artículo en el que presentaba la teoría llamada del

“suelo-semilla”, que proponía que las células tumorales (“semillas”) solo podían “crecer” en un órgano cuyo microambiente (suelo) fuese apropiado. En el marco del conocimiento actual, se entiende por “apropiado” a aquel órgano que posea factores tróficos adecuados (53, 54).

En 1929, James Ewing puso en duda la teoría de Paget, proponiendo que la diseminación metastásica ocurría por factores puramente mecánicos que eran el resultado de la estructura anatómica del sistema vascular, es decir, que las células circulantes quedaban atrapadas en el primer lecho capilar que encontraran. Pero la tendencia en los patrones de distribución no podía explicarse únicamente por las particularidades de la anatomía vascular, la proporción de flujo sanguíneo y la cantidad de células recibidas en cada órgano (36, 54).

Actualmente, existen tres hipótesis “mayores” que retoman elementos de la teoría de Paget e intentan explicar esta diseminación organotrópica: la primera propone que los émbolos tumorales abandonan los vasos linfáticos y sanguíneos en igual magnitud en todos los órganos, pero sólo se multiplican en aquellos que tienen los *GFs* apropiados; de acuerdo con la segunda, las células endoteliales que tapizan los microvasos en ciertos órganos expresan moléculas de adhesión que interactúan con las células tumorales circulantes, de manera de causar la extravasación (consecuentemente, serán órganos blanco); por último, la teoría de la quimioatracción sostiene que moléculas atrayentes órgano-específicas circulan y estimulan a las células migrantes a invadir las paredes de los vasos sanguíneos y penetrar en el parénquima del órgano, en función de un gradiente de concentración (53). La migración y extravasación de las células tumorales presenta muchas similitudes con el tránsito de leucocitos, estrictamente regulado por quimioquinas (citoquinas quimiotácticas) y sus receptores. Las uniones de las células cancerosas con los endotelios llevan a la extravasación, luego del rodamiento causado por uniones de alta avidéz pero poca afinidad entre los oligosacáridos de superficie de las células tumorales y las selectinas endoteliales. Se acepta que los tumores producen y liberan glicoproteínas que estimulan la expresión de receptores previamente a la embolización. Las quimioquinas están implicadas en la extravasación organotrópica (28, 53, 55). Los receptores para quimiocinas llamados CXCR4 y CCR7 están

altamente expresados en células de cáncer de mama humanos y en sus metástasis. Sus ligandos exhiben picos de expresión en los LNs, pulmones, hígado y huesos, los órganos que desarrollan más tempranamente metástasis de neoplasias mamarias. Estas uniones no solo producen adhesión física sino que constituyen señales que repercuten en la supervivencia de las células interactuantes. La señalización mediante CXCR4 o CCR7 media la polimerización de actina y la formación de pseudópodos y consecuentemente induce respuestas quimiotácticas e invasivas (55).

Los xenotransplantes de líneas celulares tumorales humanas en ratones fueron cruciales para dilucidar el rol del producto de ciertos genes en las metástasis del cáncer de mama (particularmente pulmonares y óseas). Esa especificidad de órgano depende, además de los receptores para quimiocinas mencionados, de la expresión de otros genes como los de epiregulina, *MMP-1*, *MMP-2*, *VCAM-1*, osteopontina, entre otros (56).

Muy recientemente se ha formulado una hipótesis, fundamentada en experiencias con tumores hematopoyéticos, denominada de los “nichos premetastásicos”. Los autores proponen que el tumor primario puede influenciar el microambiente del órgano blanco antes del establecimiento de la metástasis, mediante la liberación de factores solubles (57).

Independientemente del órgano donde se hubiese extravasado, el grupo de células necesita abastecimiento sanguíneo y puede tener que resistir un medio ambiente restrictivo para el crecimiento, incluida la respuesta citotóxica del hospedador. Muchas células neoplásicas sobrevivientes se mantienen latentes en los tejidos, en tanto que solo unas pocas desarrollan metástasis detectables mediante la exploración clínica (4, 5).

Los tumores primarios pueden mantener la latencia de las micrometástasis distantes al producir factores antiangiogénicos, como la angiostatina (58). La remoción o la radioterapia del tumor primario pueden tener como consecuencia un crecimiento “explosivo” de las micrometástasis latentes (59). Esta situación ha sido descrita en perros con osteosarcomas (60).

Las metástasis pueden, o no, conservar el patrón general de crecimiento del tumor primario, pero sus células comparten, en gran medida, las características del tumor primario. Esto permite, por ejemplo, determinar el origen epitelial de una neoplasia metastásica mediante IHQ utilizando anticuerpos que reconozcan las citoqueratinas de los filamentos intermedios (61, 62, 63). Sin embargo, otros rasgos se modifican con consecuencias para la progresión de la enfermedad y las conductas clínicas a seguir. Un ejemplo es la resistencia del tumor metastásico a la terapia con drogas efectivas para el tumor primario. Esta resistencia del tumor metastásico puede deberse a varias razones. Algunas de ellas son: la expresión de la glicoproteína P (de la familia de bombas tipo ABC, llamadas “de resistencia múltiple a fármacos”) en tejidos que no la expresaban, la sobreexpresión de *Bcl-2* u otras proteínas inhibitoras de la apoptosis (proceso que idealmente debieran inducir los agentes quimioterápicos citotóxicos) y la sobreexpresión de factores de crecimiento como α y β -FGF, que se ha asociado con resistencia a los citotóxicos diez veces mayor en metástasis pulmonares de carcinomas prostáticos que en los tumores primarios en ratas (64).

Abastecimiento sanguíneo de las neoplasias primarias y secundarias

Se ha prestado considerable atención a los mecanismos por los cuales los tumores adquieren su abastecimiento sanguíneo, ya que del sostén trófico depende su crecimiento y los procesos implicados pueden ser blancos de procedimientos terapéuticos.

En 1971 Folkman propuso que el crecimiento tumoral era dependiente del proceso de angiogénesis (65). Esta hipótesis se convirtió en una teoría ampliamente aceptada merced a la considerable evidencia que la sostuvo durante las últimas tres décadas (66).

La teoría postula que el crecimiento y la progresión de los tumores están limitados por el acceso a O₂, nutrientes y GFs derivados de la circulación que difunden por los tejidos. La red vascular posibilita, asimismo, la eliminación de desechos (67). Por otro lado, esos nuevos vasos aumentan la oportunidad de las células neoplásicas de llegar a la circulación general y alcanzar sitios distantes (19).

La evidencia experimental indica que, sin nueva formación de vasos, las neoplasias no pueden crecer más de 1-3 mm³, o alrededor de 10⁶ células, debido a la hipoxia y necrosis que se generan (19, 65, 66, 68). El crecimiento tumoral consiste, entonces, en una fase avascular (previa al *switch* angiogénico) y otra vascular (68). La diferencia de tamaño entre distintos tumores en fase avascular se debería a las capacidades disímiles de las células para sobrevivir bajo distintos grados de hipoxia (66, 69). Durante la fase avascular, que puede durar años, las células proliferan pero mueren, por lo tanto el crecimiento es limitado. Hay ausencia o baja probabilidad de originar metástasis, los microvasos son maduros y los endotelios, quiescentes (19, 68). La mayor parte de los tumores se vuelven clínicamente detectables luego de la vascularización (70). El subsiguiente crecimiento sería posible merced al proceso angiogénico, mediante el cual la neoplasia forma su propia red de vasos (66, 67, 68). Históricamente, el término se usó para describir el crecimiento de “brotes” vasculares a partir de vénulas poscapilares preexistentes (21, 71, 72). La angiogénesis es un proceso prácticamente ausente en el organismo adulto en estado de salud, con excepción de los ciclos angiogénicos hormonalmente regulados en el aparato reproductor de la hembra (19, 72).

Según esta teoría, en los tumores se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes gracias a la intervención de múltiples factores que, según se creía inicialmente, sólo eran secretados por las células tumorales (65).

La adquisición de la capacidad angiogénica puede ser una expresión de la progresión desde la transformación neoplásica de la población en cuestión hasta el crecimiento y el desarrollo de metástasis tumorales (21, 68, 71).

Sin embargo, más recientemente se ha planteado una hipótesis que sostiene que el fenotipo angiogénico puede incluso preceder a la transformación neoplásica y manifestarse en procesos displásicos, por ejemplo aquellos del cuello uterino, boca, vejiga, glándula mamaria y médula ósea. Se sugiere que la angiogénesis precede a la transformación de la hiperplasia mamaria en neoplasia (43, 73). Además, la transformación de carcinomas mamaros *in situ* en

carcinomas invasivos (si se consideran estas lesiones como puntos de un continuo) puede ser anticipada mediante la determinación de la densidad de los microvasos (67).

Hasta hace poco, se consideraba que la angiogénesis era el único mecanismo de formación de vasos en la vida posnatal. Ya en la revisión de Folberg y colaboradores del año 2000 se plantearon variaciones a esta postura. El término se utiliza en la actualidad de manera más amplia, para denotar el proceso de crecimiento y remodelación de la red vascular primitiva en una más compleja (74). El modelo actual sugiere que el proceso involucra tanto ramificación de vasos preexistentes como incorporación de células progenitoras endoteliales (CPE) en el lecho vascular en crecimiento (21, 74, 75, 76, 77).

Las células endoteliales y sanguíneas provienen de un progenitor común: el hemangioblasto. El *VEGF* constituye la señal que induce la diferenciación del hemangioblasto a angioblasto (75). Durante la vasculogénesis, que es el desarrollo de los vasos en el embrión, ocurre la diferenciación *in situ* de estos precursores (angioblastos) a células endoteliales que se ensamblan en un laberinto vascular, mediada por *VEGF*, su receptor *VEGFR-2* y el factor básico de crecimiento de fibroblastos (*bFGF*) (21, 78).

La generación de canales vasculares por el citotrofoblasto representa el último evento de vasculogénesis normal en mamíferos (74). Gran cantidad de datos sostiene la existencia de CPEs residentes en la médula ósea en la vida posnatal, que tienen la actividad funcional del hemangioblasto y contribuyen a la formación de nuevos vasos en el adulto, mediante un mecanismo que recuerda al de la vasculogénesis embrionaria (21, 76, 77). Las CPE se movilizan al torrente sanguíneo al ser expuestas a factores angiogénicos como *VEGF*, *FGF-2*, *IGF* y angiopoyetina (75, 77, 79). Estas células son incorporadas a sitios de activa neovascularización (desde donde reclutan CPEs adicionales), por ejemplo durante isquemia, trauma vascular o crecimiento tumoral (77).

En pacientes con cáncer se detectó un aumento de CPEs circulantes, relacionado con el creciente volumen tumoral y la exacerbada producción del *VEGF* por parte del tumor. El porcentaje de incorporación de CPEs para la formación de nuevos vasos depende de la

naturaleza del tumor: para la mayoría es baja, en tanto que otros dependen de este mecanismo (77). Otros autores, sin embargo, sostienen que los progenitores no contribuyen al desarrollo del endotelio de la nueva vasculatura en crecimiento (79).

Otro modelo de vascularización se funda en la hipótesis que sostiene que algunos tumores pueden vascularizarse sin angiogénesis significativa, probablemente utilizando vasos preexistentes mediante selección vascular (80). Las observaciones de Holash y colaboradores desafiaron el punto de vista prevalente acerca de que las neoplasias se iniciaban como masas avasculares que solo tardíamente inducían el desarrollo de un soporte vascular. En lugar de esto, encontraron que las células malignas rápidamente seleccionan y utilizan vasos existentes para formar una masa tumoral bien vascularizada. Paradójicamente, a partir de los vasos seleccionados no se induce neoangiogénesis, sino que ocurre su regresión, mediada por angiopoyetina-2, debida a la interrupción de las interacciones entre células endoteliales y células musculares lisas y la apoptosis de células endoteliales. Esta regresión genera necrosis central en las neoplasias. En los márgenes comienza la angiogénesis que sostiene el crecimiento futuro, con aumento de expresión del *VEGF* (80).

Si bien la mayoría de las neoplasias depende de la angiogénesis, distintos tipos tumorales podrían lograr su abastecimiento sanguíneo mediante diferentes mecanismos (67, 74). En melanomas uveales de más de 1 cm, sin evidencia de angiogénesis, no se detectaba necrosis. Esto indujo a pensar que la perfusión se llevaba a cabo mediante otro mecanismo, (74). Éste y otros estudios morfológicos indican que algunos tumores pueden nutrirse sin angiogénesis significativa, probablemente formando canales vasculares, mediante un proceso llamado mimetismo vascular. Este es otro proceso de abastecimiento sanguíneo, aunque no se trata de un evento vasculogénico. Consiste en la generación de canales de microcirculación. Se determinó que tales canales carecen de pared celular, están delimitados por *ECM* y son generados por células tumorales en neoplasias con fenotipo altamente agresivo en la intimidad del compartimiento celular, a diferencia de la respuesta angiogénica que se relaciona con el compartimiento estromal (74, 81). Estos canales también se forman *in*

vitro, por lo que se concluye que son independientes de fuerzas hemodinámicas (82). Este descubrimiento se enfrenta a la concepción predominante que consiste en que la generación de nuevos vasos es el único mecanismo de abastecimiento de sangre (74).

Procesos involucrados en la angiogénesis. Bases celulares y moleculares

El apropiado desarrollo del sistema vascular requiere de la acción concertada de múltiples sistemas de señalización. La comprensión de los mecanismos moleculares mediante los que se forman los vasos sanguíneos se ha convertido en uno de los principales desafíos de la última década, ya que ofrecería opciones pronósticas y terapéuticas para mitigar o, inclusive, curar desórdenes que constituyen causas de elevada mortalidad: enfermedad isquémica miocárdica, fenómenos inflamatorios exacerbados y cáncer (21, 43, 74).

La intrincada serie de eventos a los que colectivamente nos referimos como angiogénesis constituye un proceso complejo, heterogéneo, incompletamente comprendido, mediado por *GFs*, constituyentes de la *ECM* representados de manera aberrante en el estroma peritumoral, genes supresores alterados y proteasas relacionadas al tumor, entre otras sustancias. El balance de factores pro y antiangiogénicos determina el curso de la formación de vasos. En 1995 se conocían doce proteínas angiogénicas, pero este número se ha incrementado dramáticamente en los últimos años (21, 43, 74, 79).

En tejidos normales, la quiescencia vascular se mantiene por la influencia dominante de inhibidores endógenos de la angiogénesis por sobre el estímulo angiogénico. Por el contrario, la angiogénesis tumoral está inducida por la secreción exacerbada de factores proangiogénicos y por la regulación hacia abajo de inhibidores (66, 79). En las neoplasias se sintetizan ambos tipos de factores (67). La observación clínica y las evidencias experimentales sugieren, por ejemplo, que células de osteosarcomas y carcinomas prostáticos de caninos generan inhibidores de angiogénesis, como la angiostatina (60).

Entre los factores proangiogénicos, la familia de los *VEGF* es la mejor caracterizada (20). La vía *VEGF/VEGFRs* ha sido, y continúa siendo, el foco de la investigación básica y de desarrollo de la industria farmacéutica en el campo de la oncología (79, 83, 84). Aunque inicialmente se creía que en enfermos de cáncer estos factores de crecimiento eran secretados únicamente por las células tumorales, se observó que la eliminación del gen para *VEGF* en estas células no bloqueaba completamente ni su producción, ni la angiogénesis o el crecimiento tumorales, aunque sí los retrasaban (85). Se constató que la mayor parte de las moléculas angiogénicas, principalmente *VEGF*, son liberadas tanto por las células tumorales como por células endoteliales, células del estroma, macrófagos y linfocitos infiltrantes (72, 85, 86, 87). Recientemente se informó acerca de una nueva familia de factores angiogénicos: la adrenomedulina (AM) y el péptido proadrenomedulina (*PAMP*), a los que también se les atribuye un rol en la disminución de la apoptosis y en el aumento de movilidad de las células cancerosas, además del estímulo de la angiogénesis mediante interacción con *VEGF* (88).

Según el modelo que considera fases avascular y vascular, existe un *switch* angiogénico. ¿Cuál es la señal para que se desarrolle la segunda de estas fases? Se sostiene que el fenómeno clave en la pérdida del equilibrio entre factores pro y antiangiogénicos es la hipoxia (20, 43, 69, 85). En el cáncer, esta circunstancia ocurre por aumento de consumo de O_2 ; en otras entidades patológicas, por privación. El sistema vascular debe ser capaz de adaptarse a la demanda alterada en un área determinada.

Apoyada por el descubrimiento de los *HIFs* (*HIF-1 α* , *HIF-1 β* , *HIF-2*) se propuso la siguiente sucesión de acontecimientos conocida como “cascada de la hipoxia” (69, 89). En normoxia, el *HIF-1 β* se expresa constitutivamente, en tanto que el *HIF-1 α* está prolihidroxilado por una oxigenasa. En hipoxia, en cambio, la oxigenasa está inactiva y el *HIF-1 α* estable, con capacidad de unirse a los elementos promotores de respuesta a la hipoxia (*HRE*) de genes de *GFs* (20, 69, 85, 90, 91, 92). Los genes “blancos” para el *HIF-1 α* son numerosos y están involucrados en la angiogénesis, el control vasomotor, la proliferación, la eritropoyesis y el metabolismo energético. Con respecto a este último, el *HIF-1 α* favorece la transcripción de

genes que promueven la fermentación en lugar de la fosforilación oxidativa (89). Esta cascada que involucra cambios en la expresión génica representa una adaptación de largo plazo. La expresión del gen para *Flk-1* (receptor del *VEGF* que media la mayoría de sus efectos en proliferación, migración y supervivencia) es activada luego de periodos de hipoxia bastante prolongados (69).

La pérdida del *HIF-1 α* en ratones *in utero* dificultó la angiogénesis. Esto se comprobó porque se observaron menor densidad vascular y menor diámetro de los vasos. La mayoría de los ratones noqueados para el gen de *HRE* murió (43, 85).

Se ha observado un incremento progresivo en los niveles del *HIF-1 α* en los tejidos normales, hiperplásicos y carcinomatosos (43). Sin embargo, la expresión del *HIF-1 α* no es indispensable para la iniciación tumoral ni para su crecimiento, ya que ratones *HIF-1 α* *-/-* también desarrollaron neoplasias (85, 89). No obstante, éstas tuvieron menores índices de proliferación, tardaron más en progresar y la mayoría no desarrolló metástasis (89).

Existen otras causas que llevan al desequilibrio entre factores pro y antiangiogénicos, tal es el caso de la mutación del gen para la proteína supresora tumoral p53 y la activación de protooncogenes (como *c-ras*, *c-src*, *c-fos*, entre otros) que inducen producción de *GFs* angiogénicos como el *VEGF* (20).

Los macrófagos, los linfocitos y los mastocitos también participan en el inicio del proceso de angiogénesis. La evidencia sugiere que estas células, en lugar de inhibir el crecimiento tumoral, lo promueven mediante una miríada de mediadores: *GFs*, citocinas y proteasas, entre otros. Los macrófagos son muy abundantes en tumores mamarios, particularmente en estadios tempranos de progresión. Se ha descrito la correlación positiva entre la magnitud del infiltrado y la amplificación de oncogenes, sobreexpresión del *VEGF*, aumento en la densidad de vasos sanguíneos y peor pronóstico (93).

El creciente conocimiento en la materia permite componer una imagen dinámica de la formación de la neovasculatura tumoral en la que las células endoteliales (CEs) y las células tumorales continuamente migran. Esto no podría ocurrir en vasos maduros, quiescentes, con

pericitos y lámina basal estable (66). El brote angiogénico consta de varios acontecimientos, presentados aquí como pasos secuenciales a efectos de su descripción. Si bien en cada uno interviene una gran cantidad de mediadores y vías de señalización, se resalta particularmente el sistema *VEGF/VEGFRs* debido a su importancia.

Según el modelo tradicional, los acontecimientos centrales del proceso angiogénico son: dilatación del vaso preexistente, aumento de permeabilidad endotelial, pérdida del soporte periendotelial, proliferación, migración, invasión del estroma circundante por células endoteliales, organización de formaciones tubulares, supervivencia, maduración y diferenciación de los vasos y su remodelación (21, 79, 94).

Vasodilatación y aumento de la permeabilidad endotelial. En neoplasias, se ha descrito una correlación positiva entre el aumento en la secreción del *VEGF* y la dilatación de los vasos sanguíneos y linfáticos pre-existentes (20). Este proceso se desarrolla mediante una vía Ca^{++} dependiente que involucra la producción de óxido nítrico (ON), inducida por *VEGFs* (95). Luego, la microvasculatura se vuelve hiperpermeable para macromoléculas circulantes. La permeabilidad vascular aumenta en respuesta a *VEGFs* y permite la extravasación de proteínas plasmáticas, como la fibrina, que convierten provisionalmente a la matriz, normalmente antiangiogénica, en un lecho favorable para la migración, tanto de las células endoteliales como de las neoplásicas (66, 93, 96). Este aumento de permeabilidad está posibilitado, según distintos autores, de diversas maneras. Una posibilidad es que los *GFs* induzcan fenestraciones endoteliales (20). Dvorak propuso que las moléculas atravesarían el endotelio mediante transcitosis inducida por *VEGFs* (96) o por aberturas en las uniones entre células adyacentes (20). La hiperpermeabilidad lleva a condiciones patológicas como la ascitis y otras efusiones, asociadas frecuentemente a los procesos neoplásicos (20, 97). El aumento de presión intersticial, debida a los vasos hiperpermeables, disminuye la tensión de O_2 y ocasiona necrosis (19, 97).

Proliferación de células endoteliales. En décadas anteriores no estaba ampliamente aceptado que ocurriese este fenómeno, sino que se creía que la observación de vasos más numerosos

era aparente y reflejaba una respuesta inflamatoria hiperémica a la necrosis. Se acepta actualmente que el endotelio pasa de un estado de quiescencia a uno de proliferación mediante señales químicas. *VEGF* es un mitógeno que desencadena la proliferación endotelial interactuando de modo paracrino con sus receptores, principalmente *Flk-1* (72, 78, 84, 98, 99). *VEGF* actúa mediante la activación de *Flk-1*, activando las vías relacionadas con las *MAPKs*, la de las quinasas reguladas por señales extracelulares (*Erk*) y la de la quinasa c-jun n-terminal asociada a estrés (*JNK/SAPK*). La proliferación endotelial también está regulada por los pericitos (20, 72, 84).

Inicialmente se creía que el *VEGF* tenía acción mitogénica sólo en los endotelios, pero luego se descubrió que estimulaba tanto la proliferación como la migración y supervivencia en células no endoteliales, por ejemplo neuronas, astrocitos, monocitos, condrocitos, epitelio retiniano y miocitos lisos (91, 100). Actualmente, el descubrimiento de la expresión de receptores para *VEGF* en líneas de células carcinomatosas y en una variedad de neoplasias *in vivo* ha generado interés en la posible función autocrina de este factor en el cáncer (87, 100). En neoplasias mamarias la expresión de *Flk-1* se asoció a índices mayores de proliferación de las células tumorales (101).

Migración de células endoteliales. Las células endoteliales migran para formar el “brote angiogénico”, pero para ello necesitan perder los contactos intercelulares y el soporte periendotelial, es decir, requieren desestabilización, la que consiste en la desunión de las células musculares lisas y la desorganización de la *ECM* (21).

Se ha demostrado que las células endoteliales son capaces de secretar, exponer y activar tanto *MMPs* (particularmente las que degradan colágeno I, el principal componente de la *ECM* perivascular) como sus inhibidores tisulares (*TIMPs*). Esta capacidad degradativa también es propia de las células tumorales y de algunas células del tejido conectivo. En tumores de ratones noqueados para *MMPs* se observó menor cantidad de vasos que en los animales controles. En cultivos celulares, la migración de células endoteliales fue inhibida por

la adición de *TIMPs*. Luego, se considera a las proteasas como factores críticos en la cascada angiogénica (32, 33).

Este microambiente extracelular prodegradativo es inducido, entre otros factores, por el *VEGF* (78, 85). Este *GF* induce la degradación de la lámina basal mediante *MMPs*, proteasas de serina *uPA* y *TTPA* (95). La migración iniciada por el *VEGF* sigue un proceso de señalización asociado con quinasas de adhesión focal (*Fak*), quinasas del fosfatidilinositol (*PI3k*), óxido nítrico (ON) y con la reorganización de microfilamentos (79, 102).

La formación de *ECM* y su degradación se encuentran habitualmente en equilibrio, controladas por la familia de las enzimas *MMPs* y los *TIMPs*. Este exquisito balance se pierde durante la angiogénesis (43). La activación de las *MMPs* se relaciona con dos procesos críticos de la diseminación carcinomatosa. El primero es la desorganización de la lámina basal (y la pérdida de señales consecuentes) e invasión al tejido conectivo subyacente que puede tener como consecuencia la intravasación, como se ha comentado en páginas anteriores. El segundo es la degradación de la matriz para permitir la prolongación de los brotes angiogénicos; en este proceso también tienen un rol de importancia ciertas moléculas de adhesión como las integrinas (102, 103). Algunas de las *MMPs*, secretadas por diversas células, activan o liberan *GFs* (*bFGF*, *VEGF*, *IGF-1*) secuestrados en la matriz (21, 43, 93). Las moléculas involucradas en la adhesión célula–matriz, como la $\alpha V\beta 3$ -integrina que localiza a la *MMP2* en la superficie de la célula endotelial, son mediadoras de la diseminación endotelial (103).

Organización en estructuras tubulares. Supervivencia endotelial. Las CEs se ensamblan como cordones que subsecuentemente pueden adquirir luz. El adelgazamiento de las CEs y la fusión de vasos preexistentes les permiten incrementar su diámetro y longitud. En contraste con los vasos normales, los tumorales están anormalmente agrandados, pero el flujo es caótico, lento e ineficiente para las demandas metabólicas (96).

El mecanismo habitual de regresión vascular es la apoptosis endotelial. Esto ocurre, por ejemplo, en la retina, el cristalino y el ovario luego del nacimiento. Este es un proceso

“blanco” para la inhibición terapéutica de la angiogénesis. La apoptosis es inducida por la privación de nutrientes o de señales de supervivencia cuando la luz vascular es obstruida por trombos, por células muertas o cuando ocurre un cambio en el perfil angiogénico. También puede ser inducida por ON, especies reactivas del oxígeno (*ROS*), angiostatina, etc, (22, 104, 105).

Se ha demostrado la inhibición de apoptosis por parte del *VEGF in vitro* (20, 90, 91, 92). Los mecanismos mediante los que ocurre son discutidos. Zachary postuló que el *VEGF* induce el aumento de la expresión de proteínas antiapoptóticas (como *Bcl-2* y *Bcl-xl*) inhibiendo así a las caspasas; sin embargo, Jin en el año 2002 encontró correlación entre la expresión del *VEGF* y caspasas (91, 95). El *VEGF* también activa a las *Fak* y a otras proteínas reguladoras de la adhesión que mantienen las señales de supervivencia en las CEs y suprimen a las proteínas p53, p21, p16, p27 y al gen proapoptótico *Bax* (102). Además, secuestra a la proteína proapoptótica *Bad* (20). Se propuso que la expresión del gen de la enzima superóxidodismutasa dependiente de manganeso (MnSOD), mediada por *VEGF*, representaría otro mecanismo antiapoptótico, en los casos en que la apoptosis es causada por daño mitocondrial debido a las *ROS* (que aumentan ante la isquemia) (105). Por otra parte, el *VEGF* se considera neurotrófico y neuroprotectivo, ya que estimula la neurogénesis *in vivo* e *in vitro* y promueve la supervivencia de neuronas motoras durante fenómenos de hipoxia, probablemente incrementando la resistencia al peróxido de hidrógeno en endotelios y otras células (90, 91, 104).

Maduración, diferenciación y remodelación de los nuevos vasos. Características de los vasos

tumorales. La maduración del vaso incluye su remodelación hasta un diámetro uniforme, su ramificación y estabilización. Poco se sabe acerca de los mecanismos que guían a las CEs en patrones correctos (21, 96). A partir de CEs, macrófagos, células mesénquimáticas o precursores de la médula ósea, ocurre diferenciación a células musculares lisas. Durante la miogénesis vascular, las células murales estabilizan al vaso inhibiendo la proliferación y migración endoteliales y estimulan la síntesis de *ECM*, lo que solidifica las interacciones e

interviene en el control hemostático. Además, en esta fase, el vaso adquiere las características especializadas para cada lecho vascular. Un ejemplo de ello es que las células endoteliales son más fenestradas en los tumores de la piel que en los del encéfalo (21).

El sistema Ang-1/tie2 (angiopoyetina/receptor) contribuye a la remodelación vascular al estabilizar la interacción entre células murales y CEs e inducir la ramificación. Este proceso está caracterizado por reclutamiento de pericitos y células musculares lisas hacia el nuevo vaso. *VEGF* promueve la acumulación de células musculares lisas a través de la liberación del factor de crecimiento derivado de plaquetas (*PDGF*), familia de ligandos que contribuye a la estabilidad de los vasos y a su maduración (21, 72).

En los vasos sanguíneos normales la lámina basal está presente, es continua, y entre las células se establecen uniones estrechas, adherentes y comunicantes (106). Por el contrario, los vasos tumorales son altamente anormales en su organización y estructura. Son “multicapa”, carecen de pericitos, originan extensiones que protruyen formando puentes y las láminas basales faltan o son irregulares y fragmentadas. Además, se remodelan permanentemente debido a la falta de estabilización. Las células endoteliales exhiben fenestraciones y existen espacios intercelulares, por lo que estos vasos tienen una permeabilidad descontrolada (96). La intravasación de células tumorales es ayudada materialmente por estas características estructurales (107). Los vasos sanguíneos neoplásicos son similares a los capilares linfáticos, pues carecen de lámina basal o ésta es discontinua, y sus células se encuentran laxamente superpuestas o interdigitadas y sin uniones estrechas generando así espacios intercelulares excepcionalmente amplios (39, 51). Existen distintos tipos de vasos tumorales: vasos “madre”, proliferaciones microvasculares glomeruloides y malformaciones vasculares. Todos ellos se han observado en neoplasias de humanos y animales. Algunos son dependientes de *VEGF* y otros, no (96).

Recientemente, los vasos de las neoplasias se han denominado vasos “en mosaico” ya que exhiben células tumorales residentes en la pared. Esa es la razón por la que los agentes quimiotrópicos citotóxicos también tienen efectos antivasculares (40, 41).

Familia de los VEGF y sus receptores. En 1983, Senger y colaboradores describieron una proteína que aumentaba la permeabilidad vascular 50.000 veces más que la histamina, actuando selectivamente en el endotelio venular y sin injuria para las CE. La denominaron factor de permeabilidad vascular (VPF) (97). Siete años después lograron purificarla y describir la secuencia completa de ADN. En 1989, el grupo de Ferrara aisló y caracterizó un mitógeno para endotelios a partir del sobrenadante del cultivo de células foliculares hipofisarias de bovino y propuso que se lo denominara factor de crecimiento de endotelios vasculares (VEGF) (108). En un trabajo posterior del mismo año, comunicaron que se trataba de un factor soluble, a diferencia de otros mitógenos endoteliales (109). Cuando tiempo más tarde describieron su secuencia, se descubrió que se trataba del VPF.

En 1996, Ferrara y su grupo de trabajo observaron que los ratones noqueados para VEGF morían *in utero*. Ésta y otras observaciones condujeron a proponer que los VEGF cumplen un rol esencial en la vasculogénesis (110). Desde su descubrimiento inicial como factor de aumento de permeabilidad a su actual rol pluripotencial en la angiogénesis se han hecho continuos progresos en la identificación y caracterización de sus receptores, reguladores y vías de señalización (20, 100, 111, 112).

Se trata de una familia de seis glicoproteínas: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y los factores de crecimiento placentarios 1 y 2 (PlGF 1 y 2) (20, 79, 84). Algunos se secretan ligados a proteoglicanos y requieren clivaje de proteasas para generar un segmento bioactivo. El VEGF-A, llamado también VEGF, es el VPF. El gen del VEGF-A tiene 8 exones y existen distintas isoformas originadas por corte y empalme alternativo del ARN. De esta manera, se originan proteínas de 121, 165, 189, 206, 145 y 183 aminoácidos. Cumplen un amplio rango de actividades en mamíferos, son consideradas claves en la vasculogénesis y la angiogénesis, tanto en condiciones fisiológicas (incluidas la ovulación, menstruación, mantenimiento de presión, preñez, etc.) como patológicas: artritis, soriasis, degeneración macular de la retina y cáncer (20, 111, 112, 113).

VEGF se une a sus receptores, de tipo tirosinquinasa, en las células endoteliales y otras células (20, 111, 112, 113). Su producción se regula hacia arriba fundamentalmente por la hipoxia, acidosis e hipoglucemia (85). Se describieron los siguientes receptores: VEGFR1 o Flt-1 (*fms like tyrosin kinase*), VEGFR2 o KDR (*kinase-insert domain containing receptor*) o su homólogo murino: *fetal liver kinase* (Flk-1), VEGFR3 (Flt-4) y VEGFR4. Además, existen co-receptores (neuropilinas). Los distintos VEGFs tienen distintas afinidades por sus receptores (fig. 1.), que desencadenan respuestas disímiles. La función del GF y la especificidad del receptor pueden ser reguladas por procesos proteolíticos (20, 39, 44, 72, 79, 84).

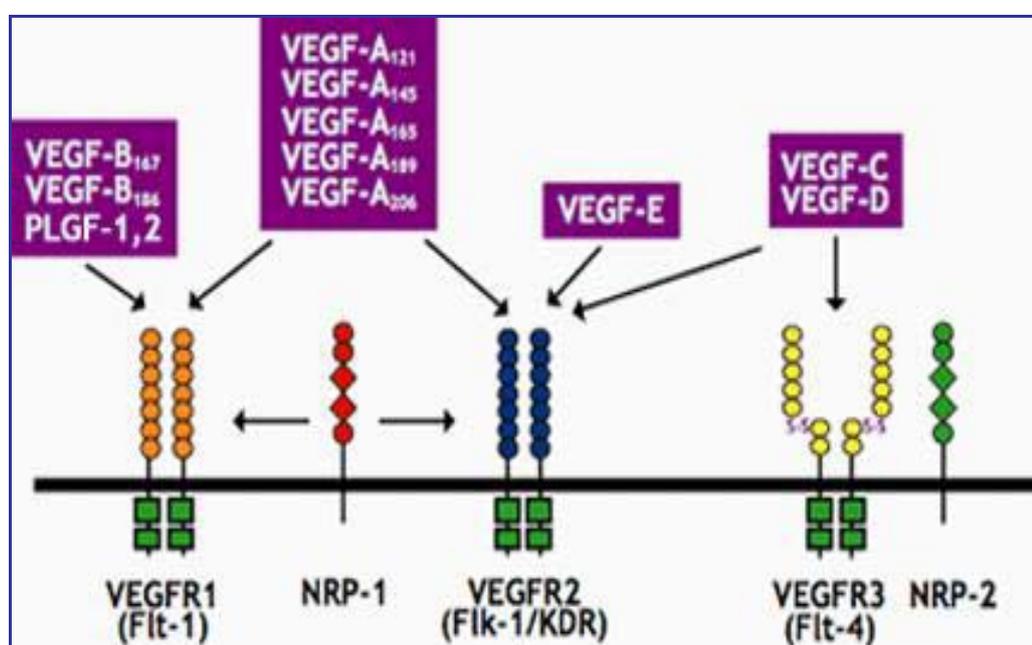


Fig 1. Interacción entre los VEGFs y sus receptores². NRP: neuropilinas.

Flt-1 y Flk-1 son dímeros que comparten un 44 % de homología, compuestos por un dominio del tipo inmunoglobulina extracelular, un dominio transmembrana y un dominio tirosinquinasa interrumpido por otro de inserción de quinasa. Ligan VEGF mediante diferentes dominios de la molécula, por lo que la mutación de uno puede no afectar la unión con el otro

² Tomado de: *Research VEGF, Genentech BioOncology*. Disponible en: <http://www.researchVEGF.com/researchVEGF/ligand/VEGF/VEGF-pathway/receptors/index.m>

receptor. La activación de las vías de señalización puede ser diferente en estos dos receptores (20, 84, 112, 113).

Flt-1 se expresa en los endotelios sanguíneos y es crítico en la vasculogénesis ya que, si bien no es imprescindible para la diferenciación del endotelio, sí lo es para su correcto ensamblaje. Esta vía regula la interacción célula-célula y célula-matriz durante el desarrollo vascular, por lo que los ratones noqueados para este gen desarrollan vasos con endotelios anómalos en su organización (113, 114). También funciona como inhibidor de la proliferación mediada por *Flk-1*, pero no de la migración (79, 91).

Flk-1 se expresa en endotelios sanguíneos y regula la mayoría de los efectos río abajo del *VEGF* en proliferación, aumento de permeabilidad, invasión, migración y supervivencia (87, 112, 113, 115). La ausencia de islotes y vasos sanguíneos en embriones *VEGFR-2* ^{-/-} indica que el patrón de señalización que lo involucra se requiere tempranamente en el desarrollo del linaje endotelial (116).

Sistema *VEGF-C/D* y *Flk-1/ Flt-4*. *VEGF-C* puede ser angio o linfangiogénico, como consecuencia de su procesamiento, al unirse a los receptores *Flk-1* o *Flt-4*, respectivamente (39). La proteína *VEGF-C* 31 kDa inmadura, la que predomina en los tumores, activa al receptor *Flt-4* (presente casi exclusivamente en el endotelio de los vasos linfáticos en la vida posnatal) y controla su desarrollo y crecimiento (39, 44, 45, 51, 84). La forma clivada de 21 kDa, también es capaz de activar a *Flk-1*. *VEGF-D* también se une y activa a los receptores mencionados. (39, 42, 45).

Además de la vía de señalización mediada por *VEGFs* y sus receptores, recientes hallazgos proponen otras vías linfangiogénicas como las que involucran *Ang-2* en carcinomas mamarios en mujeres, *FGF-2*, *HGF*, *IGF-2* en otros carcinomas y *PDGF-BB* en fibrosarcomas murinos (117).

La linfangiogénesis ocurre en tejidos en desarrollo y en procesos patológicos como inflamación, curación de heridas y linfedema (39, 42, 45).

Se documentó la relación de la sobreexpresión del *VEGF-C* y la densidad de vasos linfáticos con el incremento en la frecuencia de metástasis en varias neoplasias humanas, como los carcinomas mamario, colónico, gástrico, pulmonar, tiroideo y prostático. La formación de la red linfática intratumoral promueve las metástasis porque incrementa las posibilidades de intravasación (44, 47, 49, 52).

La sobreexpresión del sistema *VEGF/VEGFR* está asociada a la progresión tumoral en varios tumores (43, 94, 111). En cultivos de células de melanomas, la angiogénesis y el crecimiento tumoral se inhiben mediante el bloqueo del *Fik-1* (98). Existe asociación entre la expresión de *Fit-4* y sus ligandos y la capacidad metastásica de varias neoplasias del humano (39, 47, 49).

La comprensión completa del sistema *VEGF/VEGFRs* es crucial en la optimización de la terapia antiangiogénica como componente de protocolos antineoplásicos (111).

El rol de los *VEGFs* en la angiogénesis mediante la activación de sus receptores en los endotelios está bien establecido. A partir de 2001 comenzaron a publicarse artículos en los que se informaba la detección de *Fit-1* y *Fik-1* y sus co-receptores en las células de tumores tales como carcinomas pulmonares (excepto el de células pequeñas), próstáticos, mamarios y melanomas y en los vasos adyacentes a los mismos, sin que se postulara una explicación para este fenómeno, temiendo que se tratase de falsos positivos de la técnica IHQ. La evidencia emergente sugiere que el *VEGF* podría desempeñar roles adicionales a través de tales receptores. La hipótesis actual propone la existencia de un mecanismo autocrino en el crecimiento de las células tumorales suponiendo que los receptores hallados fueran activos y activaran el patrón de señalización vía *TK* y efectos río abajo, cuyo último efecto sería sobre el fenotipo y función de las células (78, 79, 87, 100, 103).

Conceptos sobre desarrollo y anatomía mamaria

El complejo mamario de la perra, formado por una mitad derecha y una izquierda separadas por un surco más o menos pronunciado según la región, se extiende desde la región esternal hasta la inguinal, donde el surco intermamario es profundo. De cada lado se desarrollan cinco mamas, denominadas torácica craneal, torácica caudal, abdominal craneal, abdominal caudal e inguinal (118).

Las mamas se desarrollan a partir de engrosamientos del ectodermo. Los brotes comienzan a extenderse en el mesénquima que los rodea y a formar un sistema de cordones ramificados que permanece quiescente como rudimento. El desarrollo continúa en la vida posnatal, durante la pubertad, cuando por estímulo hormonal ocurre crecimiento significativo de los conductos a partir de los brotes terminales (BTs), estructuras especializadas constituidas por dos tipos celulares diferentes, unas internas y otras externas (o de capucha) que luego originarán a las células luminales y basales, respectivamente, además de células madres que se encuentran entre las células de capucha. Su diferenciación se produce por la señalización mediada por *Notch*, *Hedgehog* y *BMPs* (10).

Histológicamente, se la clasifica como una glándula exocrina tubuloalveolar compuesta. Los grupos de alvéolos y ductos forman lobulillos separados por septos de tejido conectivo. El conjunto de lobulillos forma un lóbulo glandular. El primero de un sistema de conductos por el que se vehiculiza la secreción es el conducto intralobulillar que drena hacia el lobulillar. Los conductos lobulillares confluyen y forman conductos lactíferos, en número de 7-16 que, en la perra, desembocan separadamente en los orificios papilares situados en el vértice de la papila o pezón. El tejido intersticial proporciona sostén y constituye un medio para la comunicación celular. En él se encuentran vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios. El tejido conectivo intralobulillar consiste en fibras colágenas laxamente distribuidas en una matriz de glicosaminoglicanos ácidos, con fibroblastos, ocasionales macrófagos y linfocitos, y sin células

adiposas. La vascularización es bastante abundante, en comparación con el tejido interlobular, que ostenta mayor proporción de fibras de colágeno y es relativamente hipocelular (119, 120). La unidad ducto-alveolar está constituida por cuatro tipos celulares: células madre, células epiteliales ductales, células epiteliales alveolares (epitelio secretor, llamadas también células lumbinales) y células mioepiteliales (o basales). Las primeras son células madre somáticas que, si bien no son totipotenciales, tienen capacidad de auto-renovación y retienen su potencia para originar diferentes linajes, en este caso, las tres células maduras antes mencionadas (9). Recientemente, el éxito en el hallazgo de las células madre y de los factores de transcripción específicos de los diferentes linajes ha permitido una mayor comprensión del control de la determinación y diferenciación celulares. Un ejemplo es la vía de señalización del gen *Notch*: mientras la expresión de *Notch-3* determina diferenciación a células lumbinales, su bloqueo lleva a diferenciación mioepitelial (121).

Las células epiteliales lumbinales se disponen en una capa única y su altura depende de la actividad secretora. En fase de actividad, la luz del alvéolo se colapsa parcialmente y el borde apical celular se vuelve irregular. Estas células llevan adelante dos diferentes tipos de secreción: merocrino para la secreción de micelas proteicas y apocrino en el caso de la secreción lipídica. En un corte histológico pueden observarse lobulillos en varias fases de actividad (120).

Las células mioepiteliales son fusiformes y se encuentran orientadas paralelas al eje en los conductos, formando una capa continua. Las mioepiteliales alveolares son estrelladas y se encuentran yuxtapuestas a las células epiteliales secretoras, interpuestas entre ellas y el estroma (122, 123). Se trata de verdaderas células epiteliales que apoyan sobre una lámina basal, establecen uniones adherentes y poseen filamentos intermedios formados por citoqueratinas. Durante la vida posnatal, y mediada por vías que involucran *EGFs*, *Wnt* y *TGFs*, se diferencian al sintetizar abundantes microfilamentos, proteínas contráctiles específicas de músculo liso, y organizar placas densas (122). Durante años se sostuvo el concepto erróneo acerca de que su rol en la fisiología mamaria estaba confinado a la función

contráctil (123, 124, 125). Se considera que las células mioepiteliales contribuyen a la síntesis y remodelación de la lámina basal (122, 123, 124, 126). Además, pueden ejercer efectos paracrinos importantes en el epitelio glandular y controlar muchos aspectos de la diferenciación de las células luminales, como la polaridad apicobasal, el flujo de fluidos y electrolitos y la respuesta a señales endocrinas o paracrinas, tanto durante el desarrollo como en fenómenos patológicos (123, 124). Un mediador importante de la comunicación entre células luminales y basales sería el *FGF2*, secretado por estas últimas (122).

Incidencia del cáncer.

Neoplasias mamarias en distintas especies

Durante 2005, más de 7.000.000 de personas murieron de cáncer en el mundo (sobre 58 millones de fallecimientos). En Argentina, en el mismo año, 63.000 personas murieron debido a esta enfermedad. Aproximadamente el 50 % de ellas era menor de 70 años (127). Se proyecta que para 2020 habría un 50 % de incremento de nuevos casos. Sin embargo, el Informe Mundial de Cáncer provee clara evidencia que un tercio de los tumores podría prevenirse mediante acción sobre los factores de riesgo (evitar el estímulo iniciador y anticipar las complicaciones y las secuelas de la enfermedad) y, otro tercio, curarse (128). Esto es el resultado de décadas de investigación básica y aplicada.

La neoplasia más frecuente en la mujer en todo el mundo es el cáncer mamario (sólo el 1 % de los casos ocurre en hombres). Anualmente se diagnostican alrededor de 1.000.000 de nuevos casos en el mundo y 46/100.000 en Argentina, según datos de 2002 (127). En EE.UU., durante la década del 50', una de cada veinte mujeres desarrollaba este tumor. Actualmente, se estima que una de cada ocho lo padece. Entre las portadoras de neoplasias, los tumores mamarios constituyen la primera causa de metástasis a distancia y de muerte (129).

El cáncer también es una gran preocupación entre los propietarios de animales de compañía. Si bien en los últimos años se han logrado avances significativos en el área de la oncología veterinaria, las neoplasias continúan siendo la primera causa de muerte de los perros gerontes (5, 130, 131).

Estudios realizados en EE.UU., Canadá, Italia, Reino Unido, Suecia y Noruega informaron tasas de incidencia de neoplasias malignas en caninos, independientemente del sexo, de entre 380 y 950 cada 100.000 perros (132, 133, 134, 135). Una seria limitación en la rigurosidad de los estudios de incidencia en caninos es la dificultad para estimar el tamaño de la población base y sus características de sexo y edad. Además, algunos de estos estudios se realizaron en poblaciones de caninos asegurados, que probablemente difieren en varios aspectos, tanto de la población general de esos países como de las poblaciones caninas de otros (133, 134).

En las perras, los tumores mamarios son las neoplasias espontáneas más comunes y constituyen alrededor de 50 % del total. Existen discordancias entre las bases de datos de distintos países, entre otros motivos, por las diferentes costumbres referidas a la integridad sexual de las mascotas. En los EE.UU. la incidencia ha decrecido por la práctica común de la ovariectomía temprana (136, 137, 138), mientras que en países europeos, hispanoamericanos o asiáticos con alta proporción de hembras intactas, llega a 53,3 % (132, 133, 134, 139, 140, 141, 142).

En las gatas la prevalencia es menor, pero existe mayor proporción de tumores malignos (136, 137, 143).

El cáncer mamario se ha descrito en todos los grupos taxonómicos, tanto de mamíferos domésticos como salvajes (de vida silvestre o en cautiverio). Se consideran frecuentes particularmente en cánidos, félidos, mustélidos y, en menor medida, úrsidos. También se describieron en vivérridos, cetáceos y carnívoros marsupiales en cautiverio. Existen muy escasos datos referidos a ejemplares de vida silvestre (de las mismas familias y órdenes), a excepción de algunas especies monitoreadas por peligro de extinción, como el guepardo (*Acinonyx jubatus*), en la que no se informaron casos de neoplasias mamarias. La frecuencia es despreciable en ungulados, especialmente en el orden *Artiodactyla*. Estas diferencias permiten especular acerca del rol de la dieta y de otras variables del ambiente en el desarrollo de tumores, por ejemplo el manejo reproductivo (como la contracepción) en el caso de mascotas o ejemplares en cautiverio (144, 145). Se describieron similitudes clínicas, histológicas y de perfiles moleculares entre las neoplasias mamarias de la especie humana y de otros mamíferos estudiados. Estas similitudes abarcan diversos parámetros como la tasa de incremento de incidencia según la edad, las mutaciones en *BCRA-1* y *p53* y la sobreexpresión de *c-erbB-2*, entre otras (144, 146, 147).

Otras neoplasias de caninos como los carcinomas prostático, vesical y óseo se consideran modelos útiles de sus contrapartes en humanos por diversos motivos, como las similitudes farmacocinéticas de ciertas drogas en ambas especies (cisplatino, carboplatino,

doxorubicina, piroxicam). Además, cuando muchas mujeres ingresan a ensayos clínicos ya han desarrollado resistencia múltiple a drogas, a diferencia de las perras que, generalmente, no han recibido tratamientos quimioterápicos previos. Asimismo, la alta frecuencia de neoplasias mamarias espontáneas en las perras les confiere ventajas sobre otros modelos en que los tumores son, generalmente, inducidos de manera experimental (148).

Actualmente, las displasias mamarias de la perra están siendo estudiadas como posible modelo para las de la mujer, debido a su semejanza morfológica (147). Además, los estudios comparativos entre humanos y sus mascotas son de utilidad ya que estas últimas, debido a que comparten el medio ambiente y tienen un ciclo de vida menor, son posibles centinelas de los riesgos a los que los humanos se exponen (144, 146, 148). En un estudio se encontró una frecuencia significativamente incrementada de propietarias de perros entre mujeres con cáncer de mama comparadas con un grupo control (de edad ajustada), observación que les permitió a los autores especular acerca de la posibilidad de que el perro fuese portador de algún factor de riesgo para humanos respecto del cáncer de mama, como el virus del tumor mamario murino (MMTV) (149).

Neoplasias mamarias en los caninos.

Generalidades

Los tumores mamarios en animales domésticos se diagnostican mediante inspección y palpación. Pueden constituir el motivo de consulta o ser un hallazgo incidental durante el examen físico (138, 140).

El promedio de edad en el momento del diagnóstico clínico es de entre nueve y diez años. Son raros en perras menores de cinco años (136, 137, 138). La incidencia asciende de 62/100000 a 561/100000 en perras de 3-5 años y de 9-11 años, respectivamente (135).

Algunas razas se encuentran predispuestas a padecer carcinomas mamarios con mayor frecuencia: boxers, english springer spaniels, dachshunds, poodles, cocker spaniels, Yorkshire terriers, malteses, pointers, fox terriers y ovejeros alemanes (134, 142, 150, 151). En boxers, english springer spaniels y dachshunds el promedio de edad al diagnóstico es menor que en el resto (7,9 años) (151). Si bien la mayor frecuencia de tumores mamarios en las razas pequeñas, la proporción de neoplasias malignas es menor (142).

La frecuencia de neoplasias mamarias en machos es baja (136, 138, 140). Saba y sus colaboradores describieron recientemente ocho casos (con una edad promedio de 11,5 años). Siete de ellos fueron benignos y todos resultaron LN (-). Los autores estimaron, a partir de datos propios, que las hembras tienen 62 veces más probabilidades de desarrollar neoplasias mamarias que los machos ($OR= 62$) (152).

La mayor parte de las pacientes portadoras son hembras enteras u ovariectomizadas luego del segundo celo (138, 140). Los estrógenos y la progesterona juegan un rol crucial en el desarrollo de la glándula mamaria canina y están implicadas en la progresión tumoral en esta especie (139, 153, 154). Se constató una supervivencia más larga en pacientes ovariectomizadas menos de dos años antes del diagnóstico y extirpación de la neoplasia, que en aquellas hembras enteras o con ovariectomía anterior a ese periodo (139). Las perras que fueron tratadas con progestinas tienen un riesgo dos veces mayor de desarrollar neoplasias mamarias que aquellas que no recibieron tratamiento (153). Estas hormonas actúan, entre otros mecanismos, mediante la inducción de la secreción de la hormona de crecimiento por parte del epitelio mamario, y la consecuente liberación de *IGF-I*, local o sistémica. Tanto la

hormona del crecimiento como el *IGF-I* actúan como *GF* locales estimulando la proliferación celular en las neoplasias mamarias (154).

Las mamas abdominales caudales e inguinales son las de mayor desarrollo en cada ciclo y las más propensas a desarrollar desórdenes proliferativos (140). Las neoformaciones pueden ser únicas o múltiples; estas últimas se originan de manera simultánea o sucesiva, en la misma u otra mama, y usualmente son nodulares. Su evolución, generalmente, ocurre de semanas a meses y el tamaño tumoral varía ampliamente (137, 138, 140).

Desde el punto de vista clínico, las masas que se presentan con crecimiento rápido, ulceración, fijación a la piel y tejidos subyacentes se consideran malignas. Los pacientes suelen sufrir linfadenomegalia, emaciación y disnea. Las lesiones pequeñas, de crecimiento lento, circunscriptas, que no comprometen tejidos circundantes, se consideran benignas (neoplasias benignas o procesos hiperplásicos o displásicos) (155).

Las metástasis habitualmente siguen la vía linfática. Las células tumorales también pueden alcanzar los vasos sanguíneos, invadiéndolos directamente o a través del conducto torácico (137). La invasión linfática ocurre principalmente en la periferia del tumor. Si bien el drenaje linfático del tejido mamario canino es complejo, se considera al LN axilar como regional para las mamas torácicas y abdominales craneales (aunque la linfa proveniente de las mamas torácicas craneales también puede llegar al LN cervical superficial). Los LNs inguinal superficial (mamario) e ilíaco medio se consideran regionales para las mamas abdominal caudal e inguinal (118). Mediante linfografía se demostró que la mama abdominal craneal (el 3° par) drena habitualmente hacia ambos LNs (axilar e inguinal superficial), en escasas ocasiones solo al axilar y muy raramente solo al inguinal superficial. Además, pudo determinarse que si bien los vasos linfáticos que drenan mamas de ambas cadenas se encuentran en íntima aposición, no hay comunicaciones entre ellos (156). Las metástasis en el LN pueden producir linfadenopatía (linfadenomegalia, fijación a tejidos circundantes y/o cambio de consistencia). Cuando se realiza la mastectomía de glándulas abdominales e inguinales está indicada la extirpación del LN inguinal superficial. El LN axilar, en cambio, solo

se extirpa en caso de linfadenopatía. Raramente se producen metástasis en LN distantes sin haber antes afectado a los regionales (131, 136, 157). Las células tumorales aisladas o en grupos pueden quedar atrapadas en los LNs (la situación más frecuente en humanos y caninos) o pueden proseguir circulando y originar metástasis distantes; a esta condición se la denomina “salteo o elusión” de metástasis (*skip* o *bypass* metástasis) (137, 158). Es el caso de la mayoría de los tumores mamarios murinos, que desarrollan metástasis en los pulmones (56).

Las metástasis pulmonares pueden ser nodulares, difusas, radiadas o linfangíticas. En perros, el tiempo de duplicación de las metástasis pulmonares varía entre 8 y 31 días. Otros sitios de metástasis suelen ser el hígado, el cerebro y los huesos (estos últimos órganos menos explorados). Es improbable que se produzcan metástasis en otros órganos sin que también hayan ocurrido en el pulmón (137). A partir de las masas pulmonares suele haber implantación en las pleuras (metástasis trascelómica). En perras con carcinomas mamarios, las metástasis pulmonares (para las que, actualmente, no se ofrecen alternativas quirúrgicas) constituyen las causas habituales de muerte y la indicación más frecuente para la eutanasia (157).

El estudio radiográfico (con varias incidencias) sigue siendo el procedimiento estándar de diagnóstico de la enfermedad pulmonar metastásica. Las radiografías convencionales pueden detectar lesiones pulmonares de entre 5 y 8 mm de diámetro. Las lesiones menores pueden evidenciarse mediante tomografía computada, procedimiento que, en la actualidad, no es de rutina en medicina veterinaria (131, 138).

El porcentaje de metástasis pulmonares ya detectables en el momento del diagnóstico era de alrededor de 35 % hace unos treinta años. El mayor cuidado de los propietarios, entre otras causas, ha llevado a la detección más temprana de la enfermedad y estos valores descendieron hasta un 6 % (138).

Las pacientes con enfermedad metastásica avanzada habitualmente presentan signos sistémicos como letargia, fatiga y pérdida de peso. Otra consecuencia del fenotipo maligno son

las recidivas del tumor tras la remoción quirúrgica que indican que dicho procedimiento no eliminó la totalidad del tejido tumoral, ya sea debido a una técnica incorrecta o bien a un alto grado de infiltración tumoral. Esta última situación suele ocurrir dentro de los 6 meses de realizada la cirugía y se asocia a un pronóstico muy desfavorable (136, 157).

En un estudio reciente, el 58 % de las pacientes analizadas presentaron recurrencias en menos de un año luego de la cirugía, con una alta correlación entre la malignidad de la primera neoformación y la de la segunda. El TH del primer tumor no tuvo asociación con el tiempo hasta la recurrencia (159).

Aunque se han realizado numerosos intentos para desarrollar métodos bioquímicos, radiográficos e inmunológicos para el diagnóstico de la enfermedad neoplásica, el único procedimiento confiable y aceptable para el diagnóstico es el examen microscópico de las neoformaciones y los LNs regionales (158). Este análisis continúa siendo el “estándar de oro” desde hace más de 140 años en diagnóstico oncológico (155). Mediante el estudio histopatológico es posible clasificar a la neoplasia, conocer algunos datos referidos a su extensión local y estadificar al paciente de manera de evaluar la salud general y determinar la diseminación del tumor. Este análisis también permite la descripción de diversas características histológicas que se presume tienen, en mayor o menor medida, valor pronóstico.

Los informes acerca del porcentaje de neoplasias mamarias malignas de caninos sobre el total de tumores de la especie son discordantes: autores que consideran datos limitados a los EE.UU. informan entre 30 y 40 % (136, 137, 138, 155), en tanto que los que incluyen resultados de relevamientos en países europeos informan porcentajes de entre 40 y 74%. (132, 133, 134, 140, 141, 159). Itoh y sus colaboradores informaron que, en los estudios realizados en Japón, el porcentaje de neoplasias malignas oscila entre 34 % y 93 % (142). La proporción de estas neoplasias que ya habían desarrollado metástasis en el momento del diagnóstico varía entre 1/2 a 1/10 (155). La mayor parte de las metástasis son diagnosticadas menos de un año luego del diagnóstico del tumor primario (138).

Excepto para el carcinoma mamario inflamatorio, cuando se llega al diagnóstico presuntivo de neoplasia mamaria el tratamiento quirúrgico es el de elección, siempre que el animal presente buen estado general y los métodos complementarios no revelen metástasis a distancia (131, 136, 160, 161). Sin embargo, la alta tasa de mortalidad de las pacientes portadoras de neoplasias mamarias luego de su resección quirúrgica demuestra que esa intervención continúa siendo insatisfactoria (159). La extensión del procedimiento quirúrgico no influye en la supervivencia de las perras (131, 162).

No hay actualmente lineamientos aceptados para perras que requieren terapia adyuvante y existen pocos informes que relaten el éxito con terapia sistémica (131, 161). Se han realizado ensayos exitosos *in vitro* con carboplatino, cisplatino y ciclofosfamida, pero no hay estudios clínicos adecuados que documenten la eficacia de estos fármacos en caninos. En grupos pequeños de perras se llevaron adelante ensayos que tuvieron como resultado un aumento de la supervivencia de las pacientes tratadas con 5-fluorouracilo, doxorubicina o ciclofosfamida, con respecto a aquellas tratadas solo mediante resección quirúrgica (163, 131). Con el uso de tamoxifeno los resultados fueron variables, ya que muy pocos carcinomas de perras expresan REs. Además, surgieron complicaciones durante los ensayos por los efectos colaterales observados. Los ensayos con inhibidores de tirosin-quinasa se encuentran en fase I. La terapia radiante no fue comunicada en el tratamiento de neoplasias mamarias caninas. La inmunoterapia ha sido desalentadora (131).

En la población general, sin sesgo por raza, el porcentaje de perras vivas dieciocho meses luego del diagnóstico varía entre 50 y 90 % (164, 165). La supervivencia a dos años oscila entre 25 a 40 % (136, 138, 140), 54 % (166) y 75 % (142, 165). En una muestra de pacientes de razas pequeñas el 94 % de las perras se encontraba viva 2 años pos diagnóstico (142).

Clasificaciones de las neoplasias mamarias

Existen diferentes criterios de clasificación para las neoplasias mamarias: 1- las células/tejidos de origen (histogénético), 2- la estructura histológica de origen (alvéolos, ductos) y el patrón de

crecimiento (morfológico descriptivo), 3- el comportamiento biológico (pronóstico) y 4- el perfil genético.

1- La biología del epitelio mamario es compleja y los diferentes compartimientos celulares que originan neoplasias no están completamente definidos. La coexpresión de filamentos intermedios podría sostener la hipótesis del origen de las neoplasias a partir de células madres mamarias (167). Es dificultoso establecer una clasificación histogenética porque el tipo celular de origen muchas veces es incierto y existe controversia acerca del rol del mioepitelio en el origen de algunos tumores (155).

2, 3- La clasificación vigente entre 1974 y 1999 para los caninos (168) era absolutamente descriptiva e innecesariamente compleja, según Moulton (169). Basada en ella se estructuró, por ejemplo, la clasificación del CRHL (Laboratorio Colaborativo Radiológico de Salud) de la Universidad de Colorado, en la que se basaron trabajos de supervivencia posmastectomía como el de Benjamín y colaboradores (170). A excepción de los artículos anteriores a 1999 y de escasos trabajos posteriores llevados a cabo en Polonia y Taiwán, existe consenso en medicina veterinaria en no utilizar el término “adenocarcinoma” ni la nomenclatura utilizada en clasificación de cáncer de mama en humanos (158) de neoplasias “lobulillares” o “ductales” (137, 155). La clasificación actual (Organización Mundial de la Salud -OMS-, 1999) se basa en aspectos morfológicos que han sido simplificados y ha reclasificado las neoplasias más comunes en función de un grado creciente de malignidad, a la luz de los resultados de estudios realizados en el periodo, de manera que puede considerarse descriptiva-pronóstica (155) (tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de las neoplasias mamarias de los caninos según el tipo histológico (Organización Mundial de la Salud, 1999).

Benignas

- Adenoma (simple, complejo, basaloide)

- Fibroadenoma de baja o alta celularidad
- Tumor mixto benigno (con diferenciación epitelial luminal y mesenquimática)
- Papiloma ductal

Malignas

- Carcinoma *in situ* (no infiltrativo)
- Carcinoma complejo (células anaplásicas con diferenciación epitelial luminal y mioepitelial)
- Carcinoma simple (células anaplásicas con diferenciación epitelial luminal, con diversos patrones de crecimiento)
 - tubular-papilar
 - sólido
 - anaplásico
- Tipos especiales de carcinoma (de células fusiformes, de células escamosas -CCE-, mucinosos, ricos en lípidos)
- Sarcomas (fibrosarcomas, osteosarcoma, otros.)
- Carcinosarcoma (células anaplásicas con diferenciación epitelial luminal y mesenquimática)

Tumores no clasificados

Debido a las diferencias entre los métodos de diagnóstico clínico entre las medicinas humana y veterinaria (en particular la indicación de las mamografías regularmente -en ausencia de signos- en mujeres susceptibles), muchas neoplasias mamarias de mujeres miden escasos milímetros, en tanto que prácticamente todas las muestras que se analizan en laboratorios de patología veterinaria provienen de masas palpables y hasta visibles. Esto genera una menor frecuencia de hallazgos de lesiones incipientes o “*borderline*”, lo que reduce la complejidad característica de la clasificación para cáncer de mama en humanos.

La graduación de la malignidad y el pronóstico de la neoplasia basados en los factores clinicopatológicos (tamaño y localización del tumor, tipo histológico -TH-, presencia de metástasis en los LNs regionales) han sido largamente reconocidos. Sin embargo, a menudo no son suficientes para predecir con cierta precisión el pronóstico y la respuesta al tratamiento. En gran cantidad de neoplasias en caninos se han registrado ciertas inconsistencias entre las características histopatológicas y el comportamiento biológico (171).

4- En los últimos años el estudio del patrón de expresión de miles de genes mediante micromatrices de tejidos permitió clasificar a estos tumores en: basal, *c-erbB-2* (+), tipo mama normal, luminal A, luminal B y luminal C, con diferencias significativas en la supervivencia (mejor pronóstico para el luminal A). Los datos epidemiológicos acumulados sugieren que los diferentes tipos de cáncer mamario, según su perfil genético, tienen diversos factores de riesgo, lo que resulta en distintas vías patogénicas (por ejemplo, los portadores de mutaciones con alta penetrancia en *BCRA-1* tienen mayores probabilidades de desarrollar neoplasias del tipo basal, negativos para RE, RP y *HER-2*, con limitadas opciones terapéuticas) (172).

Marcadores tumorales y pronóstico.

Antecedentes en medicina humana y valor pronóstico en caninos

Se llaman marcadores tumorales a las sustancias detectables en tejidos tumorales o en fluidos corporales de pacientes con neoplasias. Según su origen, pueden ser sintetizados por las propias células tumorales o por otras, inducidas por ellas. Estas moléculas se clasifican en: moléculas nuevas, moléculas conocidas pero expresadas en forma ectópica, en cantidades

anómalas o en momentos del desarrollo diferentes del habitual y moléculas conocidas pero estructuralmente alteradas (incompletas o con alteraciones conformacionales). Idealmente, estos marcadores deberían reunir las siguientes características: ser producidos mientras el tumor está presente, ser específicos del tumor o el órgano, ser detectables en todos los pacientes con el mismo tipo de tumor (preferentemente en estadios tempranos) y tener una concentración paralela al crecimiento de la masa tumoral o a alguna característica asociada a la progresión (25, 173).

Estos marcadores se analizan en distintas muestras: tejido tumoral (histopatología, tinciones especiales, IHQ, micromatrices de tejidos, hibridación *in situ* -ISH-), fluidos o células aisladas, tales como raspados de la mucosa oral o linfocitos (para aislamiento de ADN). A partir tanto de tejidos como de fluidos pueden realizarse, por diferentes técnicas, análisis genómicos, proteómicos o del metaboloma. En el ADN pueden detectarse mutaciones de punto, inestabilidad microsatelital, expresión anómala de genes de reparación, alteraciones epigenéticas, translocaciones o amplificaciones. La *RT-PCR* para ARN permite encontrar cantidades elevadas de, por ejemplo, ARNm para el antígeno carcinoembrionario (*CEA*), en micrometástasis de cáncer de colon. El hallazgo de determinadas proteínas o metabolitos puede caracterizar un tipo tumoral o ser informativo con respecto a la progresión del tumor, entre otras posibilidades. Todos estos resultados deben interpretarse luego a la luz de los hallazgos clínicos, considerando la complejidad del organismo en estudio. Los objetivos del uso de los marcadores son: predecir la susceptibilidad de un individuo a un tumor en particular (*BRCA-1* y *2* en cáncer de mama familiar), establecer o confirmar un diagnóstico (paneles para melanomas, α -feto proteína para neoplasias hepáticas, *PSA* para carcinomas prostáticos), asignarles un grado de acuerdo a su agresividad y riesgo metastático, mejorar la clasificación (tumores linfoides según sus *CDs*, clasificación de tumor de mama por micromatrices de ADN), lograr una mejor estadificación (detección de micrometástasis -mediante anticuerpos específicos, citometría de flujo, *PCR*-), dar información pronóstica, monitorear la enfermedad en curso (detección de células tumorales circulantes), establecer o dirigir la terapia al predecir

la sensibilidad o resistencia del tumor, monitorearla (antígeno CA-125 para seguimiento del cáncer de ovario) o estudiar la biología de un tumor para aplicaciones posteriores (25, 171, 173).

Entre los marcadores tumorales, los marcadores de pronóstico son las moléculas capaces (en el momento del diagnóstico o de la cirugía y en ausencia de terapia adyuvante) de dar información sobre la evolución clínica que tendrá el paciente. El objetivo es asociar el marcador con el tiempo libre de enfermedad y de supervivencia global. Estos marcadores contribuyen a seleccionar grupos de pacientes con tumores cuyo comportamiento biológico será más homogéneo. De esta manera podrán identificarse pacientes cuyo pronóstico es tan bueno que la terapia adyuvante (luego de la cirugía) no justifica ni el riesgo ni el costo para el paciente e identificar pacientes cuyo pronóstico es tan pobre que la terapia adyuvante, aunque agresiva, lo beneficiaría. Los marcadores predictivos son moléculas útiles para seleccionar pacientes con alta probabilidad de responder exitosamente a un tratamiento determinado (ej: marcadores hormonales para la terapia de ablación endocrina).

Para el pronóstico en cáncer de mama, los marcadores (y otras características) se clasifican en categorías: 1- los que han demostrado tener importancia pronóstica y utilidad en el manejo clínico de los pacientes (estadificación TNM -considera tamaño y diseminación-, tipo histológico, receptores hormonales, grado histológico, recuento de figuras mitóticas) 2- aquellos cuyo valor necesita ser demostrado con mayor número de pacientes o tiempo de seguimiento más prolongado, como los marcadores de proliferación, *c-erbB-2 (HER2)*, la invasión de vasos sanguíneos y linfáticos por células neoplásicas, la expresión de p53 y 3- aquellos cuyo valor no se ha demostrado, como los marcadores de angiogénesis, la expresión de proteasas y su inhibidores, las moléculas de adhesión (*CD44*, integrinas, cadherinas), las moléculas de la *ECM* (fibronectina, laminina), la expresión de oncogenes y de sistemas *GFs/GFRs*, la expresión de *Bcl-2*, las micrometástasis en la médula ósea, la ploidía de ADN y la catepsina D, entre otros (173).

En medicina humana, en función de las características clínicas y los resultados de los marcadores encontrados en un paciente, se determina la conducta terapéutica a seguir, según criterios establecidos por convención.

Consideraciones acerca de algunas variables pronósticas

SISTEMA TNM

El sistema de estadificación utilizado para los tumores mamarios en medicina humana fue adoptado en 1989 por el Comité Americano en Cáncer (AJCC) y la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) (158) y actualizado periódicamente. En 2002 se introdujo la última modificación (158 bis). La estadificación se basa en el sistema TNM. Esta sigla deriva de los términos: tamaño del tumor (T), estado del linfonódulo regional (N) y metástasis a distancia (M). A partir del TNM se asigna el estadio del paciente del I al V, en orden de mejor a peor

pronóstico. El estadio I es el que se asocia a un mejor pronóstico. La designación TNM se utiliza para la clasificación clínica, en tanto que pTNM es la sigla que se refiere a la estadificación anatomopatológica. El término pN (en humanos) se ajusta según se detecten células aisladas o grupos pequeños (< 0,2 mm), micrometástasis (0,2 > 2mm) o macrometástasis y también en función del número de ganglios y nivel de la axila involucrados, y de la utilización de técnicas de IHQ o moleculares (158 bis). El sistema TNM y la consecuente estadificación que se aplican en medicina veterinaria se presentan en la tabla 2. Existen varias diferencias entre el sistema TNM utilizado en patología humana y el utilizado en patología veterinaria. Las más importantes se relacionan con el significado de los términos T₁, T₄, pN₁, N₂ ó N₃, entre otras (158). En general, en medicina veterinaria el TNM es posquirúrgico (157).

Tabla 2. Sistema TNM y estadificación de las pacientes utilizados en medicina veterinaria.

<i>T: Tumor primario (tamaño)</i>	
	T ₁ : < 3 cm
	T ₂ : 3 - 5 cm
	T ₃ : > 5 cm
<i>N: Estado del linfonódulo regional</i>	
	N ₀ : sin metástasis
	N ₁ : metástasis presentes
<i>M: Metástasis a distancia</i>	
	M ₀ : no existen metástasis detectables
	M ₁ : metástasis detectables

Tabla 2 (continuación)

Estadio	T	N	M
I	1	0	0
II	2	0	0
III	3	0	0
IV	cualquier T	1	

El significado pronóstico de esta forma de estadificación se discutirá desglosando sus términos.

Tamaño

En mujeres se ha informado acerca de una relación lineal entre el tamaño tumoral y las metástasis al linfonódulo (174, 175). La relevancia del tamaño tumoral como factor pronóstico en perras es variable (137). Algunos autores no encontraron diferencias notables en la supervivencia a dos años de perras con distinto tamaño tumoral (166), mientras que otros hallaron relación entre este parámetro y la supervivencia a 18-24 meses (142, 162, 176, 177).

Estado del linfonódulo

Existen diferentes métodos para estimar el estado del LN en relación con el desarrollo de metástasis. Aun con la utilización de diagnóstico por imágenes en mujeres, está establecido que la estimación clínica del estado del LN puede dar lugar a 30 % de falsos positivos y 40 % de falsos negativos (158, 178). Los habituales en medicina veterinaria son el examen físico y el estudio histopatológico luego de la resección del tumor y del LN satélite. Si bien lentamente se van produciendo progresos en la evaluación clínica de las perras con tumores mamarios (TM), actualmente los linfonódulos regionales son remitidos para estudio histopatológico solo en una proporción relativamente baja de los casos (138). Pueden realizarse aspiraciones con aguja fina (AAF) o con aguja gruesa del tipo Tru-Cut® (core-

biopsia), pero esta última no es habitual en la práctica clínica. En un estudio en 44 animales con diversas neoplasias sólidas, la AAF resultó de mayor sensibilidad (ss) y especificidad (sp) (100 % y 96 %, respectivamente) que el examen físico y la punción con aguja gruesa (179).

La tinción histológica de rutina con hematoxilina y eosina (H-E) no siempre permite la detección de micrometástasis ocultas (MMO) (47, 158, 180). Las células tumorales transformadas pueden presentar un aspecto similar a histiocitos, células inflamatorias o reactivas. Por el contrario, las técnicas de PCR e IHQ han demostrado una gran sensibilidad para su reconocimiento (47, 180, 181). Los marcadores de mayor importancia en la actualidad son los anticuerpos dirigidos contra citoqueratinas, que se consideran marcadores superiores respecto de CEA o EMA (61, 158). Las citoqueratinas forman filamentos intermedios citosólicos característicos de las células epiteliales normales o neoplásicas. En un estudio de improntas y AAF de LNs satélites de mamas de caninos con carcinomas, la inmunomarcación con anticitoqueratinas de amplio espectro AE1/AE3 resultó de mayor sensibilidad que la coloración de rutina (99 % y 88 % respectivamente) y de mayor valor predictivo. La especificidad no varió significativamente entre ambos (181). Entre el 9 % y el 20 % de los LNs considerados negativos presentaron micrometástasis cuando se realizó inmunomarcación con pancitoqueratinas, tanto en humanos como en caninos (61, 62, 178, 182).

En un estudio en caninos, en 65 de 77 LNs considerados negativos se observó marcación positiva para citoqueratinas en células compatibles con linaje epitelial. En cuatro de los 65 casos las micrometástasis también pudieron ponerse en evidencia mediante el examen de nuevos cortes con H-E (en los cuatro casos se trataba de acúmulos de más de 50 células). En dicho trabajo se consideraron émbolos a las células únicas o de a pares (10 de 65). De las restantes 55, en 49 casos se trató de acúmulos de menos de 50 células. (183).

En aproximadamente 16 % de las pacientes con LN (-) se constató recurrencia en menos de cinco años. Esta discrepancia entre el estado del LN y la progresión de los tumores puede atribuirse a que la enfermedad neoplásica pudo haber sido sistémica desde el momento del diagnóstico sin compromiso de los LNs, a que los LNs involucrados pudieran no haber sido

examinados o a que las metástasis en los LNs examinados no hubieran podido ser detectadas. La obtención y examen de cortes adicionales permitió detectar hasta 33 % más de LN (+) (178).

El estado del LN, junto con el tamaño tumoral, son los predictores más importantes relacionados con la supervivencia en cáncer de mama en humanos, considerándose parámetros pronósticos de manera independiente y aditiva (44, 45, 174). El pronóstico también está influenciado por el número de LNs afectados, de manera que los pacientes generalmente se clasifican en las siguientes categorías: 1-3, 4-9 y 10 o más LNs afectados. El estado del LN tiene fuerte impacto en la supervivencia de perras con cáncer mamario (136, 138, 162).

La importancia del tamaño de los focos metastáticos fue motivo de análisis para varios investigadores, tanto en mujeres como en perras. En artículos de fines de la década del 70, se informó peor pronóstico para las pacientes con macro vs micrometástasis, e incluso se asimiló el pronóstico de estas últimas con las pacientes con LN (-). En estudios posteriores la controversia acerca de la importancia del hallazgo de micrometástasis continuó: mientras unos autores constataron tiempos de supervivencia similares entre aquellas con micro y macrometástasis (en ambos casos mucho menores que las pacientes con LNs negativos), otros no encontraron relación entre la presencia de micrometástasis detectadas mediante IHQ y las metástasis distantes o la supervivencia (158, 182, 184). La distinción entre el hallazgo de micrometástasis y el de células carcinomatosas aisladas en los LNs podría considerarse una distinción entre LN (+) y LN (-) (pN1mi y pN0 i+, respectivamente) y, en ese caso, se prevendría el “sobret ratamiento” de pacientes con escaso compromiso del LN (158 bis, 185). Según el estudio de Reed las micrometástasis, pero no las células aisladas, se asociaron con LN positivos adicionales y menor tiempo hasta la recurrencia (186).

Dentro del grupo de pacientes con LN (+), el pronóstico también es influenciado por el tamaño, el grado histológico (GH), la cantidad y características de las regiones organizadoras nucleolares afines a la plata (*AgNORs*) y el índice de actividad mitótica (IAM), parámetros con los que se informó correlación positiva (174, 175, 187, 188). Se encontraron diferencias

significativas en la supervivencia a 5 años entre pacientes con hasta 3 vs 4 o más LN (+) (189). No se halló correlación entre el hallazgo de micrometástasis en el LN y en otros órganos blancos, como la médula ósea (190).

La supervivencia media luego de una recidiva en pacientes LN (-) en el momento del diagnóstico fue de 42 meses, comparada con los 15 meses en pacientes LN (+) (191). En estudios de supervivencia global y libre de enfermedad a 20 años, la positividad del LN resultó el parámetro de más valor en pacientes T₁ y T₂, si bien no resultó relevante para pronóstico en neoplasias T₃ (174).

Los tratamientos sistémicos pueden mejorar la supervivencia y se ofrecen a los pacientes con LN (+). En pacientes LN (-) es necesario establecer el equilibrio entre riesgos (toxicidad asociada) y beneficios del tratamiento, especialmente para el estadio I (T₁N₀M₀). Dentro de este grupo, es necesario estudiar qué otros parámetros sirven para identificar a las pacientes de peor pronóstico que podrían beneficiarse con la quimioterapia adyuvante, ya que en el 20-30 % de las pacientes con LN (-) aparece recurrencia en menos de 10 años (175).

Tipo histológico

Se trata de un marcador de categoría 1. En tanto que algunos autores le adjudican valor pronóstico al TH con respecto a la supervivencia de las perras (155, 162, 166), otros no lo consideran de esa manera (176, 177).

La clasificación vigente de la OMS presenta los distintos THs de carcinomas invasivos en orden creciente de malignidad, de manera que se considera el siguiente continuo: carcinomas complejos (CC), carcinomas simples (Cs) tubulares, papilares, sólidos y anaplásicos, tipos especiales de carcinoma (de células fusiformes, de células escamosas - CCE-, mucinosos, ricos en lípidos) y carcinosarcomas o tumores mixtos malignos (CS)³. La mayor parte de las neoplasias malignas son epiteliales (carcinomas) (155).

³ no se enumeran aquí los carcinomas *in situ* ni los sarcomas

Los CC son usualmente lobulados y están constituidos tanto por componentes epiteliales luminales como mioepiteliales. Las células “de tipo epitelial luminal” pueden encontrarse dispuestas según un patrón tubular, papilar o sólido. Las células fusiformes “tipo mioepitelio” frecuentemente se organizan con un patrón más o menos reticular o estrellado. Se observa cantidad variable de matriz extracelular mucoide y puede observarse metaplasia, generalmente condroide.

Los Cs están compuestos por células con diferenciación exclusivamente epitelial luminal. En función de su patrón de crecimiento y de otras características se clasifican en tubulopapilares (subtipos tubular y papilar), sólidos y anaplásicos. La proporción de estroma y las áreas de necrosis son variables, y frecuentemente se observan linfocitos peritumorales.

En los CS se reconocen componentes malignos tanto epiteliales como mesenquimáticos y la metaplasia condroide u osteoide es habitual.

Entre los tipos especiales de carcinoma mamario se encuentran: los carcinomas de células escamosas (CCE), los mucinosos, los ricos en lípidos y los de células fusiformes. Los CCE consisten en cordones celulares o grupos celulares compactos con áreas de cornificación. Habitualmente sus células exhiben marcada atipía. Los carcinomas mucinosos se caracterizan por la presencia de abundante material de esas características, secretado por las células epiteliales o mioepiteliales. Las células tumorales suelen ser poliédricas con citoplasma espumoso. El carcinoma rico en lípidos es extremadamente raro y se caracteriza porque sus células tienen un citoplasma grande, con abundantes inclusiones de lípidos neutros. En el carcinoma de células fusiformes, éstas se disponen en grupos envueltos por fibras reticulares; es probable que en algunos casos las células tumorales sean mioepiteliales (137, 155).

Se han desarrollado tres hipótesis con respecto al origen del cartílago y del hueso en las neoplasias complejas y mixtas: metaplasia a partir de células epiteliales, a partir de tejido conectivo propiamente dicho o a partir de mioepitelio (155). Esta última hipótesis se sustenta, entre otros hallazgos, en la demostración de la proteína morfogenética del hueso-6 (*BMP-6*) y

sus receptores en algunos carcinomas de humanos como los mamarios y salivares, predominantemente en células mioepiteliales (192). Las *BMPs*, miembros de la superfamilia de los *TGF- β* , son factores de inducción involucrados durante el desarrollo en la diferenciación celular (por ejemplo, de células osteoblásticas y de queratinocitos), la formación ectópica de cartílago y hueso, la inhibición de la proliferación y la migración y la inducción de apoptosis, entre otros procesos (193). La metaplasia escamosa de carcinomas mamarios originalmente glandulares se explicaría también por la expresión de *BMPs* (2, 5 y 6) (192).

Los carcinomas mamarios que involucran células mioepiteliales son raros en seres humanos (158). Sin embargo, entre el 2 y el 18 % de los carcinomas ductales muestran diferenciación mioepitelial en esta especie. El 50 % exhibe un comportamiento maligno (125). Se realizaron estudios comparativos entre carcinomas de glándulas salivales de humanos y carcinomas complejos mamarios de perras, ambos caracterizados por la presencia de elementos epiteliales y mioepiteliales en un estroma mesenquimático de constitución variable, generalmente mixoide o mixocondroide. También comparten el patrón IHQ característico de marcación con citoqueratinas, vimentina, E-cadherinas y β -cateninas (194).

En humanos, se considera que las células mioepiteliales son “resistentes a la transformación” por la baja frecuencia de los tumores que las involucran. Esto podría atribuirse a que se trata de células con poca actividad mitótica, en comparación con las luminales. Se han informado escasas alteraciones genéticas en estas células (125). Ciertas evidencias sugieren que las células mioepiteliales tienen un fenotipo supresor tumoral, ya que suelen originar tumores benignos. Estas células actuarían como inhibidores paracrinos de la proliferación, invasión y angiogénesis e inductores de apoptosis (122, 126). Algunas de las proteínas involucradas en estos fenómenos de supresión son la proteína supresora tumoral maspin, la α -actina de músculo liso, la trombospondina-1, la α -VI-integrina, la conexina 43, el *bFGF-R* y la caveolina-1, entre otras (27, 122). Este rol inhibitorio obedece a que en las neoplasias que involucran células mioepiteliales predomina la síntesis de *ECM*, un “reservorio natural” de inhibidores de angiogénesis, sobre su degradación. En líneas celulares de este

fenotipo se encontró una alta expresión constitutiva de genes para inhibidores de proteasas en comparación con células no mioepiteliales (124, 126). No obstante, los informes que analizaron el perfil de expresión génica asociaron el fenotipo basal (basaloide, mioepitelial) con tumores negativos para RE y peor pronóstico (172).

En felinos, en los que los carcinomas mamarios complejos son raros (7 %), el periodo de supervivencia global de las pacientes portadoras de este tipo de neoplasia es marcadamente superior al de las portadoras de otros carcinomas mamarios invasivos (143).

En perras, ratas y ratonas los tumores de células mioepiteliales son relativamente frecuentes (entre 20 y 60 %) y, según la clasificación presentada, se consideran los carcinomas de mejor pronóstico (87, 137, 142, 155, 162). La mayor parte de los carcinomas complejos son de GH I, e independientemente del grado, la supervivencia es alta. Según Karayannopoulou (2005), ninguna perra con carcinoma complejo murió en un periodo de 2 años posmastectomía (166). En cambio, según Misdorp (2002), la supervivencia de las portadoras de carcinomas complejos es de diez meses en promedio (137).

Los carcinomas simples se consideran los más frecuentes y los más malignos (140, 142, 195). En nuestro medio, en un trabajo que abarcó el periodo 1960-1979 se informó que el 53 % de los tumores mamarios malignos eran simples (150). En el estudio de Karayannopoulou (2005) el 50 % de los carcinomas simples resultaron de GH III. El 70 % de los Cs grado II y el 89,3 % de los grado III murieron antes de los 2 años posmastectomía (166). Los carcinosarcomas son muy infrecuentes (137, 138). En una muestra pequeña, sin embargo, Yang informó alrededor de 30 % de CS (195). Habitualmente, estas neoplasias originan metástasis dentro del primer año de diagnóstico (138).

Grado histológico

Se conoce como grado histológico el puntaje asignado a una neoplasia en función de la evaluación morfológica de su grado de diferenciación. Consiste en la evaluación semicuantitativa de tres parámetros: formación de túbulos, pleomorfismo nuclear y recuento

mitótico. En medicina humana es de utilidad la escala de Elston y Ellis, una modificación de la de Bloom Richardson que, mediante la introducción de definiciones más precisas para la asignación de puntajes, permite reducir la subjetividad propia del método (tabla 3) (196).

Tabla 3. Clasificación de las neoplasias mamarias según el grado histológico (Elston, 1991).

Parámetro	de	categorías posibles	p
formación de túbulos		> 75 %	1
		10 - 75 %:	2
		< 10 %	3
pleomorfismo nuclear		núcleos pequeños, regulares, cromatina uniforme	1
		incremento en la variabilidad de forma y tamaño	2
		pleomorfismo y anisocariosis marcados, nucleolos evidentes	3
recuento mitótico *		0 -5	1
		6- 10	2
		> 11	3

Puntuación	GH
3 – 5 puntos	I
6 – 7 puntos	II
8 – 9 puntos	III

(*) : figuras mitóticas en 10 campos de observación Obj. 40 X.

La asignación de grado que sugiere Misdorp para los tumores mamarios en caninos adolece de mayor subjetividad ya que los términos utilizados (“pocos túbulos” o “marcada formación tubular”, entre otros) son poco precisos (137).

Se trata de una característica relativamente sencilla de evaluar y de bajo costo. La gradación mediante este método mostró una fuerte relación con el pronóstico en series de gran cantidad de pacientes con seguimiento por largos periodos (196). El mismo método

aplicado a casos de carcinomas mamarios en felinos resultó de valor pronóstico para la supervivencia al cabo de un año (197). La objeción que se le realiza es que adolece de mayor subjetividad que otros parámetros al ser la suma de tres características, una de ellas, el pleomorfismo nuclear (y las características nucleolares), de difícil reproducibilidad (198). Para otros, es aceptablemente reproducible (175, 199).

En neoplasias LN (-) se informó relación entre GH, supervivencia libre de metástasis y supervivencia global a seis años (198, 199). También se informaron diferencias importantes en la aparición de metástasis tempranas entre pacientes con GH I y II vs pacientes GH III, con mayor influencia del pleomorfismo que de los otros parámetros (175). Según Kato, el GH sigue en importancia al estado de los LN para predecir la supervivencia libre de enfermedad a 20 años en tumores T₁ o T₂. En cambio, no parece ser un factor con valor pronóstico en T₃ (174).

Tomando para su evaluación las tres características por separado, existe coincidencia en que la formación de túbulos, considerada aisladamente, no es de valor pronóstico, a diferencia de los otros dos componentes del GH (175, 198).

La proporción de neoplasias de GH I, II y III varía entre 1: 1: 1 y 1: 0,5: 0,2 (87, 166).

En caninos, el 10 % de las neoplasias GH I presentó metástasis a LN y la supervivencia a dos años fue del 100 % (independientemente del TH), en tanto que el 60 % de las de GH III presentó LN (+), y la supervivencia fue solo del 4 %. Las de GH II mostraron valores intermedios (166). En caninos y felinos se encontró asociación entre un GH mayor y una DMV alta (87). En otros artículos referidos a la determinación y relevancia del GH en neoplasias mamarias de caninos, el concepto "grado histológico" denotaba un atributo de las neoplasias diferente al aquí planteado. En esos trabajos se consideraron: GH, estadio histológico o grado histológico de invasión como expresiones equivalentes, y este parámetro se determinó considerando la diferenciación celular y la ausencia o evidencia de invasión al estroma y a los vasos (165, 176, 200).

Proliferación celular

La estimación de la proliferación celular por diversos medios es de utilidad para evaluar el comportamiento biológico y el potencial de malignidad de los tumores (171, 201, 202). En los pacientes con LN (-) los marcadores de proliferación se consideran de importancia para el pronóstico (174, 188, 203), si bien no todos los estudios lo confirman. Las causas de la falta de acuerdo podrían explicarse por las diferencias de procesamiento de muestras, selección y seguimiento de pacientes. Los métodos disponibles no solo difieren en aquello que detectan sino también en las fases del ciclo celular que permiten identificar. Por lo tanto, muy a menudo producen diferentes resultados (171, 203).

Entre los diferentes parámetros estudiados y técnicas desarrolladas se encuentran el índice de actividad mitótica (IAM), la marcación de fase S por técnicas de incorporación de bases pirimídicas (como la timidina tritiada o su análogo, la bromodesoxiuridina -BrDU-), la citometría de flujo, la *ISH*, la marcación histoquímica (HQ) e IHQ de diversas moléculas y la ploidía celular (171, 203).

En mujeres, no se encontraron diferencias significativas entre las que desarrollaron o no metástasis, en función de su índice mitótico (175). El IAM, estudiado en neoplasias T₁N₀M₀ se asoció más estrechamente con la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad en pacientes menores de 55 años que en mayores de esa edad (la asociación es dependiente de edad) (203). Los pacientes con IAM igual o mayor que 10 tuvieron una supervivencia pobre (entre 28 y 30 % de muertes en el periodo de 10 años). El 92 % de aquellos con IAM menores que 10 sobrevivió diez años o más. Van Diest y su grupo, en su trabajo de revisión, propusieron que el recuento de figuras mitóticas es el pronosticador independiente más convincente y reproducible en carcinomas mamarios invasivos (202).

El marcador HQ más utilizado lo constituyen las regiones organizadoras del nucleolo (*NORs*). Las *NORs* son segmentos de ADN que codifican para ARN ribosómico y, por lo tanto, están directamente relacionadas con la síntesis proteica y la proliferación celular. Las *NORs* activas se asocian a proteínas que reaccionan con el nitrato de plata por lo que, habitualmente,

se las menciona como AgNORs. Las estructuras positivas se observan como un precipitado negro en los núcleos interfásicos, más numerosas en células en proliferación, o como constricciones secundarias en los cromosomas metafásicos acrocéntricos (205).

La cantidad de ADN sintetizado se estudia mediante análisis de ploidía (164, 171, 201). La existencia de altos niveles de síntesis de ADN en células neoplásicas mamarias se han asociado con probabilidades mayores de metástasis en el LN (199).

La identificación IHQ de antígenos específicos de las células en división (como las proteínas Ki67, topoisomerasa II α , geminina, ciclinas y *PCNA*) en neoplasias primarias o metastásicas ofrece una aproximación para evaluar la fracción proliferativa de células (202, 204). Estos métodos son poco costosos, rápidos, técnicamente simples y constituyen una buena alternativa para los laboratorios de patología frente a la citometría de flujo, porque pueden ser utilizados en tejidos incluidos en bloques de parafina (164, 202, 204, 206, 207).

La proteína Ki67 es una proteína no histónica heterodimérica presente en la matriz nuclear. Si bien su función aún no se ha esclarecido totalmente, se cree que podría contribuir a la condensación de cromosomas y estar involucrada en la fragmentación de la envoltura nuclear durante la división celular. Puede evidenciarse desde G₁ tardío, durante toda la interfase y hasta la mitosis (pico de concentración). Inmediatamente después deja de detectarse debido a su corta vida media. Las células en G₀ no expresan Ki67 (204).

En tumores mamarios caninos, los índices obtenidos con Ki67 discriminan adecuadamente entre neoplasias benignas y malignas (195) si bien, en tumores malignos, no se encontró correlación con la marcación de fase S por reemplazo con BrDU, (el estándar de oro en pruebas de proliferación) de manera regular (206).

El antígeno nuclear de proliferación celular (*PCNA*) es de importancia como marcador diagnóstico y pronóstico en cáncer. Se trata de una proteína nuclear de 29 Kda que participa en varias vías moleculares responsables de la vida y muerte celulares. Durante la fase G₁ se forman las horquillas de replicación mediante reacciones sucesivas entre las que se encuentran la activación y reclutamiento de diversas proteínas, como *PCNA*, y otros factores.

Esta proteína pertenece a una familia de abrazaderas deslizantes, estructural y funcionalmente conservadas durante la evolución, que conforman un complejo de anillos homotriméricos que corren libremente en ambas direcciones de la hebra de ADN. *PCNA* es esencial para la replicación, ya que permite una firme asociación de las polimerasas replicativas con el ADN (se une a la subunidad catalítica de la polimerasa- δ) (208). Así, se maximiza el número de nucleótidos que adiciona una polimerasa en un tiempo determinado, ya que previene la disociación enzima-ADN (209). También coordina el procesamiento y unión de los fragmentos de Okazaki. Aparentemente, el *PCNA* persiste luego que la síntesis de ADN se ha completado y promueve la ubiquitinación de factores de iniciación para evitar la re-replicación. Además, controla mecanismos que la célula ha desarrollado para evitar la replicación de sitios defectuosos e interviene en procesos de señalización celular mediante unión con cadenas de poliubiquitina (208, 209).

Mediante la realización de electroforesis en dos dimensiones en geles de poliacrilamida (*2D-PAGE*) se pusieron en evidencia dos isoformas de *PCNA* en células de carcinomas mamarios: una con punto isoeléctrico (pI) ácido (*caPCNA*) y otra con pI básico (*nmPCNA*), en tanto que en células normales de mama se observó sólo una -la *nmPCNA*-). Se considera más probable que la *caPCNA* se hubiera originado a partir de una modificación postraduccional que de una mutación (210).

Los anticuerpos comerciales disponibles interactúan con ambas isoformas. En 2006 Malkas desarrolló un anticuerpo que detecta específicamente la isoforma *caPCNA* propia de tejidos tumorales, que podría ser de utilidad como marcador diagnóstico en el futuro (211).

La expresión de *PCNA* se incrementa en tumores de rápida proliferación (209, 212). Los altos valores de *PCNA* comparados con los de Ki67 podrían explicarse por marcaciones positivas en células en reparación. La expresión de Ki67 y la de *PCNA* tienen correlación positiva en tejido mamario normal y en neoplasias mamarias benignas en caninos. En tumores mamarios malignos algunos autores encontraron correlación y otros no (164, 165, 202, 207).

En tumores mamarios malignos se han informado valores de *PCNA* de entre 60-94 % en humanos y en caninos de hasta entre 14,5 % y 75 % (146, 206). Se considera que las notables diferencias en los valores informados por diferentes grupos de trabajo, tanto en humanos como en caninos, obedecen a diferencias metodológicas entre las que se cita la recuperación de antígenos.

En varias neoplasias de caninos (mamarias, de glándulas perianales, de células fusiformes, melanocíticas) se ha puesto de manifiesto la capacidad del *PCNA* para distinguir neoplasias benignas de sus contrapartes malignas (164, 171).

En un trabajo realizado con carcinomas mamarios de caninos, se encontró correlación entre la marcación con Ki-67 y *PCNA*. Solo se estableció correlación entre ambas con respecto a la marcación con BrdU en neoplasias secundarias (206).

El índice de proliferación medido por *PCNA* tiene un valor pronóstico aceptado como de categoría 2 (valor potencialmente predictivo) para las neoplasias mamarias de la mujer (173). Tanto en tumores de caninos como de humanos se informó correlación entre el número de células positivas y la malignidad histopatológica (146, 201).

En mujeres premenopáusicas (pacientes con peor pronóstico) el IP medido con *PCNA* es mayor que en posmenopáusicas (146). Por el contrario, en caninos, la correlación entre edad e IP es positiva (164). En cambio, el hallazgo de correlación entre tamaño tumoral e IP es variable entre los distintos autores (164, 187, 201).

Con respecto a los IP de distintos TH, las diferencias para algunos estudios no fueron significativas sino que se encontró superposición de los desvíos estándar que no se resuelven como para encontrar puntos de corte (164, 201, 207).

El IP se relaciona con GH (164, 187), así como con invasión vascular (187) y con estimadores de angiogénesis como la expresión del *VEGF* y la DMV (100, 213).

No se encontró correlación entre IP y hallazgo de metástasis en los LNs (164, 201). La estimación de la supervivencia mediante IP ha arrojado resultados inconsistentes. Según Paunesku, a mayor IP menor supervivencia libre de enfermedad (212). En caninos Löhr

informó que *PCNA* fue el factor de mayor peso luego del estado del LN, del TH y del tamaño (207). En otro estudio en perras, luego de un seguimiento de 18 meses, no se halló correlación entre IP y muerte relacionada con la neoplasia (muerte RN) (164).

El IP mediante *PCNA* también ha sido estudiado en caninos como marcador pronóstico en linfomas, tumores melanocíticos, seminomas y mastocitomas. En estos dos últimos se estableció relación entre el IP y el comportamiento biológico agresivo (171, 214).

En estrecha relación con el potencial replicativo ilimitado característico de las células tumorales se encuentra la inmortalización o bloqueo de la senescencia mediado por telomerasa. La actividad de telomerasa, medida en cortes de carcinomas mamarios de caninos, se correlaciona con el IP obtenido por *PCNA* y podría ser de valor para predecir su agresividad (201). Las señales que inducen o inhiben la proliferación pueden provenir de moléculas de adhesión. En caninos se encontró disminución en la marcación de conexinas y de E-cadherinas en tumores con alto índice de proliferación (200, 215).

Invasión tumoral a los vasos

Es relativamente frecuente el hallazgo de émbolos neoplásicos en vasos peritumorales (EN), pero su influencia en el desarrollo de metástasis en el LN es controversial (44, 45). En ocasiones es difícil diferenciar vasos con émbolos de pseudoémbolos de células tumorales (artefacto por separación de alveolos mamarios de su lámina basal) debidos a una deficiente fijación de los tejidos (187).

Si bien la presencia de EN no se ha incorporado como parámetro pronóstico en los lineamientos para terapia adyuvante, se encontraron diferencias altamente significativas entre pacientes con o sin émbolos en cuanto al desarrollo de metástasis a diez años. Además, se calculó que es 8,21 veces más probable que sobreviva seis años una paciente LN (-) sin invasión tumoral en los vasos que otra LN (-) con émbolos tumorales intravasculares (OR= 8,21) (175, 199).

En caninos, a diferencia de lo que ocurre con la infiltración a tejidos circunvecinos, no se ha demostrado relación entre la invasión a los vasos y el pronóstico (155).

La frecuencia informada de EN en carcinomas mamarios en caninos varía entre 1,6: 10 a 4: 10 (87, 142, 165, 176, 200).

Algunos autores informaron correlación entre el hallazgo de EN y la disminución en las probabilidades de supervivencia a 18 y 24 meses (142, 162, 165, 176, 200). Las probabilidades de supervivencia a 18 meses con o sin EN fueron entre 0,4 y 0,7 en el trabajo de Itoh y de 0,6 y 0,94 en el de Sarli (142, 165).

En neoplasias primarias en humanos, la mayor DMV se relacionó con el hallazgo de EN (216, 217). En caninos no se halló relación entre ambos (87).

Abastecimiento sanguíneo

Las aplicaciones de la estimación de la angiogénesis tumoral son de dos tipos: la cuantificación del proceso con fines diagnósticos y pronósticos y su eventual inhibición o modificación (111). El método por el cual se estima el proceso debe ser cuantificable y reproducible en casos clínicos. Éste, como otros procesos, puede medirse mediante la cuantificación de sus resultados (recuento de la densidad de microvasos en cortes histológicos del tumor: DMV) (68, 79, 216, 218) y/o midiendo la expresión de algunos de los factores involucrados en la señalización (*GFs*, receptores, etc) (94).

En 1991, el trabajo de Weidner sentó las bases para proponer la angiogénesis como factor independiente pronóstico del progreso de la enfermedad en cáncer de mama y estimarla mediante un método sencillo y económico, la DMV (68).

La marcación de vasos mediante IHQ y su recuento es la técnica más difundida (94). Es necesario recordar que la expresión “densidad vascular” no es equivalente al término “angiogénesis”, ya que en el recuento pueden estar considerándose vasos preexistentes (74). Como se ha presentado en las páginas 23 a 25, tampoco angiogénesis y abastecimiento vascular son expresiones equivalentes.

Otras características de utilidad pueden ser: el área microvascular total (AMT, área ocupada por microvasos por unidad de área del tumor en un número limitado de campos), el tamaño de los vasos, los parámetros de tamaño y forma (longitudes axiales, perímetro y factor de forma, entre otros) y el tipo de red vascular (redes vasculares con bucles cerrados, vasos glomeruloides bizarros y patrón capilar clásico). Frente al hallazgo de mímica vascular, el patrón de distribución de los canales vasculares tiene relación con el pronóstico (67, 74, 216).

Se entiende por DMV el valor promedio de recuento de microvasos o células aisladas (marcados con un anticuerpo anti-algún componente endotelial) en un número limitado de campos dentro del tumor. Los resultados se expresan como DMV media por campo o DMV/mm². Se ha informado y descrito un abanico de posibles variantes metodológicas. Muchos años después, un problema sigue siendo qué contar. Los distintos autores consideraron, o no, como positivos, a las células positivas aisladas, en cordones u otros grupos, o sólo las estructuras con lumen (189).

La investigación en búsqueda de un marcador endotelial representa un emprendimiento de larga data. Antes del desarrollo de la IHQ se realizaban análisis histoquímicos en tejidos tumorales que se marcaban con enzimas (fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida y β -glucuronidasa) (219).

El modelo metodológico de Weidner 1991 consiste en la inmunomarcación de las células endoteliales con anticuerpo anti-factor de von Willebrand (*vWf*). Tanto las células como las estructuras cordonaes sin luz o los vasos se cuentan como elementos positivos. Se buscan las áreas más vascularizadas, llamadas "*hot spots*". Se observan en 20X y 40X. Otros vasos (con pared desarrollada) se utilizan como controles internos. Se establece un grado subjetivo de 1+ a 4+ (68).

Con respecto a los marcadores para endotelios, la proteína inmunológicamente detectable en células endoteliales más conocida es el *vWf*, que probó ser altamente específica en tejidos normales o neoplásicos de tumores no vasculares. Por el contrario, en neoplasias de vasos sanguíneos (hemangiosarcomas, entre otros) su distribución es impredecible e

inconstante, de manera que es poco sensible (219). Si bien marca más intensamente los vasos sanguíneos, también se detectan los vasos linfáticos. A pesar de ciertos inconvenientes metodológicos, sigue siendo el marcador más usado (174, 187, 189, 214, 220). La necesidad de reconocer endotelios neoplásicos llevó al desarrollo de otros anticuerpos, como el anti-CD31, de la superfamilia de las inmunoglobulinas (que también puede reaccionar con fibroblastos y células plasmáticas) y el anti-CD34, antígeno que también expresan las células hematopoyéticas. La lectina UEA-1 (aglutinina 1 de *Ulex europaeus*), que se une a residuos de fucosa del antígeno H, es útil en tejidos de humanos y de diversos mamíferos domésticos, a excepción de los caninos (219). El marcador CD105, una proteína transmembrana del sistema de receptores $TGF-\beta$, tiene mejor correlación con la predicción de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia total que los marcadores panendoteliales, como CD31 (67).

Los trabajos de diversos autores difieren en el anticuerpo utilizado, la magnificación de la observación y la cantidad de campos de recuento y la unidad en que se expresaron los resultados, entre otros parámetros. También se registraron variantes respecto del método de recuento, ya que en algunos artículos se cita que lo realizó un observador, dos o más -en todos los casos o en casos de discrepancia-, con o sin grillas, o mediante análisis computarizados (39, 174, 189, 213, 214, 216, 220). Si bien la morfometría mediante *software* permite medir diferentes parámetros y archivar las imágenes, el conteo en el microscopio con observadores tiene precisión y reproducibilidad razonables (216, 221). La proporción de estudios con correlación positiva entre DMV y progresión del tumor fue la misma entre trabajos con un solo observador o con dos o más, se usara o no cuadrícula (189).

La primera evidencia de que la magnitud de la angiogénesis en un tumor humano era de utilidad para predecir la probabilidad de metástasis se informó respecto del melanoma cutáneo. Las neoplasias más angiogénicas tienen más probabilidades de originar macrometástasis, mientras que las menos angiogénicas suelen originar micrometástasis latentes (222).

Curiosamente, en algunas neoplasias, a pesar de la evidencia de ser altamente angiogénicas (marcada regulación positiva del *VEGF*, por ejemplo), las muertes debidas a metástasis son extremadamente raras. Un ejemplo de ello es el retinoblastoma. Es posible que las células tumorales no tengan el fenotipo necesario para invadir esos nuevos vasos o sobrevivir en otros territorios (187).

En carcinomas prostáticos, la DMV se correlacionó con el riesgo de metástasis y la puntuación de Gleason, particularmente cuando los vasos fueron marcados con anti *CD34*. La DMV se correlacionó con el estadio clínico en el linfoma B no Hodgkin. En el carcinoma ovárico de estado avanzado fue mejor predictor de supervivencia (tanto global como libre de enfermedad) que el estadio clínico, grado y tipo tumoral. También se observó correlación con el pronóstico en carcinomas de endometrio y gástrico. En carcinomas vesicales la DMV se considera un factor independiente de pronóstico sólo en aquellos de tipo B (con invasión al músculo detrusor) (67). En el carcinoma colorrectal la DMV y la supervivencia se relacionan de manera inversa (223). En otras neoplasias como los gliomas y los carcinomas de células no pequeñas del pulmón los resultados son inconstantes. Existen diferentes opiniones acerca del valor pronóstico del uso de la DMV en algunas neoplasias como el melanoma uveal, ya que la posibilidad de otras formas de abastecimiento impide hacer equivalentes las expresiones “abastecimiento sanguíneo” y “angiogénesis” para estos tumores (74). En melanomas cutáneos no se hallaron diferencias marcadas en la DMV entre tumores metastásicos y no metastásicos (221).

En neoplasias mamarias, la exhaustiva investigación de laboratorio y la correlación clinicopatológica sustentan la teoría de que la angiogénesis juega un rol central, tanto en el crecimiento tumoral como en el desarrollo de metástasis a distancia (43, 67, 70). Varios autores informaron que los parámetros indicadores de angiogénesis no fueron de utilidad para predecir recurrencia (si bien existieron diferencias metodológicas entre ellos y quienes informaron lo contrario). Existe controversia entre los resultados que comparan niveles del *VEGF*, DMV y progresión tumoral. Hay un número considerable de trabajos en diversos tipos

tumorales que no muestran correlación entre la supervivencia y la DMV (74). No se observó relación entre el progreso de la enfermedad y la DMV en carcinomas invasivos mamarios de pequeño tamaño –menores a 3 cm- (217). En 2004, Uzzan y colaboradores realizaron un meta-análisis de 87 trabajos referidos al valor pronóstico de la DMV y concluyeron que este parámetro es de utilidad para la predicción de probabilidad de metástasis y supervivencia, fundamentalmente en neoplasias LN (-) en los que es aún más necesaria la predicción (189).

En mujeres la expresión de *Fik-1* no se relacionó con el GH ni con la supervivencia según Nakopoulou (101).

Se ha sugerido que el incremento en la concentración del *VEGF* circulante en pacientes portadores de neoplasias malignas podría tener valor pronóstico, tanto en humanos como en caninos (224). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración del *VEGF* sérico (no así en el nivel plasmático) de perras con metástasis en el LN respecto de aquellas sin metástasis.

En neoplasias humanas, el valor pronóstico de las áreas microvasculares total y relativa (AMT y AMR), de la relación con la invasión a vasos sanguíneos y del tamaño y patrón vasculares es motivo de controversia. En carcinomas mamarios, por ejemplo, el AMT resultó de similar utilidad que el estado de los LN para la estimación de la supervivencia libre de recidivas a 20 años (en neoplasias T₂ y T₃) (174). Sin embargo, para la supervivencia global los valores no fueron concluyentes. La relación AMT/IVS (invasión a vasos sanguíneos) fue el más confiable de los factores pronósticos independientes para la supervivencia libre de enfermedad a 20 años (187). El AMT en carcinoma prostático se relacionó con metástasis en la médula ósea. También se asoció con metástasis en carcinomas de mama y en vejiga, no así en pulmón y riñón, cuyos carcinomas no exhiben un fenotipo angiogénico (67). El área de microvasos relativa (AMR) mostró correlación con el hallazgo de micrometástasis de neoplasias mamarias en la médula ósea (190). Con respecto al tamaño de los vasos, se postula que a mayor tamaño del vaso, mayor tamaño del émbolo que puede albergar (el que podría ser más eficiente para establecerse como metástasis). La relación con la DMV es

inversamente proporcional (216). Se encontró correlación entre el pronóstico y el patrón vascular en melanomas oculares, glioblastomas y carcinomas de células escamosas de la cabeza y cuello (67). El hallazgo de canales de mímica vasculogénica es, en sí, un marcador de progresión, debido a que solo se ha observado en neoplasias de fenotipo altamente agresivo (74).

La angiogénesis y su relación con el comportamiento biológico de la neoplasia todavía están poco comprendidas en oncología veterinaria. Se informaron diferencias significativas en la supervivencia en mastocitomas cutáneos en perros entre aquellos con baja o alta densidad de microvasos (220). La expresión del *VEGF* fue mayor en tumores mamarios caninos malignos que en benignos, y en aquellos que originaron metástasis vs los que resultaron LN (-). La regulación hacia arriba del *VEGF* en neoplasias mamarias se asoció a una mayor DMV (214, 225), y ésta a menor supervivencia de las perras afectadas (87).

Agentes antiangiogénicos: su utilización terapéutica

Los intervalos entre el descubrimiento de diversas moléculas, la dilucidación de sus mecanismos de acción y su aplicación clínica se han acortado. Actualmente, se tiende a combinar tratamientos quimio o radioterápicos convencionales con fármacos que se suministren durante periodos prolongados para lograr el control del tumor residual, como los agentes diseñados para inhibir vías de transducción de señales. Éstos bloquean uno o más de los procesos involucrados en el crecimiento y diseminación de los tumores, tanto primarios como metastáticos. Así, se combinan los agentes terapéuticos que inhiben blancos celulares y los que tienden a normalizar el microambiente tumoral (25, 27, 74).

Los agentes antiangiogénicos, por ejemplo, tienen un modo de acción más selectivo que los quimioterápicos citotóxicos y, por lo tanto, mayor tolerancia. Además, como las células diana de su acción son principalmente las células endoteliales, genéticamente más estables que las tumorales, la aparición de resistencia es infrecuente (64, 111, 226).

Los anticuerpos neutralizantes de ciertos ligandos, los inhibidores de receptores y de TKs (“pequeñas moléculas” que ingresan a las células) que se han desarrollado constituyen un avance exitoso (42, 227, 228). Entre los fármacos antiangiogénicos, los más exitosos son aquellos que tienen como objetivo inhibir los efectos proangiogénicos del VEGF (226). Los agentes antiangiogénicos inducen apoptosis, evitan la proliferación de células quiescentes, imposibilitan la movilización de CPEs y evitan o retardan el crecimiento tumoral mediante otros mecanismos (41, 77). Además, minimizan los efectos deletéreos de las masas tumorales reduciendo la ascitis inducida por VEGF. Al disminuir la permeabilidad de los vasos, aumenta la presión sanguínea en el tumor y, por lo tanto, mejora la llegada de éste u otros fármacos (20). De todos modos, no deben subestimarse los efectos colaterales de estos tratamientos, particularmente en altas dosis.

En 1995 había nueve inhibidores de la angiogénesis en fases I y II de experimentación; actualmente, algunos han sido aprobados para su utilización en humanos y más de 70 compuestos se encuentran en distintas fases de experimentación (226).

En 1997 Presta informó la humanización del anticuerpo monoclonal (*mab*) anti-*VEGF* (bevacizumab, Avastatin®, Genentech, San Francisco, California, EE.UU) (229). Este anticuerpo neutraliza todas las isoformas del *VEGF*. Está aprobado actualmente para el carcinoma colorrectal metastático. También se han obtenido datos promisorios en neoplasias pulmonares no microcíticas y en carcinomas renales, cuando se lo utiliza en combinación con quimioterápicos citotóxicos. En carcinomas mamarios metastásicos se llevó a cabo un estudio sin éxito. El resultado se atribuyó a que el bevacizumab se utilizó como tratamiento de tercera línea (pacientes con cánceres muy avanzados ya tratados) en los que el fenómeno angiogénico se encontraba bajo la influencia de un mayor número de mediadores (226).

Existen dos estrategias principales para inhibir la actividad de los receptores de tipo *TK* (implicados en la angiogénesis, entre otros procesos relacionados con la biología tumoral): el bloqueo del dominio extracelular del receptor mediante *mabs* y la inhibición del dominio de unión al ATP (intracelular) mediante pequeñas moléculas llamadas “*nibs*” (227).

La amplificación del gen del receptor para el EGF humano *HER-2* (*HER-2/neu*, *c-erbB-2*) se ha asociado con varios procesos, incluido el de angiogénesis. Slamon y col. desarrollaron un *mab* humanizado (trastuzumab, Herceptin®) que se une con alta afinidad al dominio extracelular de *HER-2* y bloquea su función en la transducción de señales. Asociado a la quimioterapia de primera línea, incrementa la supervivencia global media de pacientes con tumores metastásicos de mama que sobreexpresan *HER-2* (228).

Entre los inhibidores de *TK*, el sorafenib (Nexavar®, Bayer HealthCare), que bloquea la cascada de señalización que involucra *MAPKs* e inhibe a los *VEGFRs* y *PDGFRs*, fue aprobado para el tratamiento de pacientes con carcinomas renales⁴. Otros inhibidores de la actividad *TK* son el mesilato de imatinib (fármaco oral que ha supuesto, posiblemente junto al

⁴ Food and Drug Administration: 2005, Unión Europea 2006

Herceptin®, la mayor revolución terapéutica de los últimos años en el mundo de los tratamientos dirigidos) y el sunitinib (227).

En marzo de 2007, la FDA aprobó el lapatinib (Tykerb®, Glaxosmithkline), en combinación con capecitabina, para el tratamiento por vía oral del cáncer de mama de las pacientes con cáncer metastásico o avanzado, cuyos tumores sobreexpresan *c-erbB1* y *HER-2* y que hubieran recibido antraciclinas, taxanos y trastuzumab como tratamiento previo (228).

HIPÓTESIS MÁS RELEVANTES

- El tipo histológico del carcinoma mamario canino influye sobre el grado de neoangiogénesis y la diseminación neoplásica al linfonódulo regional.

- La actividad proliferativa de los carcinomas mamarios caninos repercute en el grado de neoangiogénesis y en la diseminación neoplásica al linfonódulo regional.
- La supervivencia de caninos con carcinomas mamarios está influenciada por el tipo histológico, la actividad proliferativa y el grado de neoangiogénesis de estas neoplasias.

OBJETIVOS

- 1) Establecer la relación entre el tipo histológico de los carcinomas mamarios y el compromiso de los linfonódulos regionales.
- 2) Caracterizar la expresión de marcadores relacionados con la neoangiogénesis tumoral.
- 3) Evaluar el índice de proliferación de las células carcinomatosas y relacionarlo con el grado de neoangiogénesis tumoral.
- 4) Estimar la relación entre el tipo histológico y el grado de neoangiogénesis y entre este último y el compromiso del linfonódulo.
- 5) Estudiar la relación de las variables antes mencionadas entre sí y su influencia en la supervivencia de las pacientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Criterios de inclusión de los casos en grupos I y II

A efectos de demostrar las hipótesis enunciadas, se analizaron 136 neoplasias mamarias espontáneas correspondientes a dos grupos. En ambos grupos se estudiaron características de las neoplasias y de los linfonódulos. Para el grupo II se realizó, asimismo, el seguimiento clínico. Las neoplasias y los linfonódulos fueron revisados sin conocimiento de la progresión clínica de la enfermedad.

* Grupo I: casos de archivo

Criterios de inclusión: carcinomas mamarios invasivos⁵ de perras que fueron remitidos con LNs regionales a partir de 1980 y hasta diciembre de 2003 al Instituto de Patología Dr. Bernardo Epstein.

* Grupo II: casos ingresados durante parte del periodo de trabajo

Criterios de inclusión: pacientes portadoras de carcinomas mamarios invasivos, tratadas exclusivamente con medios quirúrgicos, cuyas muestras ingresaron al Instituto desde el comienzo de la ejecución del plan hasta el primer semestre del segundo año de trabajo. Se seleccionaron las pacientes cuyo seguimiento clínico resultara más factible.

2. Estudios retrospectivos de material de archivo (grupo I)

A. De la masa tumoral

A.1. Estudios histopatológicos

Se consignó el TH con el que originalmente había sido clasificada la neoplasia. Se estudiaron nuevamente los cortes de las neoplasias ajustando el diagnóstico a la clasificación actual propuesta por la OMS en 1999 (Misdorp). Los TH asignados fueron: carcinoma complejo (CC), carcinoma simple (Cs) tubular, papilar, sólido y anaplásico, carcinosarcoma (CS) y tipos especiales de carcinoma (CCE, carcinoma mucinoso, carcinoma rico en lípidos y carcinoma de tipo fusiforme).

⁵ Este concepto excluye tanto a las neoplasias mamarias benignas, como a las malignas de origen diferente al epitelial y a los carcinomas *in situ*

Además, se asignó a cada tumor un GH (I, II ó III) establecido como resultado de la puntuación obtenida en función de las siguientes variables: formación de túbulos, pleomorfismo nuclear y recuento mitótico (con un diámetro de campo de 0,47 mm), de manera que se consideró de GH I a las neoplasias más diferenciadas.

Se consignó la presencia de émbolos neoplásicos (EN) en forma de émbolos carcinomatosos constituidos por células aisladas o en grupos.

A.2. Estudios inmunohistoquímicos

El estudio de distintos procesos característicos de la biología de las neoplasias (proliferación celular, angiogénesis) se abordó mediante técnicas de IHQ. Para tal fin, se seleccionó un corte de cada uno de los tumores para obtener nuevas secciones a partir del bloque de parafina correspondiente. Se descartaron aquellos que, por sus características (ej. escaso tejido neoplásico epitelial, hemorragias masivas, extensas áreas de necrosis), resultaron poco representativos o se consideró que podrían haber presentado inconvenientes para su procesamiento IHQ. Todos los cortes obtenidos se colocaron sobre portaobjetos con cargas positivas (Superfrost plus® A100018, Deltalab).

En los casos de neoplasias múltiples, se procesó aquella de tipo y grado histológico menos diferenciados.

Se procesaron los cortes aplicando la técnica de peroxidasa (ver anexo) con el sistema de detección estreptavidina biotina con peroxidasa de rábano picante (*LSAB2 System-HRP: Labelled Streptavidin-Biotin2 System, Horseradish Peroxidase, K0673. DAKOCytomation, Carpinteria*). El inmunoprecipitado fue puesto de manifiesto mediante tratamiento con 3,3'-diaminobencidina (DAB) incluida en el *kit*. Fue necesario realizar la recuperación antigénica mediante diferentes métodos en función del anticuerpo. Para inhibir las uniones inespecíficas del anticuerpo con el tejido los cortes fueron cubiertos con leche descremada comercial, en polvo, al 4 % en solución de *buffer* fosfato (*PBS*), durante 20 minutos. En todos los casos, el control negativo de técnica lo constituyó un corte procesado simultáneamente con aquellos en

estudio según el mismo protocolo, a excepción de la incubación con el anticuerpo primario. Todos los tejidos procesados correspondieron a caninos hembras. Se utilizó un microscopio Nikon® Eclipse 50i para la observación.

Proliferación celular

-Anticuerpo utilizado: anti PCNA, clon PC10, M0879, DAKO Co., Carpintería (concentración: 1/50). Se utilizó un corte de linfonódulo como control positivo de tejido (positividad en el centro germinativo de los nódulos secundarios).

-Método de recuperación antigénica: calor húmedo a presión atmosférica (“vaporiera”).

-Observación y cuantificación de la inmunomarcación: se realizó el recuento de células positivas (con marcación parduzca nuclear –o citosólica en células en mitosis -). Se analizaron 10 campos de observación de 40X con 100 células como mínimo por campo. Se contaron como mínimo 1000 células por tumor. Se estableció el IP expresado como células positivas sobre 100 células.

Angiogénesis

Estimaciones realizadas:

a) expresión del VEGFR-2

Anticuerpo utilizado: anti VEGFR-2, Flk-1-A/3-: sc-6251, Santa Cruz Biotechnology, Inc. (concentración: 1/100). Se utilizó un corte de carcinoma intestinal como control positivo de tejido y uno de córnea como control negativo.

Método de recuperación antigénica: horno de microondas.

Observación y cuantificación de la inmunomarcación: de cada caso se analizaron 20 campos (Obj. 40X) mediante una cámara digital (EvolutionVF, Qimaging) montada sobre un microscopio (Olympus BX50) y conectada a una computadora. Las imágenes tuvieron una resolución de 640x480 píxeles (px), color real (RGB) y formato de archivo de imágenes con

etiquetas (*TIFF: tagged image file format*) con una relación de 0,32 $\mu\text{m}/\text{px}$. Mediante el programa de análisis ImagePro Plus, v6.0 (Media Cybernetics) se determinaron varios parámetros correspondientes al área y la densidad promedio de marcación de cada corte analizado (valores mínimos, máximos, media, sumatoria, desvío estándar -DE-). Los valores utilizados fueron la sumatoria del área y la media de la densidad de la marcación. Con ambos datos se obtuvieron la densidad óptica integrada (DOI), la densidad óptica integrada/ mm^2 (DOI/ mm^2) y la densidad óptica integrada/ máxima intensidad de marcación (DOI/IM). La DOI fue el parámetro utilizado para el análisis comparativo de los datos.

b) densidad de microvasos (DMV). Marcación de células endoteliales

Anticuerpo utilizado: anti-vWf, clon F8/86, M 0616, Dakocytomation (concentración 1/50).

Se utilizó un corte de tonsila como control positivo de tejido y uno de córnea como control negativo.

Recuperación antigénica: horno de microondas.

Observación y cuantificación de la inmunomarcación: para la determinación de la densidad de microvasos se realizó el recuento de estructuras marcadas en 20 campos (Obj. 40X), ya fueran microvasos con luz, células, grupos celulares o estructuras en cordón.

Los primeros 20 cortes procesados fueron analizados por dos observadores para establecer el criterio de selección de las imágenes a clasificar como “positivas” o “negativas” (el resto de los casos fue analizado por un observador). Los resultados se expresaron como: elementos positivos por campo de 40 X. Mediante este dato y el de la superficie del campo de observación ($0,075 \text{ mm}^2$) se calculó el número de elementos por mm^2 , el que fue utilizado para el análisis de los resultados.

B. De los linfonódulos

B.1. Estudios histopatológicos

Se estudiaron nuevamente los cortes histológicos de los LNs. Los resultados de la observación se expresaron en términos de LN (+) (presencia de células carcinomatosas) o LN (-) (sin lesiones que sugirieran carcinoma metastásico). En el primer caso, estuvieron comprendidos todos los LNs que presentaron células carcinomatosas: a) en forma de émbolos libres en los senos, b) constituyendo pequeños grupos celulares o nidos en la intimidad de los folículos, o c) como células aisladas y distribuidas difusamente en el tejido linfoide. La segunda categoría comprendió tanto los LNs sin lesiones aparentes como aquellos con lesiones no neoplásicas, que no se detallaron. Tanto en los LN (-) como en aquellos en los que no fue posible precisar la estirpe epitelial de alguna célula o grupo celular, se realizaron cuatro nuevos cortes de los mismos bloques (uno cada 100 μ). Tres de ellos (1º, 2º y 4º) se colorearon con hematoxilina y eosina (H-E) y se revisaron con los mismos criterios. Los que resultaron positivos en los nuevos cortes, se consignaron como LN+ (RH). El tercero de la serie se montó en portaobjetos con cargas positivas (para su eventual procesamiento mediante IHQ).

B.2. Estudios inmunohistoquímicos

Anticuerpo utilizado: AE1/AE3, N1590, Dakocytomation (listo para usar). Se utilizó un corte de carcinoma mamario como control positivo de tejido y los tejidos no epiteliales vecinos como control negativo interno.

Recuperación antigénica: horno de microondas.

Observación y cuantificación de la inmunomarcación: los resultados se expresaron como LN + (IHQ) o LN (-).

3. Estudios de nuevos casos (grupo II)

A. Pacientes. Su selección y seguimiento

La protocolización de casos clínicos se realizó desde el comienzo de la ejecución del plan hasta el primer semestre (inclusive) del segundo año, según el cronograma de actividades previsto. De esta manera fue posible constatar un periodo de supervivencia de dieciocho meses o más, tomando como fecha del último relevamiento el final del tercer año de trabajo.

Este periodo resultó factible y adecuado tomando como referencia la expectativa de vida de los caninos.

Se registraron los siguientes datos: propietario (con sus datos de contacto), médico veterinario que realizó el diagnóstico clínico, edad y raza de la paciente, localización, tamaño y evolución aproximada de las neoplasias, datos del examen físico del linfonódulo regional y evidencia de metástasis a distancia. Se estableció el TNM y el estadio clínico para cada paciente. También se consignaron datos administrativos (números de entrada e inclusión de las piezas).

Se realizaron controles semestrales (o más frecuentes cuando se consideró necesario en función de la evolución clínica). Estos controles consistieron en el examen físico del animal y estudios radiográficos y/o ultrasonográficos correspondientes en los casos en que se detectaron signos atribuibles a la presencia de metástasis.

Constatación de la muerte relacionada con la neoplasia

En algunos casos se obtuvo el consentimiento de los propietarios para la realización de la necropsia de los animales con carcinomas. Se obtuvieron muestras para histopatología de las lesiones que se consideraron necesarias para determinar si la causa de muerte podía atribuirse a la enfermedad neoplásica en estudio. Cuando no se dispuso del cadáver para realizar la necropsia, la relación entre la muerte y la enfermedad neoplásica se determinó mediante el reconocimiento de imágenes radiográficas compatibles con metástasis pulmonares y los signos asociados.

Los casos con seguimiento iniciado que se retiraron del grupo se consideraron “censurados” a los efectos estadísticos.

Luego de culminado el periodo de seguimiento, las pacientes se clasificaron según su supervivencia⁶ en uno de los siguientes grupos:

⁶ Excepto que se realice alguna aclaración en contrario, la palabra “supervivencia” alude a la supervivencia global y no a la supervivencia libre de enfermedad.

-Pacientes con supervivencia baja (SB): muerte dentro de los primeros seis meses a partir del diagnóstico histopatológico.

-Pacientes con supervivencia media (SM): muerte entre seis y dieciocho meses.

-Pacientes con supervivencia alta (SA): muerte luego de dieciocho meses, o viva al momento de completar los resultados.

B. Estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos de las neoformaciones y los linfonódulos

En los casos seleccionados para su seguimiento se llevaron a cabo los mismos estudios histopatológicos e IHQ detallados para los casos del grupo I, tanto en los cortes de glándula mamaria como en los de LNs (excepto que, debido a la fecha reciente de su diagnóstico, no fue necesario actualizar la nomenclatura).

4. Métodos de análisis estadístico de los datos obtenidos

Los resultados de los estudios realizados a ambos grupos se volcaron en tablas (a igual formato de tabla corresponde igual tratamiento de los datos). Para resumir, describir e interpretar los resultados se aplicaron diferentes métodos estadísticos, según el caso. Las medidas de resumen y desviación de los datos cuantitativos, así como los gráficos, fueron obtenidos y editados con los programas *Microsoft® Excel 2002* o *Statistical Product and Service Solutions (SPSS)* para *Windows 10.0.1*.

En todas las comparaciones de datos la hipótesis nula (H_0) fue que los grupos eran homogéneos con respecto a la característica estudiada y que, luego, las diferencias encontradas se debían al azar. En ese marco, p expresa la probabilidad de que las diferencias encontradas en los datos se deban al azar. Para todos los análisis, el umbral de significación se estableció en $p < 0,05^7$ (por motivos convencionales).

⁷ En todos los casos en que las diferencias encontradas entre grupos fueron significativas, se consignaron dos asteriscos como superíndices a la derecha del valor de p (ejemplo: $p=0,039^{**}$, página 112).

En tablas de contingencia para χ^2 , cuando se calculó alguna frecuencia esperada menor que 5, se aplicó la corrección de Yates para minimizar el valor de χ^2 y, de haber error, que éste tienda a la zona de la distribución que determina falta de significación de los resultados (alta incidencia del azar). En las tablas con >25 % de valores menores que 5, los datos se presentaron pero no se analizaron.

A continuación se especifican las pruebas utilizadas. En cada *ítem*, se enumeran en itálica las variables analizadas con cada prueba.

⊕ Comparación de las medias de dos grupos:

Se utilizó la prueba de t, previo análisis de la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene (SPSS).

Contraste de medias de IP, DOI o DMV en función de la presencia de EN, del estado del LN, de la supervivencia y en algunos casos de comparaciones de a pares (IP en CC/ IP en Cs. tubulares)

⊕ Comparación de las medias de más de dos grupos

Se utilizó el análisis de las varianzas (ANOVA, SPSS).

Contraste de medias de DOI, DMV e IP en función de TH o GH

⊕ Comparaciones del número de casos con valores bajos o altos de un estimador (en función de su mediana, por ej.: IP bajo o alto) con otras variables

Se utilizó la prueba de chi cuadrado (χ^2) (Microsoft® Excel 2002).

Contraste de TH, émbolos o LN/ DOI, DMV o IP bajos o altos (o estas últimas tres variables entre ellas)

⊕ Comparación de variables cualitativas.

Se utilizó la prueba de χ^2 (Microsoft® Excel 2002)

Contraste de TH, GH, émbolos SÍ/NO, LN (+)/LN (-), localización, estadio y SV

⊕ Asociación entre variables cuantitativas

Se obtuvieron coeficientes de correlación de Pearson y Spearman (simple y parcial, SPSS)

Contraste de IP/DOI, IP/DMV, DOI/DMV

⦿ **Relación entre todas las variables y estado del LN (análisis multivariado)**

Se llevó a cabo el procedimiento de regresión logística múltiple por pasos para obtener, entre todas las variables, aquellas de valor pronóstico del estado del LN.

⦿ **Probabilidades de la ocurrencia del suceso “muerte” en función del tiempo**

El tiempo 0 (cero), o inicio de la observación, fue la fecha del diagnóstico histopatológico. El seguimiento continuó hasta la constatación del suceso “muerte” o hasta que concluyó el periodo. Para el análisis de los datos se utilizó el método no paramétrico de Kaplan-Meier o del límite del producto (*SPSS*). Este método de análisis específico permitió analizar los datos antes que todos los pacientes hubieran muerto (los datos de estas pacientes vivas al finalizar el estudio se analizaron también y figuran como observaciones incompletas o “censuradas”, al igual que aquellos de pacientes que se perdieron o retiraron o que murieron por otras causas) y es un método indicado para grupos pequeños.

⦿ **Otras comparaciones**

Para comparar las curvas de supervivencia producidas por el método de Kaplan-Meier se utilizó la prueba estadística del logaritmo del rango (*logrank test, SPSS*), apropiada para comparaciones de grupos con observaciones censuradas y valores que no tienen una distribución normal, como el tiempo de supervivencia.

Contraste de émbolos SÍ-NO/ supervivencia, LN (+) o LN (-)/ supervivencia, IP/ supervivencia, DOI/ supervivencia y DMV/ supervivencia).

RESULTADOS

De todos los casos de muestras de caninos procesados en el periodo en estudio, 4078 fueron diagnosticados como neoplasias. De ellos, 1671 tuvieron su origen en la glándula mamaria (41 %). Si consideramos solamente las neoplasias en las hembras (2487), las de origen mamario constituyeron el 67,18 %. Setenta por ciento de los tumores mamarios fueron malignos. Los casos de carcinomas mamarios remitidos con LN fueron 102 - grupo I- (tabla 4).

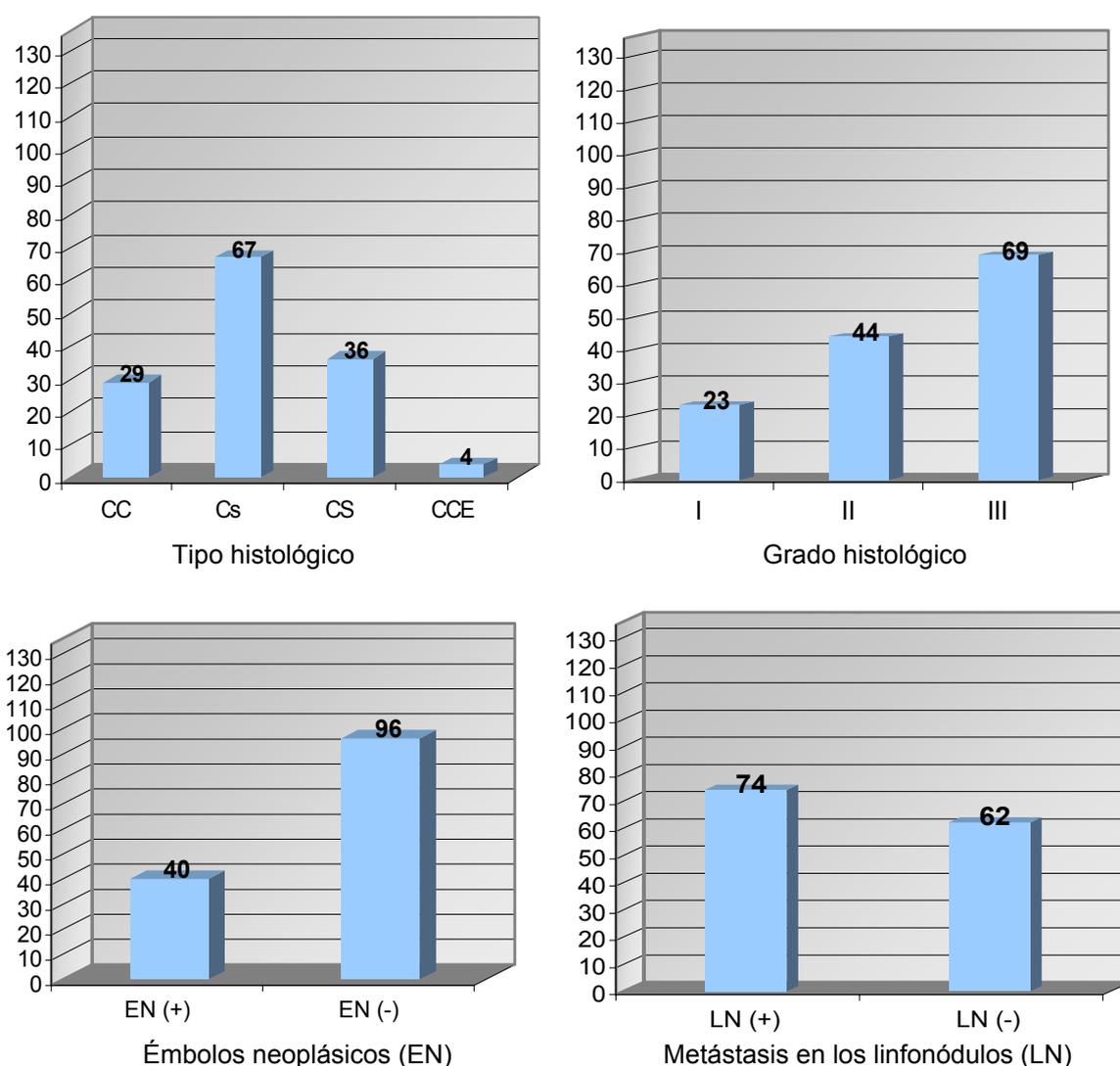
Tabla 4. Frecuencia de neoplasias mamarias sobre el total y proporción de neoplasias malignas y de neoplasias remitidas con LNs.

	neoplasias mamarias	neoplasias malignas (n / %)	neoplasias malignas remitidas con Ln (n / %)
1980-1991	613	526 / 85,8	24 / 4,56
1992-2003	1058	645 / 60,96	78 / 12,09
1980-2003	1671	1171 / 70,07	102 / 8,71

El grupo II resultó integrado por 34 casos. Los resultados de las características histopatológicas e IHQ (comunes a ambos grupos) de cada tumor se presentan en la tabla 5. Los datos clínicos y de supervivencia, exclusivos del grupo II, se muestran en la tabla 6.

Características histopatológicas de las neoformaciones

Sobre 136 tumores, se diagnosticaron 29 CC, 67 Cs (7 Cs tubulares, 33 Cs papilares, 21 Cs sólidos y 6 Cs anaplásicos) y 36 CS. De los tipos especiales de carcinoma, solo se encontraron CCE (4 casos). Se encontraron casos de GH I, II y III (23, 44 y 69, respectivamente). En 40 de los casos se observaron émbolos neoplásicos y en 74 casos, metástasis en el LN. La distribución de frecuencias de dichas características se muestra en la figura 2. Las imágenes correspondientes se muestran en las figuras 3 a 6.



CC: carcinoma complejo **Cs:** carcinoma simple
CS: carcinosarcoma **CCE:** carcinoma de células escamosas

Fig 2. Representación gráfica de la frecuencia de las neoplasias según el tipo histológico, el grado histológico, la presencia de émbolos neoplásicos y de metástasis en el linfonódulo (n : 136).

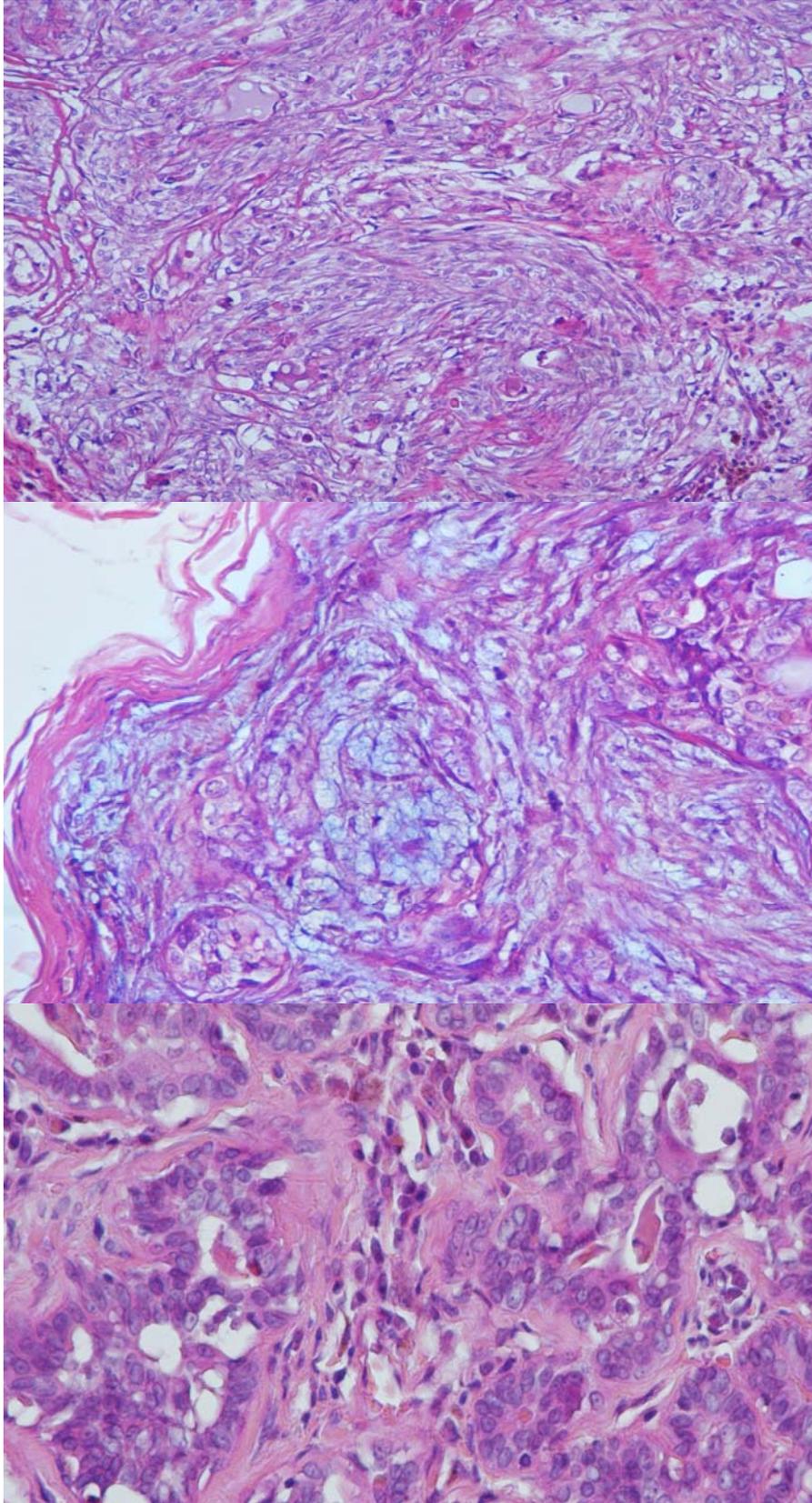


Fig. 3. Caninos, hembras, glándula mamaria. H-E.
A. Carcinoma complejo. Obj. 20X. **B.** Carcinoma complejo. Células mioepiteliales estrelladas con abundante matriz extracelular mucoide. Obj. 40X.
C. Carcinoma simple tubular de grado histológico I. Obj. 40X.

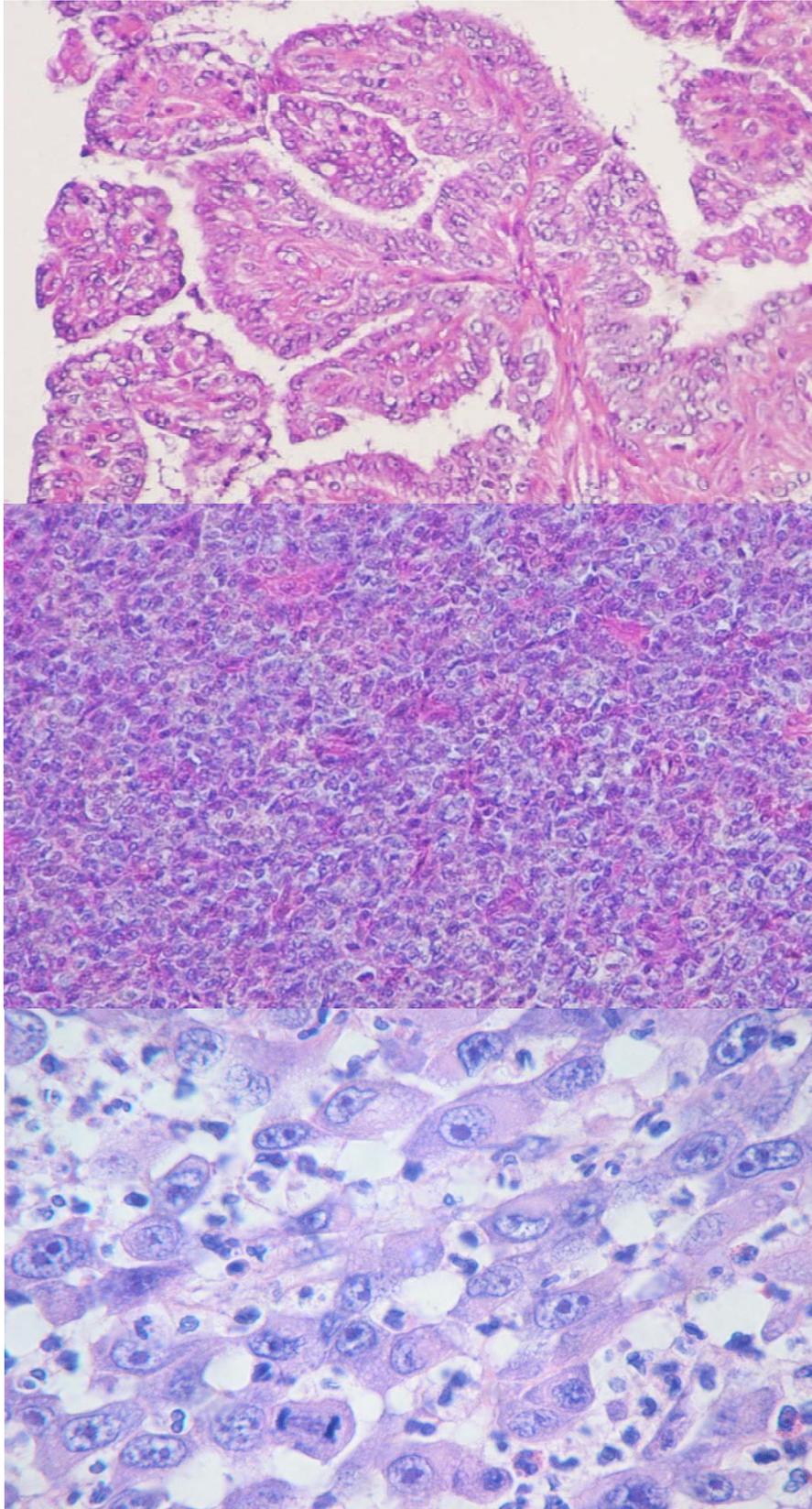


Fig. 4. Caninos, hembras, glándula mamaria. H-E.
A. Carcinoma simple papilar de grado histológico II. Obj. 20X. **B.** Carcinoma simple sólido. Obj. 40X. **C.** Carcinoma simple anaplásico de grado histológico III. Obj. 100X.

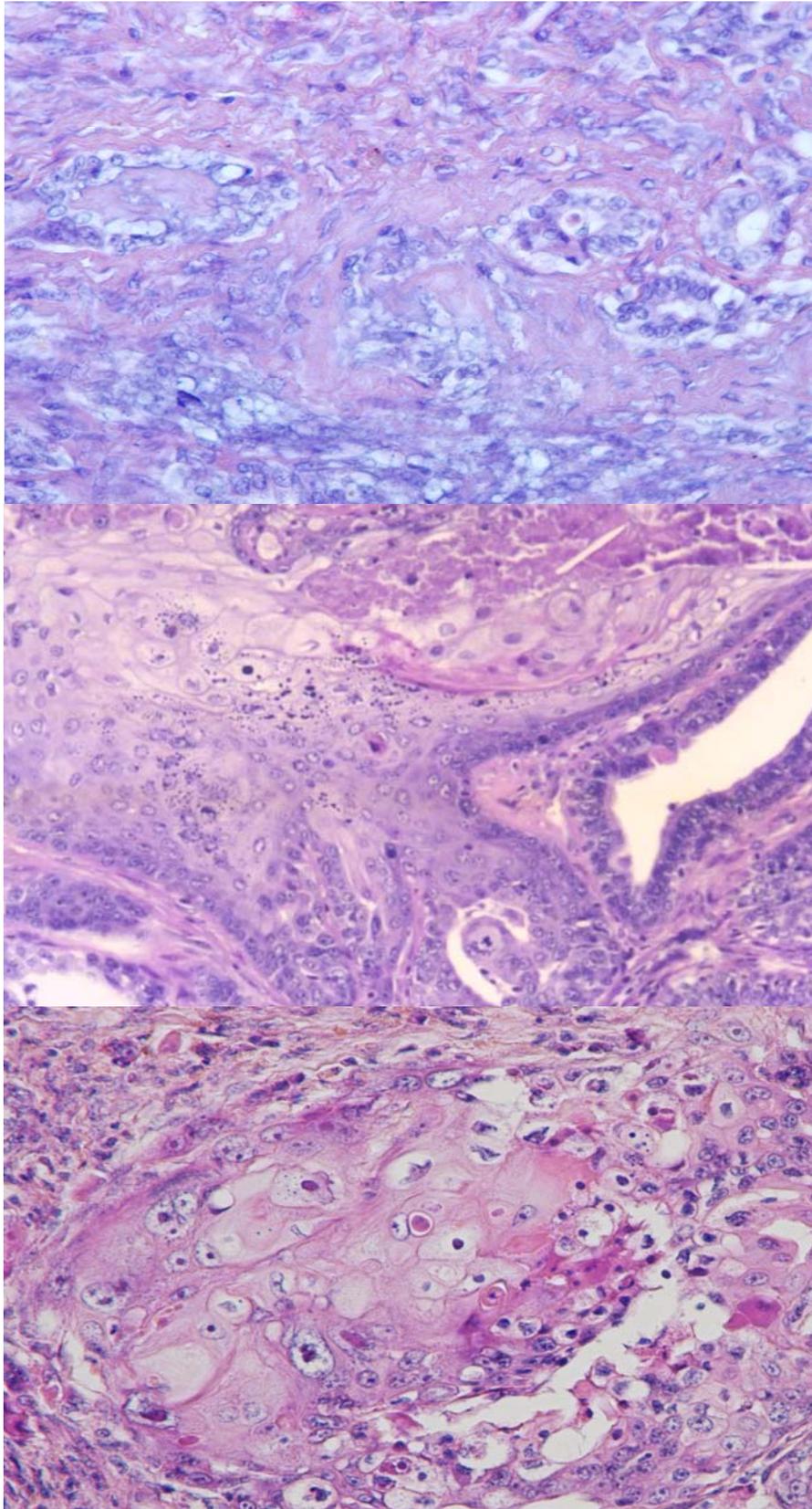


Fig. 5. Caninos, hembras, glándula mamaria. H-E.
A. Carcinosarcoma. Obj. 40X. **B.** Carcinoma de células escamosas. Obj. 20X.
C. Carcinoma de células escamosas. Obj. 40X.

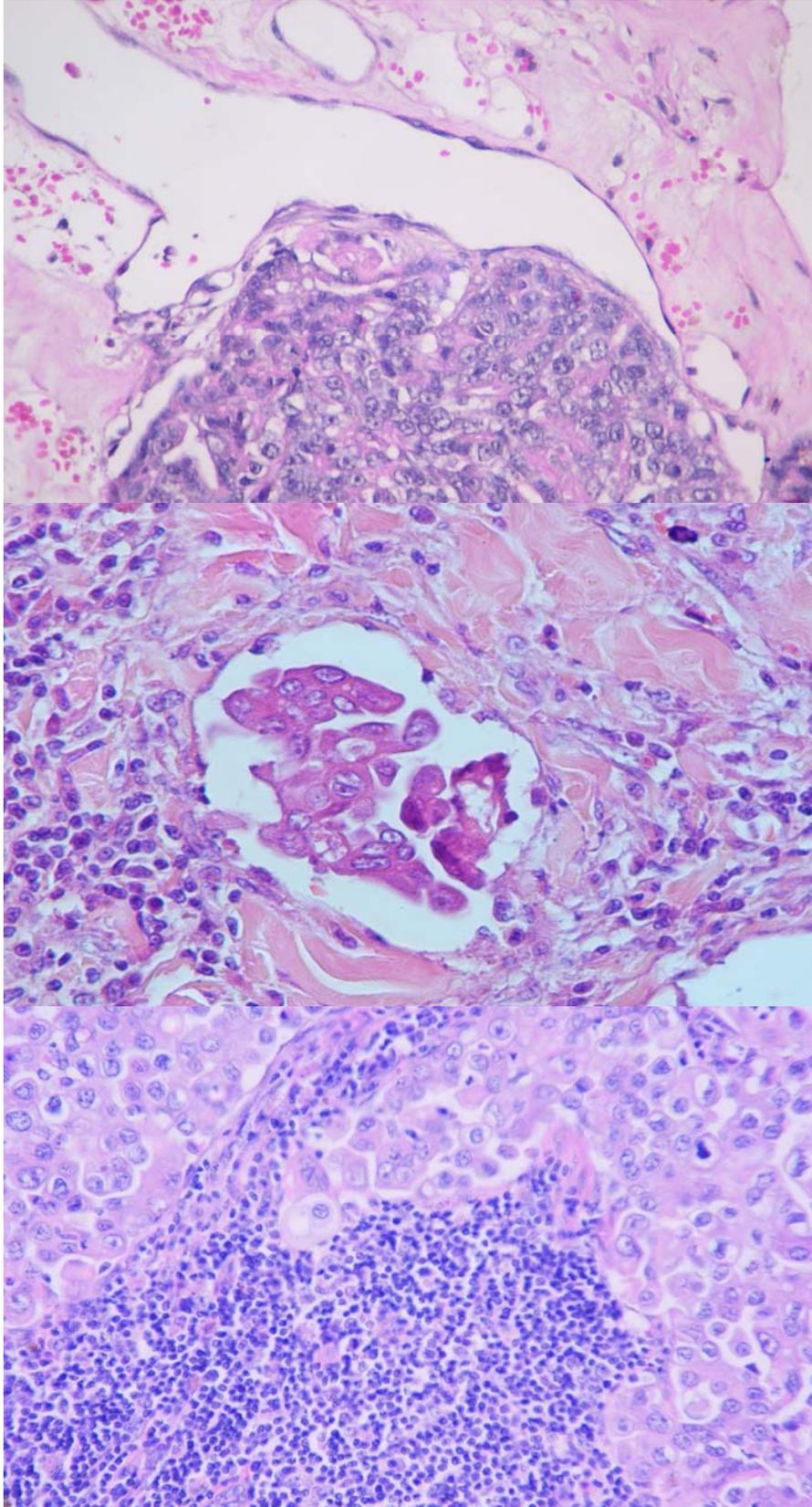


Fig. 6. Caninos, hembras.H-E.**A.**Glándula mamaria. Carcinoma simple sólido en adyacencias de un vaso linfático. Obj. 40X. **B.** Glándula mamaria. Émbolo neoplásico (flecha). Obj. 40X. **C.** Metástasis de carcinoma en el linfonódulo Obj. 40X.

Estudios inmunohistoquímicos

❖ *Proliferación celular*

En todos los cortes fue posible el recuento de 1000 células. En la tabla 5 se presentó el IP correspondiente a cada caso. En la figura 7 se observan tanto el histograma correspondiente a la distribución de frecuencias de IP en la población estudiada como el resumen de sus datos. La marcación fue parduzca, nuclear en las células en interfase, de distintas intensidades (fig. 8).

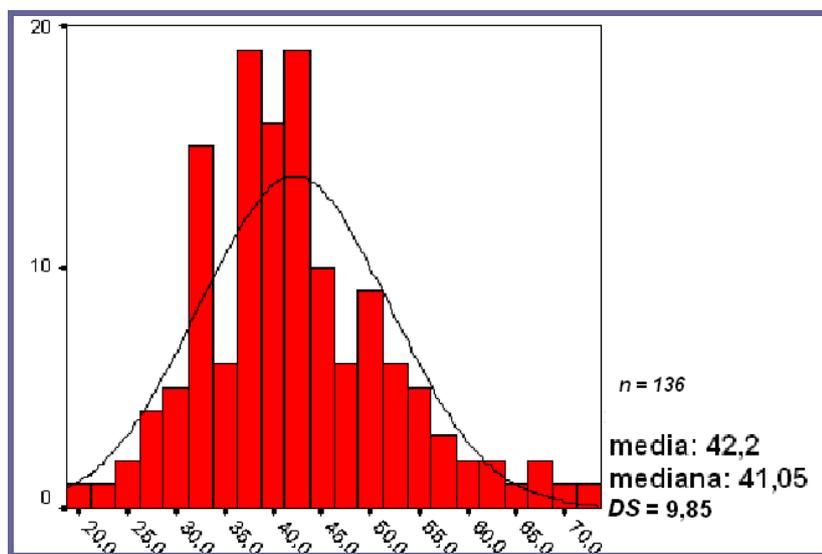


Fig. 7. Distribución del índice de proliferación de los casos estudiados.

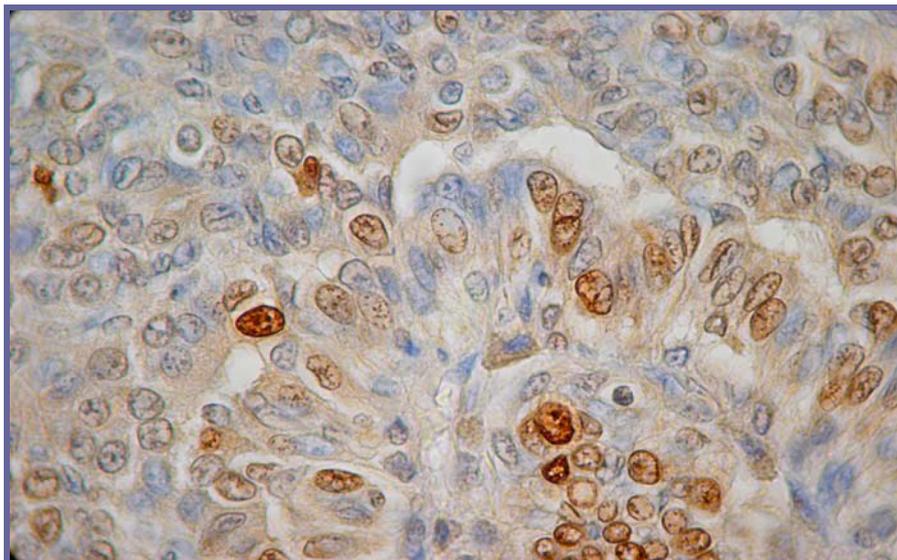


Fig. 8. Canino, hembra, carcinoma mamario simple sólido. IHQ anti-PCNA. LSAB2-HRP. DAB. Flecha: célula positiva. Cabeza de flecha: célula negativa. Obj. 100X.

❖ *Angiogénesis: expresión del VEGFR-2*

En la tabla 5 se presentaron datos de diversos parámetros ópticos de cada caso. En la figura 9 se observan el histograma de la distribución de frecuencias de la DOI de los cortes marcados con anti-*VEGFR-2* (anti-*Fik-1*) y el resumen de los datos. Se observó marcación parduzca positiva, tanto en células carcinomatosas como en células endoteliales, en todos los casos procesados (fig. 10).

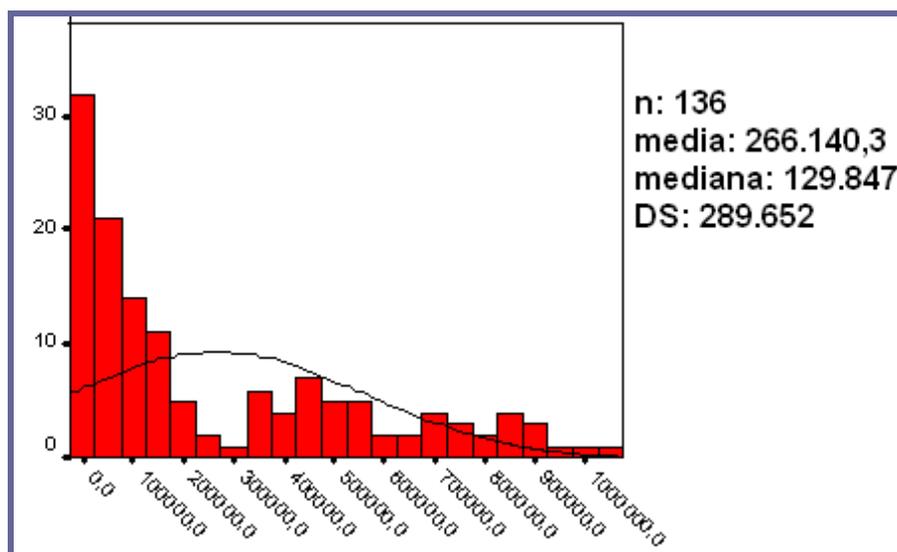


Fig. 9. Distribución de la DOI del *VEGFR-2* de los casos estudiados.

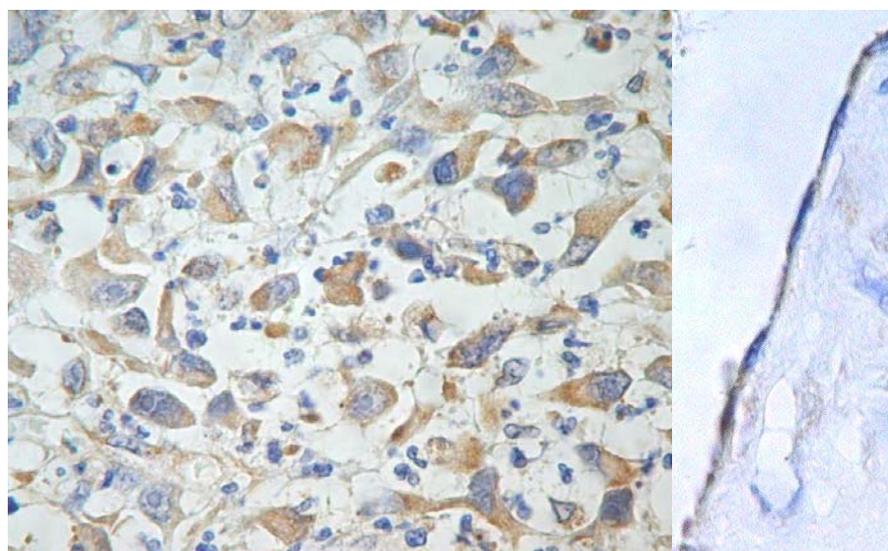


Fig. 10. Canino, hembra, carcinoma mamario simple anaplásico. IHQ anti-*Fik-1*. *LSAB2-HRP*. DAB.

Izq. Marcación positiva de membrana y citoplasmática en las células tumorales. Obj. 40X.
Der. Células endoteliales inmunomarcadas. Obj. 100X.

❖ **Angiogénesis: densidad de microvasos (DMV).**

En la tabla 5 se presentaron los datos correspondientes a la DMV de cada caso. En la figura 11 se observan el histograma correspondiente a la distribución de frecuencias de la DMV en la población estudiada y el resumen de sus datos. Se encontró marcación positiva, tanto en microvasos como en células y en grupos celulares, algunos cordonales (figura 12).

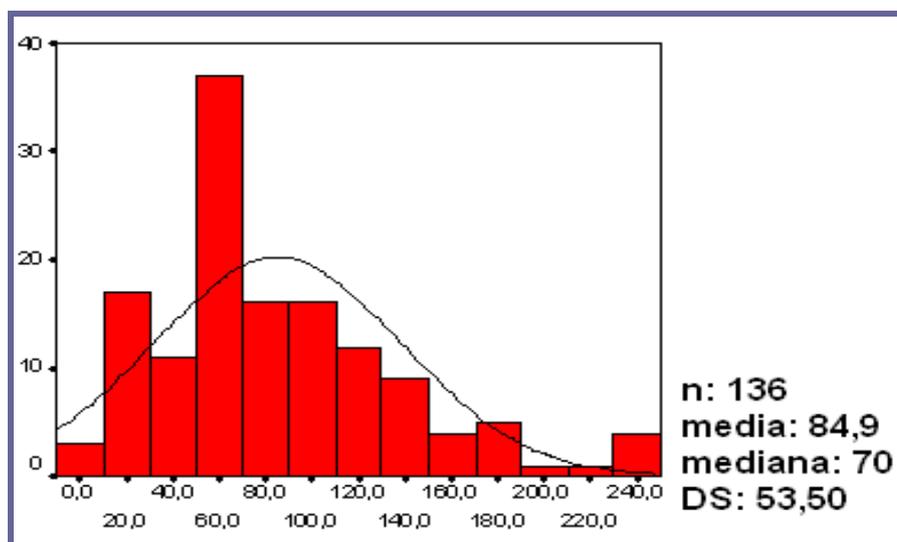


Fig. 11. Distribución de la DMV de los casos estudiados.

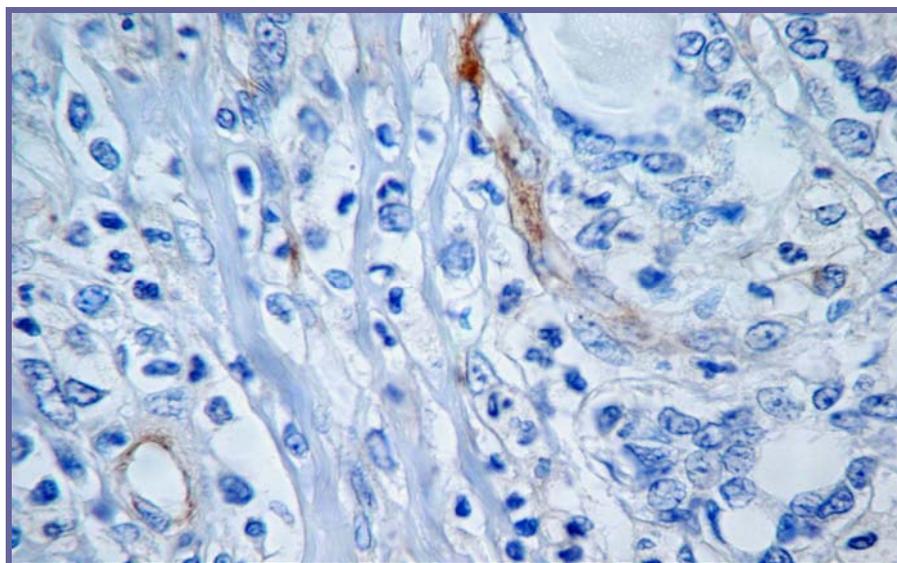


Fig. 12. Canino, hembra, carcinoma mamario simple tubular. IHQ anti-vWF. LSAB2-HRP. DAB. Flechas: células positivas. Obj. 40X.

Muestras de los linfonódulos. Estudios histopatológico e inmunohistoquímico

Doce de los 87 casos originalmente negativos (9%) se diagnosticaron como positivos luego de la observación de nuevos cortes (H-E). Mediante IHQ se hallaron micrometástasis ocultas en los LNs en 13 casos. Luego de estos procedimientos se consideraron como (+) 74 LNs (fig.13 A y 13 B). En las figuras 14 y 15 se muestra el aspecto de las metástasis puestas de manifiesto mediante revisión de nuevos cortes y mediante marcación IHQ, respectivamente.

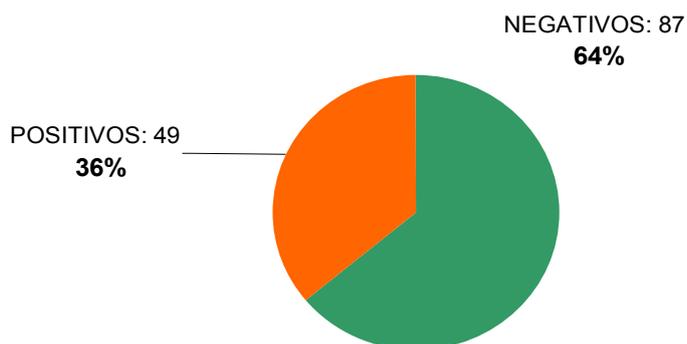


Fig. 13 A. Estado de los LNs (diagnóstico original).

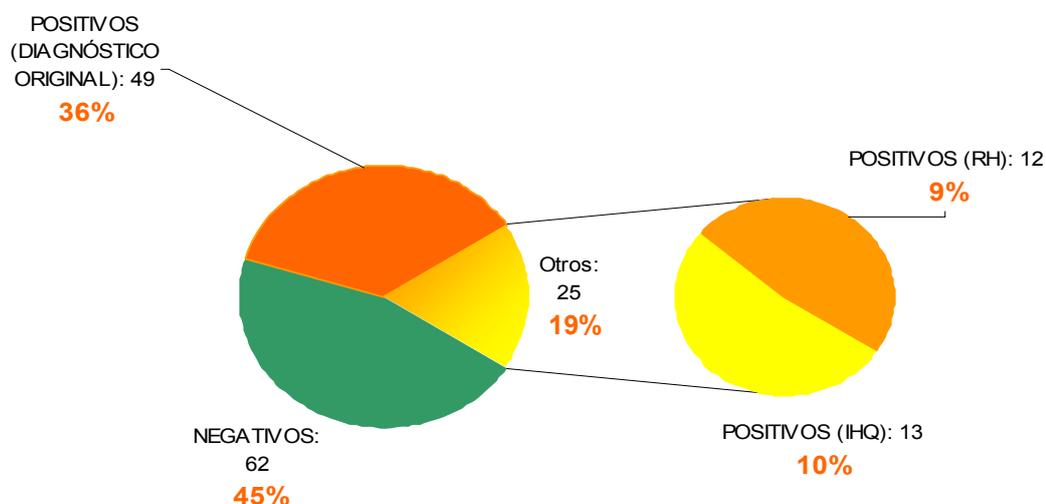


Fig. 13 B. Estado de los LNs (revisión actual).

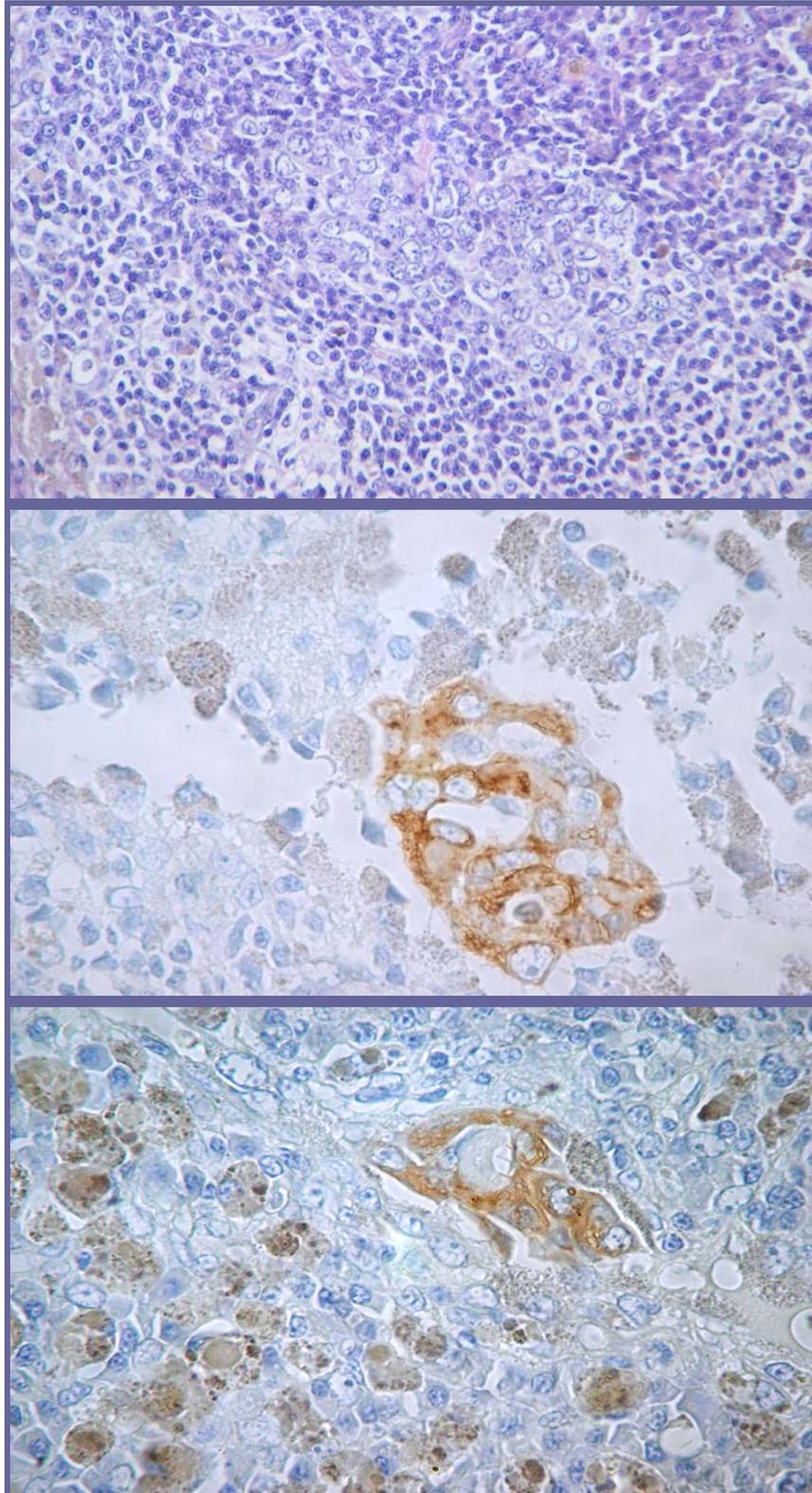


Fig. 14. Canino, hembra, LN. **A.** Micrometástasis hallada en revisión histopatológica. H-E. Obj. 40X. **B y C.** IHQ anti-citoqueratinas. *LSAB2-HRP*. DAB. Flechas: células positivas. Cabezas de flecha: hemosiderina en el citosol de macrófagos. Obj. 100 X.

Comparaciones de parámetros histopatológicos e inmunohistoquímicos entre sí

En la tabla 7 se presentan diferentes características histopatológicas (presencia de EN, GH y estado de los LNs) de los casos estudiados, clasificados según el tipo histológico.

Tabla 7. Presencia de émbolos neoplásicos, grado histológico y estado de los LN de los casos estudiados, clasificados según el tipo histológico.

TIPO HISTOLÓGICO	EN (+) (1)	EN (-) (2)	GH I (3)	GH II (4)	GH III (5)	LN (+) (6)	LN (-) (7)	TOTAL
carcinoma complejo	-	29	16	13	-	6	23	29
carcinoma simple tubular	1	6	6	1	-	0	7	7
carcinoma simple papilar	11	22	1	20	12	20	13	33
carcinoma simple sólido	11	10	-	1	20	14	7	21
carcinoma simple anaplásico	5	1	-	-	6	5	1	6
carcinoma de células escamosas	-	4	-	1	3	1	3	4
carcinosarcoma	12	24	-	8	28	28	8	36
TOTAL	40	96	23	44	69	74	62	136

(1) Presencia de émbolos neoplásicos en vasos tumorales

(2) Ausencia de émbolos neoplásicos en vasos tumorales

(3) Grado histológico I

(4) Grado histológico II

(5) Grado histológico III

(6) Células carcinomatosas en linfonódulo regional (análisis histopatológico e inmunohistoquímico)

(7) Ausencia de células carcinomatosas en linfonódulo regional (análisis histopatológico e inmunohistoquímico)

TIPO HISTOLÓGICO

✓ TH / EN

En la tabla 8 se muestra la frecuencia de neoplasias con o sin EN, clasificadas según las cuatro categorías más amplias de TH (CC, Cs, CS y tipos especiales de carcinoma -en este trabajo, se trata de CCE-). En la tabla 9 se comparan únicamente los carcinomas simples entre sí, entre los que se encontraron diferencias significativas con la prueba de χ^2 . En la tabla 10 se muestran los resultados para la comparación de carcinomas simples papilares, sólidos, anaplásicos y carcinosarcomas, entre quienes las diferencias pueden atribuirse al azar, de la misma manera que las halladas entre CC, Cs tubulares y CCE (tabla 11).

Tabla 8. Frecuencia de neoplasias con o sin EN, clasificadas según el TH.

TH	EN +	EN -	TOTAL
CC	0	29	29
Cs	28	39	67
CS	12	24	36
CCE	0	4	4
TOTAL	40	96	136

Tabla 9. Frecuencia de tumores con o sin EN, según el tipo de carcinoma simple ($p=0,039^{**}$).

TH	EN +	EN -	TOTAL
Cs tubulares	1	6	7
Cs papilares	11	22	33
Cs sólidos	11	10	21
Cs anaplásicos	5	1	6
TOTAL	28	39	67

Tabla 10. Frecuencia de carcinomas simples papilares, sólidos, anaplásicos y carcinosarcomas con o sin EN ($p=0,113$).

TH	EN +	EN -	TOTAL
Cs papilares	11	22	33
Cs sólidos	11	10	21
Cs anaplásicos	5	1	6
CS	12	24	36
TOTAL	39	57	96

Tabla 11. Frecuencia de carcinomas complejos, simples tubulares y de células escamosas con o sin EN ($p=0,105$).

TH	EN +	EN -	TOTAL
CC	0	29	29
Cs tubulares	1	6	7
CCE	0	4	4
TOTAL	1	35	36

✓ **TH / GH**

En la tabla 12 se presenta la frecuencia de carcinomas de diferente grado histológico clasificados según las cuatro categorías de TH

Tabla 12. Carcinomas de GH I, II y III clasificados según TH.

TH	I	II	III	TOTAL
CC	16	13	0	29
Cs	7	22	38	67
CS	0	8	28	36
CCE	0	1	3	4
TOTAL	23	44	69	136

✓ **TH / LN**

Las diferencias entre carcinomas complejos, simples (tomados como grupo) y carcinosarcomas fueron significativas ($p = <0,0001$). Se encontraron diferencias altamente significativas ($p = <0,0001$) con respecto a la frecuencia de metástasis en el LN entre Cs tubulares vs todos los otros subtipos de Cs, y significativas entre Cs papilares y Cs anaplásicos ($p = 0,017$). Las probabilidades de que las diferencias se deban al azar en la comparación entre CC, Cs tubulares y CCE y entre Cs anaplásicos y CS son altas ($p = 0,41$ y $p = 0,96$, respectivamente).

✓ **TH / IP**

En la tabla 13 se consignan las medias y desvíos estándar del IP según el TH.

Tabla 13. Medias y desvíos estándar de IP correspondientes a diferentes TH.

TH	Media	DE
CC	36,6	7,1
Cs tubular	34,6	7,6
Cs papilar	43,9	10,4
Cs sólido	44,7	9,7
Cs anaplásico	48,5	6,6
CCE	36,5	6,4
CS	44,6	9,8

Los datos presentados en la tabla 13 fueron analizados mediante ANOVA (tabla 14). Los IP son significativamente diferentes entre neoplasias de distinto TH. Los CC, Cs tubulares y CCE son homogéneos entre sí respecto de sus IP, al igual que los Cs papilares, sólidos y anaplásicos y los carcinosarcomas (tablas 15 y 16).

Tabla 14. Resultado de la comparación de las medias de IP mediante ANOVA ($p=0,001^{**}$).

	sumatoria de cuadrados	grados de libertad	media cuadrática	F	p
intra grupos	2110,8	6	351,8	4,135	0,001
entre grupos	10974,9	129	85		
total	13085,7	135			

Tabla 15. Resultado de la comparación de las medias de IP entre carcinomas complejos, carcinomas simples tubulares y carcinomas de células escamosas ($p= 0,798$).

	sumatoria de cuadrados	grados de libertad	media cuadrática	F	p
intra grupos	23,606	2	11,803	0,227	0,798
entre grupos	1925,793	37	52,048		
total	1949,399	39			

Tabla 16. Resultado de la comparación de las medias de IP entre carcinomas simples papilares, sólidos y anaplásicos y carcinosarcomas ($p= 0,780$).

	sumatoria de cuadrados	grados de libertad	media cuadrática	F	p
intra grupos	106,885	3	35,628	0,362	0,780
entre grupos	9049,158	92	98,360		
Total	9156,042	95			

Las únicas diferencias significativas en el IP de las neoplasias luego de su comparación de a pares de TH (mediante la prueba de t) solo se hallaron entre los CC y los Cs o los CS (tabla 17). Todas las demás comparaciones arrojaron diferencias debidas al azar, incluida la comparación entre diferentes carcinomas simples. Si bien los datos provenientes de carcinomas anaplásicos (media: 48,56) fueron notablemente superiores a otros carcinomas simples, el haberlos retirado del análisis no cambió la significación de los resultados.

Tabla 17. Comparación del IP entre pares de TH mediante la prueba de t.

Carcinomas complejos (media 36,66) vs.	<i>p</i> =
carcinomas simples (media 42,98)	0,0002**
carcinomas de células escamosas (media 36,55)	0,97
Carcinomas simples vs	
carcinomas de células escamosas	0,64
carcinomas mixtos vs	
carcinomas de células escamosas	0,08

✓ **TH / EXPRESIÓN DEL VEGFR-2. Densidad óptica integrada (DOI)**

En la tabla 18 se consignan las medias y desvíos estándar de la DOI según el TH.

Tabla 18. Medias y desvíos estándar de las DOI correspondientes a diferentes THs.

TH	Media	DE
CC	71997,5	83462,2
Cs tubular	65366,4	119787,4
Cs papilar	280032,8	265700,1
Cs sólido	349561,2	297634,8
Cs anaplásico	449051,2	414189,3
CCE	35122	26684,1
CS	395358,9	321218,7

Los datos presentados en la tabla 18 fueron analizados mediante ANOVA y como

resultado se observó que los distintos TH son heterogéneos con respecto a sus DOI (tabla 19). Se realizó también la comparación entre CC, Cs tubulares y CCE (tabla 20), los que se comportaron como grupo, así como también entre Cs simples papilares, sólidos y anaplásicos y CS, con igual resultado (tabla 21).

Tabla 19. Resultado de la comparación de las medias de la DOI mediante ANOVA (*p*= 0,0000002**).

	sumatoria de cuadrados	grados de libertad	media cuadrática	F	p
intra grupos	2543056385894,5	6	423842730982	6,22	0,00
entre grupos	8783213590134,7	129	68086927055,3		
total	11326269976029,2	135			

Tabla 20. Resultado de la comparación de las medias de la DOI entre carcinomas complejos, carcinomas simples tubulares y carcinomas de células escamosas ($p= 0,733$).

	sumatoria de cuadrados	grados de libertad	media cuadrática	F	p
intra grupos	4806880907,8	2	2403440453,9	0,31	0,73
entre grupos	283276834249,6	37	7656130655,3		
total	288083715157,4	39			

Tabla 21. Resultado de la comparación de las medias de la DOI entre carcinomas simples papilares, sólidos, anaplásicos y carcinosarcomas ($p= 0,369$).

	sumatoria de cuadrados	grados de libertad	media cuadrática	F	p
intra grupos	294400777151,4	3	98133592383,8	1,06	0,37
entre grupos	8499936755885,1	92	92390616911,7		
total	8794337533036,6	95			

La mediana de la DOI para los casos estudiados fue de 129847. Tomando en cuenta ese valor se establecieron dos grupos: neoplasias con DOI baja y alta. En la tabla 22 se muestran clasificadas según TH. Si bien el valor de p de azar mediante χ^2 fue menor que mediante el análisis de varianzas, la interpretación no varió.

Tabla 22. Neoplasias de alta y baja DOI presentadas en función del TH ($p= 0,00004^{**}$).

TH	DOI alta	DOI baja	TOTAL
CC	6	23	29
Cs	38	29	67
CS	24	12	36
CCE	0	4	4
TOTAL	68	68	136

✓ **TH / DENSIDAD DE MICROVASOS (DMV)**

En la tabla 23 se consignan las medias y desvíos estándar de la DMV según el TH.

Tabla 23. Medias y desvíos estándar de la DMV correspondientes a diferentes THs.

TH	Media	DE
CC	47,7	26
Cs tubular	64,9	10,4
Cs papilar	94,7	49,1
Cs sólido	98,6	64,5
Cs anaplásico	57,1	36,1
CCE	81,6	58,6
CS	106,5	58

Se encontraron marcadas diferencias en la DMV de neoplasias de distinto TH (tabla 24). Se compararon, además, CC, Cs tubulares y CCE entre sí, los que se comportaron como grupo, de la misma manera que los Cs simples papilares, sólidos y anaplásicos y CS, entre sí (tablas 25 y 26, respectivamente).

Tabla 24. Resultado de la comparación de las medias de la DMV en diferentes TH ($p=0,00000017^{**}$).

	sumatoria de cuadrados	grados de libertad	media cuadrática	F	p
intra grupos	71467	6	11911,1	4,878	0,000
entre grupos	314992,1	129	2441,7		
Total	386459,1	135			

Tabla 25. Resultado de la comparación de las medias de la DMV entre carcinomas complejos, carcinomas simples tubulares y carcinomas de células escamosas ($p=0,057$).

	sumatoria de cuadrados	grados de libertad	media cuadrática	F	p
intra grupos	5024,6	2	2512,3	3,106	0,057
entre grupos	29931,2	37	808,9		
total	34955,9	39			

Tabla 26. Resultado de la comparación de las medias de la DMV entre carcinomas simples papilares, sólidos y anaplásicos y carcinosarcomas ($p=0,248$).

	sumatoria de cuadrados	grados de	media cuadrática	F	p

		libertad			
intra grupos	13006,480	3	4335,493	1,399	0,248
entre grupos	285060,857	92	3098,488		
Total	298067,337	95			

La mediana de la DMV para los casos estudiados fue de 70. Tomando en cuenta ese valor se establecieron dos grupos, neoplasias con DMV baja y con DMV alta. En los diferentes THs se observaron DMVs altas y bajas en proporciones muy disímiles (tabla 27). En la tabla 28 se muestra el mismo tipo de análisis aplicado solo a carcinomas simples (mediana=77), con igual interpretación según el χ^2 .

Tabla 27. Neoplasias con DMV alta y baja presentadas según TH ($p=0,0008^{**}$).

TH	DMV alta	DMV baja	TOTAL
CC	5	24	29
Cs	34	33	67
CS	27	9	36
CCE	2	2	4
TOTAL	68	68	136

Tabla 28. Carcinomas simples con DMV alta y baja ($p=0,014^{**}$).

Carcinomas simples	DMV alta	DMV baja	TOTAL
Cs tubular	1	5	6
Cs papilar	19	13	32
Cs sólido	12	9	21
Cs anaplásico	1	5	6
TOTAL	33	33	66*

* el n de carcinomas simples es menor que el consignado en la tabla 24 debido a que se retiró del análisis el Cs papilar cuya DMV fue igual a la mediana.

GRADO HISTOLÓGICO

✓ GH / EN

En la tabla 29 se presentan las neoplasias de diferente GH, agrupadas en función de la presencia de EN. Se encontraron diferencias significativas entre los tumores GH I y II con respecto a los de GH III, pero no entre los dos primeros.

Tabla 29. Presencia de EN en neoplasias de GH I y II con respecto a las GH III ($p=0,000000026^{**}$).

GH		EN +		EN -		TOTAL	
I y II	(I)	3	(1)	64	(22)	67	(23)
	(II)		(2)		(42)		(44)
III		37		32		69	
TOTAL		40		96		136	

✓ GH / LN

Los tumores con mayor o menor diferenciación histológica originaron metástasis en los LNs en proporciones muy desiguales. Las frecuencias de cada grupo y los resultados del análisis de χ^2 se muestran en la tabla 30.

Tabla 30. Metástasis en los LNs según GH (I vs II $p=0,00039^{**}$, I vs III $p=0,00008^{**}$ y II vs III $p=0,005^{**}$).

GH	LN +	LN -	TOTAL
I	1	22	23
II	22	22	44
III	51	18	69
TOTAL	74	62	136

✓ GH / IP

En la tabla 31 se consignan las medias y desvíos estándar del IP en tumores de GH I, II y III. La actividad proliferativa fue notoriamente disímil entre ellos (tabla 32).

Tabla 31. Medias y desvíos estándar de IP correspondientes a neoplasias de distintos GH.

GH	Media	DE
I	36,8	8,07
II	39,3	9,6
III	45,8	9,1

Tabla 32. Resultado de la comparación de los IP medios mediante ANOVA ($p=0,00067^{**}$).

	sumatoria de	grados	media cuadrática	F	p
--	--------------	--------	------------------	---	---

	cuadrados	de libertad			
intra grupos	1958,128	2	979,064	11,702	0,000
entre grupos	11127,656	133	83,667		
Total	13085,784	135			

✓ **GH / DOI**

En la tabla 33 se consignan las medias y desvíos estándar de la DOI según GH. Su análisis arrojó diferencias de significación estadística (tabla 34).

Tabla 33. Medias y desvíos estándar de la DOI correspondientes a neoplasias de distintos GHs.

GH	Media	DE
I	68725,1	89079,5
II	198948,3	237862,9
III	374792,4	316442,1

Tabla 34. Resultado de la comparación de las medias de la DOI de neoplasias de distinto GH ($p=0,0001^{**}$).

	sumatoria de cuadrados	grados de libertad	media cuadrática	F	p
intra grupos	1909586647350,7	2	954793323675,3	13,485	0,000
entre grupos	9416683328678,5	133	70802130290,8		
Total	11326269976029,2	135			

✓ **GH / DMV**

En la tabla 35 se consignan las medias y desvíos estándar de la DMV según GH. La DMV fue desigual entre tumores de GH I, II y III (tabla 36).

Tabla 35. Medias y desvíos estándar de la DMV correspondientes a neoplasias de distintos GH.

GH	Media	DE
I	53	19,8
II	75,5	43,8
III	101,3	60,5

Tabla 36. Resultado de la comparación de las medias de DMV ($p= 0,00021^{**}$).

	sumatoria de	grados	media	F	p
--	--------------	--------	-------	---	---

	cuadrados	de libertad	cuadrática		
intra grupos	45852,967	2	22926,484	8,952	0,000
entre grupos	340606,1	133	2560,949		
Total	386459,162	135			

ÉMBOLOS NEOPLÁSICOS

✓ ÉN / LN

La tabla 37 muestra la frecuencia comparada de desarrollo de metástasis en LNs entre tumores en los que se observaron EN y aquellos en los que no se pusieron en evidencia (prueba de χ^2). Es muy poco probable que las diferencias entre ambos grupos se debieran al azar.

Tabla 37. Hallazgo de metástasis en el LN según EN ($p=0,00000008^{**}$).

EN	LN (-)	LN (+)	TOTAL
NO	58	38	96
SI	4	36	40
TOTAL	62	74	136

INDICE DE PROLIFERACIÓN

✓ IP / EN

Las neoplasias con mayor actividad proliferativa ocasionaron émbolos en los vasos peritumorales más frecuentemente que aquellas con IP menor (tabla 38).

Tabla 38. Medias y desvíos estándar de IP correspondientes a neoplasias sin émbolos neoplásicos y con émbolos neoplásicos en los vasos tumorales ($p=0,00001^{**}$).

EN	Media	DE
NO	39,4	8,6
SI	48,7	9,5

✓ IP / LN

Según la prueba de t para la comparación de los IP medios entre neoplasias LN (-) y LN (+), las diferencias entre ambos grupos son altamente significativas (tabla 39).

Tabla 39. Medias y desvíos estándar de IP correspondientes a LN (-) y LN (+) ($p= 0,00013^{**}$).

Estado del LN	Media	DE
(-)	38,7	9,2
(+)	45,08	9,4

El valor de la mediana de IP fue 41,05. Tomando como referencia este valor, se establecieron dos grupos: neoplasias con IP bajo ($\leq 41,05$) y neoplasias con IP alto ($>41,05$). En la tabla 40 se observa la frecuencia de neoplasias de bajo y alto IP en función de la presencia de metástasis en el LN. El valor de p fue extremadamente bajo como para considerar que las diferencias halladas pudieron haberse debido al azar.

Tabla 40. Neoplasias con IP bajo y alto y frecuencia de metástasis en cada grupo ($p=<0,00001^{**}$).

	LN (-)	LN (+)	TOTAL
IP bajo	44	23	67
IP alto	18	51	69
TOTAL	62	74	136

✓ IP / EXPRESIÓN DEL VEGFR-2. Densidad óptica integrada (DOI)

La eventual asociación entre ambas variables se analizó mediante la obtención de un coeficiente de correlación. Se halló correlación positiva entre la actividad proliferativa y la expresión del *VEGFR-2*. El coeficiente obtenido indica asociación estadísticamente significativa entre las variables sin verse sustancialmente alterado por el valor de DMV. Por lo tanto, el IP aumenta conforme aumenta la expresión del *VEGFR-2*, independientemente de la densidad de vasos que perfundan la neoplasia (tabla 41, figura 15 y tabla 42).

Tabla 41. Método de correlación de Pearson para determinar la asociación entre el IP y la DOI.

		IP	DOI
IP	correlación de Pearson	1,000	0,329**
	nivel crítico bilateral	,	,000
	<i>n</i>	136	136
DOI	correlación de Pearson	0,329**	1,000
	nivel crítico bilateral	,000	,
	<i>N</i>	136	136

**correlación significativa para un nivel de $p= 0,01$ (coeficiente de correlación > nivel crítico). Se calculó el coeficiente de correlación de Spearman con iguales resultados.

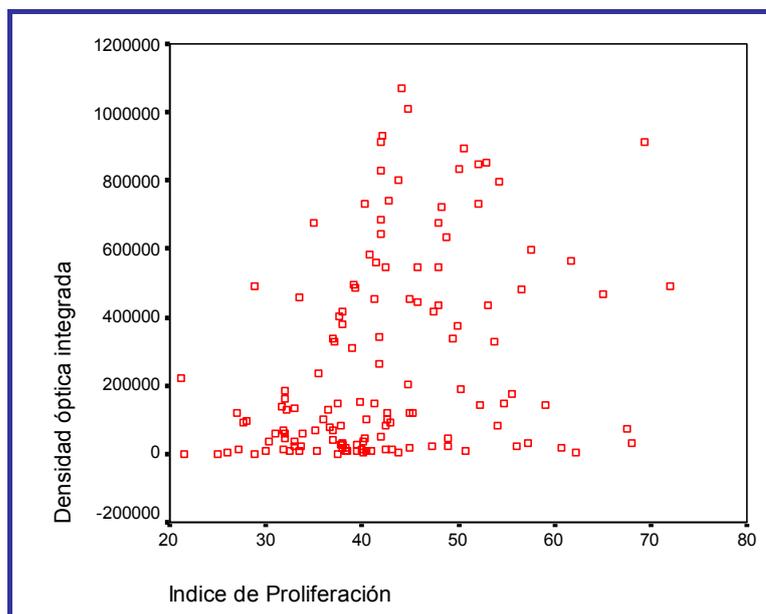


Fig. 15. Gráfico de dispersión de los casos en el que x= IP e y= DOI.

Tabla 42. Coeficiente de correlación parcial: control del factor DMV.

control vasos_x

	IP	DOI
IP	1,000	0,3254**
	$p= 0,0$	$p= 0,0$
DOI	0,3254**	1,000
	$p= 0,0$	$p= 0,0$

Para averiguar en qué magnitud varía el IP en función de un incremento de la DOI se intentó realizar el análisis de regresión entre ambas variables, que no cumplieron el supuesto de normalidad requerido (fig. 16).

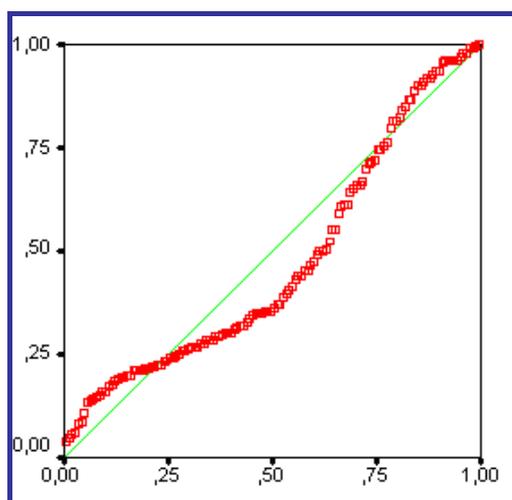


Fig. 16. Gráfico de residuos para el análisis de regresión lineal de IP y DOI. Los residuos observados (-----) no se ajustan a la diagonal esperada (-----). Las variables no cumplen el supuesto de normalidad requerido para establecer una curva de regresión.

Si bien existe correlación entre ambas variables, la clasificación de una neoplasia en función de su IP (bajo o alto) no permite predecir la expresión del *VEGFR-2*, o viceversa, según los resultados obtenidos con la prueba de χ^2 , que indican que es altamente probable que las diferencias entre los grupos obedezcan al azar (tabla 43).

Tabla 43. Comparación del IP y la DOI de los tumores como datos cualitativos ($p= 0,92$).

	DOI baja	DOI alta	TOTAL
IP bajo	35	33	68
IP alto	33	35	68
TOTAL	68	68	136

✓ IP / DMV

El coeficiente obtenido indica que no existe asociación estadísticamente significativa entre ambos parámetros (tabla 44).

Tabla 44. Método de correlación de Pearson para determinar la asociación entre el IP y la DMV.

		IP	DMV
IP	correlación de Pearson	1,000	0,058"
	nivel crítico bilateral	,	0,501
	<i>n</i>	136	136
DMV	correlación de Pearson	0,058"	1,000
	nivel crítico bilateral	0,501	,
	<i>n</i>	136	136

"correlación sin significación (coeficiente de correlación < nivel crítico). Se calculó el coeficiente de correlación de Spearman con iguales resultados.

Así como en la comparación anterior, la clasificación de una neoplasia de manera categórica en función de su IP no permite predecir la DMV, o viceversa (tabla 45).

Tabla 45. Comparación del IP y la DMV de los tumores como datos cualitativos ($p= 0,41$).

	DMV baja	DMV alta	TOTAL
IP bajo	36	32	68
IP alto	32	36	68
TOTAL	68	68	136

ANGIOGÉNESIS

✓ **DOI / DMV**

En los tumores estudiados se puso en evidencia la significativa asociación entre la expresión del *VEGFR-2* y la densidad de microvasos (tabla 46 y figura 17). Al clasificar las neoplasias en grupos (DOI y DMV bajas/altas) y comparar esos datos se encontraron diferencias notables (tabla 47).

Tabla 46. Método de correlación de Pearson para determinar la asociación entre la DOI del *VEGFR-2* y la DMV.

		DOI	DMV
DOI	correlación de Pearson	1,000	0,270**
	nivel crítico bilateral	,	0,001
	N	136	136
DMV	correlación de Pearson	0,270**	1,000
	nivel crítico bilateral	0,001	,
	N	136	136

**correlación significativa para un nivel de $p= 0,01$. Se calculó el coeficiente de correlación de Spearman con iguales resultados.

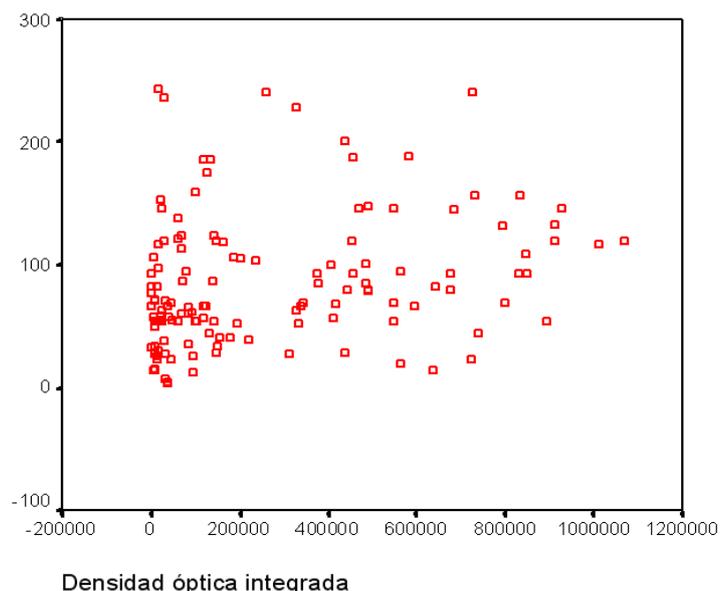


Fig. 17. Gráfico de dispersión de los casos en el que $x= DOI$ e $y= DMV$.

Las variables no cumplieron el supuesto de normalidad requerido para construir una curva de regresión.

Tabla 47. Prueba de χ^2 para comparar las frecuencias de tumores con DMV y DOI bajas/altas ($p= 0,0015^{**}$).

	DMV baja	DMV alta	TOTAL
DOI baja	41	27	68
DOI alta	26	42	68
TOTAL	68	68	136

✓ **DOI y DMV / EN**

En las tablas 48 y 49 se presentan las medias de la DOI y la DMV, respectivamente, en función de la presencia de EN. El resultado de su análisis (tabla 50) permite colegir que el perfil angiogénico fue disímil entre las neoplasias que originaron EN y aquellas que no, Las diferencias encontradas en la DOI de esos tumores tienen menos probabilidades de deberse al azar que las correspondientes a la DMV. Esta observación es parcialmente coincidente con la realizada al tratar los datos de DOI y DMV en categorías baja/alta (tablas 51 y 52). La relación entre EN y DOI se mantuvo, pero las diferencias entre tumores sin/con émbolos y baja/alta densidad de vasos se debió al azar, para un umbral de confianza de $p < 0,05$.

Tabla 48. Medias y desvíos estándar de la DOI correspondientes a neoplasias sin émbolos y con émbolos neoplásicos.

EN	Media	DE
NO	181113,6	235140,1
SI	470204,3	308591,2

Tabla 49. Medias y desvíos estándar de la DMV correspondientes a neoplasias sin émbolos y con émbolos neoplásicos.

EN	Media	DE
NO	77,6	50,06
SI	102,1	58,03

Tabla 50. Resumen de la prueba de t: comparación de medias de la DOI y de la DMV entre neoplasias con y sin émbolos en los vasos tumorales (p para DOI = 0,0001; p para DMV = 0,014).

	Prueba de Levene (homogeneidad de varianzas)		prueba de t para medias		
	F	p	T	grados de libertad	p (para prueba de dos colas)
DOI	6,53	0,01	-5,317	58,741	0,0001**
DMV	,960	0,32	-2,484	134	0,014**

Tabla 51. Presencia de EN en relación con la DOI, prueba de χ^2 ($p = 0,0006^{**}$).

	DOI baja	DOI alta	TOTAL
EMBOLOS (-)	59	37	96
EMBOLOS (+)	9	31	40
TOTAL	68	68	136

Tabla 52. Presencia de EN en relación con la DMV, prueba de χ^2 ($p = 0,132$).

	DMV baja	DMV alta	TOTAL
EMBOLOS (-)	52	44	96
EMBOLOS (+)	16	24	40
TOTAL	68	68	136

✓ DOI y DMV / LN

Se analizó la relación entre ambos parámetros (DOI y DMV) y la presencia de metástasis en el linfonódulo (mediante sendas pruebas de *t*). En la tabla 53 se muestran los valores medios de DOI y DMV en los grupos de neoplasias LN (-) y LN (+). Ambos parámetros se asociaron estrechamente con la probabilidad de desarrollo de metástasis en el LN

Tabla 53. Valores medios de DOI y DMV en neoplasias LN(-) y LN(+) ($p < 0,0009^{**}$ para la prueba de *t*).

	LN (-)	LN (+)
DOI	57,6	485,7
DMV	68,47	89,40

✓ **TODAS LAS VARIABLES / LN**

A partir de la regresión logística múltiple por pasos fueron seleccionadas dos variables para la predicción del estado del LN: EN y DOI del *VEGFR-2*. Las variables, valor de la estimación, límites del intervalo de confianza y valor de *p* se muestran en la tabla 54.

Tabla 54. Análisis de regresión logística múltiple por pasos.

variable seleccionada	estimación	límite menor (intervalo de confianza, 95 %)	límite mayor (intervalo de confianza, 95 %)	<i>p</i> =
EN	0,938	0,252	1,624	0,007^{**}
DOI	0,0001	0,000001	0,001	<0,001^{**}

CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GRUPO II (n = 34)

❖ Edad

El promedio de edad de las pacientes de este grupo fue: 9,6 años (rango 4-15).

❖ Raza

Catorce de las perras eran mestizas, cuatro de raza ovejero alemán, tres bretonas, dos pequinesas, dos cocker spaniel, dos dobermann, dos fox terrier y una de cada una de las siguientes razas: basset hound, ovejero belga, labrador retriever, rottweiler y viejo pastor inglés.

❖ Tamaño de la neoformación

El rango del tamaño de las masas tumorales se encontró entre 0,3 cm y 15 cm. La frecuencia de hallazgo de metástasis en los LNs fue significativamente diferente entre neoplasias ≤ 3 cm vs aquellas > 3 cm (tabla 55).

Tabla 55. Metástasis en los LNs en neoplasias de diferente tamaño ($p= 0,028^{**}$).

Tamaño	LN +	LN -	TOTAL
≤ 3 cm	3	10	13
>3 cm	13	8	21
TOTAL	16	18	34

No se encontraron diferencias en el comportamiento angiogénico entre neoplasias de diferentes tamaños (tabla 56). Aun en algunas neoplasias pequeñas⁸ se registraron valores altos⁹ de expresión del VEGFR-2 (4/13) y de DMV (5/13); por el contrario, en algunas neoplasias de mayor tamaño se hallaron valores bajos para ambos parámetros (11/21 y 7/21, respectivamente).

Tabla 56. Medias de la DOI y la DMV para neoplasias de diferente tamaño y resultado de su comparación.

Tamaño	DOI	DMV
≤ 3 cm	170978,4	61,53
>3 cm	203810,04	67,30
$p=$ (prueba de t)	0,081	0,17

❖ Tiempo de evolución

⁸ igual ó < 3 cm
⁹ mayores que la mediana

En trece casos la evolución no se conocía. En los casos de evolución conocida, ésta se encontraba entre una semana y dos años, según el relato de los propietarios.

❖ **Localización**

La localización de las neoplasias analizadas se muestra en la tabla 57. Sobre 34 neoplasias analizadas, 31 correspondieron a mamas de los últimos tres pares.

Tabla 57. Frecuencia de neoplasias en las distintas mamas.

cadena mamaria izquierda (mama afectada)	neoplasias	cadena mamaria derecha	neoplasias
torácica craneal	0	torácica craneal	1
torácica caudal	1	torácica caudal	1
abdominal craneal	1	abdominal craneal	2
abdominal caudal	2	abdominal caudal	7
inguinal	10	Inguinal	9

❖ **Estado del LN**

En siete de los diez casos en que se había comprobado linfadenomegalia, mediante el examen físico, se encontraron metástasis. En nueve de los LN que se diagnosticaron como positivos mediante tinción de rutina no se habían reconocido anomalías durante el examen físico. En un LN aparentemente normal se detectaron micrometástasis ocultas mediante IHQ. Luego de los diversos procedimientos de determinación del estado del LN, dieciséis sobre un total de 34 se consideraron positivos.

❖ **Metástasis a distancia**

En un caso se encontró una imagen ecográfica compatible con metástasis a distancia (al linfonódulo ilíaco medial).

❖ **Estadio de la enfermedad**

Se encontraron diez pacientes en estadio I, tres en estadio II, cinco en estadio III y dieciséis en estadio IV.

❖ Tipo histológico

Los THs hallados y su frecuencia se muestran en la tabla 58.

Tabla 58. Frecuencia de los distintos tipos histológicos en la muestra analizada.

TH	TOTAL
carcinomas complejos	7
carcinomas simples	20
<i>tubulares</i>	3
<i>papilares</i>	6
<i>sólidos</i>	9
<i>anaplásicos</i>	2
carcinosarcomas	7
TOTAL	34

❖ Grado histológico

Nueve de los tumores eran de GH I, diez de GH II y quince de GH III.

❖ Presencia de émbolos

En nueve de 34 neoplasias se observaron émbolos carcinomatosos en los vasos peritumorales.

❖ Índice de proliferación

El promedio de proliferación fue de 41,28 con una mediana de 40,55 y un rango entre 28,8 y 60,7. Se indagó acerca de la eventual asociación entre la actividad proliferativa de la neoplasia y el tamaño tumoral, y entre la proliferación y la edad de la paciente, mediante sendos análisis

de correlación. Los resultados permitieron desestimar la asociación en ambos casos (tablas 59 y 60, respectivamente).

Tabla 59. Análisis de correlación de Pearson para estimar la asociación entre el IP del tumor y la edad de la paciente.

		EDAD	IP
EDAD	correlación de Pearson	1,000	0,146"
	nivel crítico bilateral	,	0,410
	<i>n</i>	34	34
IP	correlación de Pearson	0,146"	1,000
	nivel crítico bilateral	0,410	,
	<i>n</i>	34	34

"correlación sin significación. Se calculó el coeficiente de correlación *rho* de Spearman con iguales resultados

Tabla 60. Análisis de correlación *rho* de Spearman para estimar la asociación entre el IP y el tamaño del tumor.

		IP	TAMAÑO
IP	coeficiente de correlación	1,0	0,100"
	nivel crítico bilateral	,	0,575
	<i>n</i>	34	34
TAMAÑO	coeficiente de correlación	0,100"	1,000
	nivel crítico bilateral	0,575	,
	<i>n</i>	34	34

"correlación sin significación

Ⓞ Expresión del VEGFR-2

La media de la DOI de expresión del VEGFR-2 fue de 262478,7 y la mediana de 111815,3.

Ⓞ Densidad de microvasos/mm²

La media de la DMV/mm² fue de 64,7 y la mediana de 66,7.

❖ **Seguimiento clínico.** Los resultados se muestran en la tabla 61

Tabla 61. Eventos relevantes ocurridos durante los 18 meses de seguimiento.

	I	II	pacientes en las que pudo realizarse el examen		V	VI
		pacientes para seguimiento	III	IV	pacientes censuradas	pacientes no examinadas
			S/P	mueras durante el periodo		
A	1º examen (6 meses pos diagnóstico)	34	23^{**}	6 (casos 7, 8, 16, 27, 28, 29)	4 (casos 24 ^{††} , 30 ^{‡‡} , 31, 32)	1
B	2º examen (12 meses pos diagnóstico)	24 (II A - [IV A + V A])	18^{§§}	ninguna	4 (casos 11, 12, 13, 25)	2
C	3º examen (18 meses pos diagnóstico)	20 (II B - V B)	19^{***}	1 (caso 23)	ninguna	ninguna

S/P: sin particularidades

** el seguimiento del caso 20 se realizó telefónicamente

†† censurada por muerte no relacionada con la neoplasia en estudio

‡‡ falleció 5 meses PD durante la quimioterapia

§§ el seguimiento del caso 22 se realizó a los 11 meses por imposibilidad del propietario de concurrir a los doce. El seguimiento del caso 29 se realizó telefónicamente

***pacientes vivas al finalizar el periodo

Siete sobre un total de ocho muertes ocurridas durante el periodo se atribuyeron a las consecuencias de la neoplasia mamaria. A dos de las pacientes se les practicó eutanasia debido al deterioro general y a la disnea asociada a las metástasis pulmonares. Tres de las muertes ocurrieron un mes después del diagnóstico, dos a los cinco meses aproximadamente, y las restantes a los cuatro y catorce meses luego del diagnóstico. Ocho fueron censuradas (excluidas del estudio de seguimiento) en razón de comenzar quimioterapia (casos 25, 30 y 31), hacerse inaccesibles para su seguimiento (casos 11, 12, 13 y 32) o debido a muerte por causa no relacionada (caso 24).

Tiempo de supervivencia

-Pacientes con supervivencia baja: 6

-Pacientes con supervivencia media: 1

-Pacientes con supervivencia alta: 19

Según surge del análisis de los datos, la probabilidad de vida luego de 1 mes y a los 4, 5 y 14-18 meses fue de 0,91, 0,87, 0,81 y 0,77, respectivamente (fig. 18).

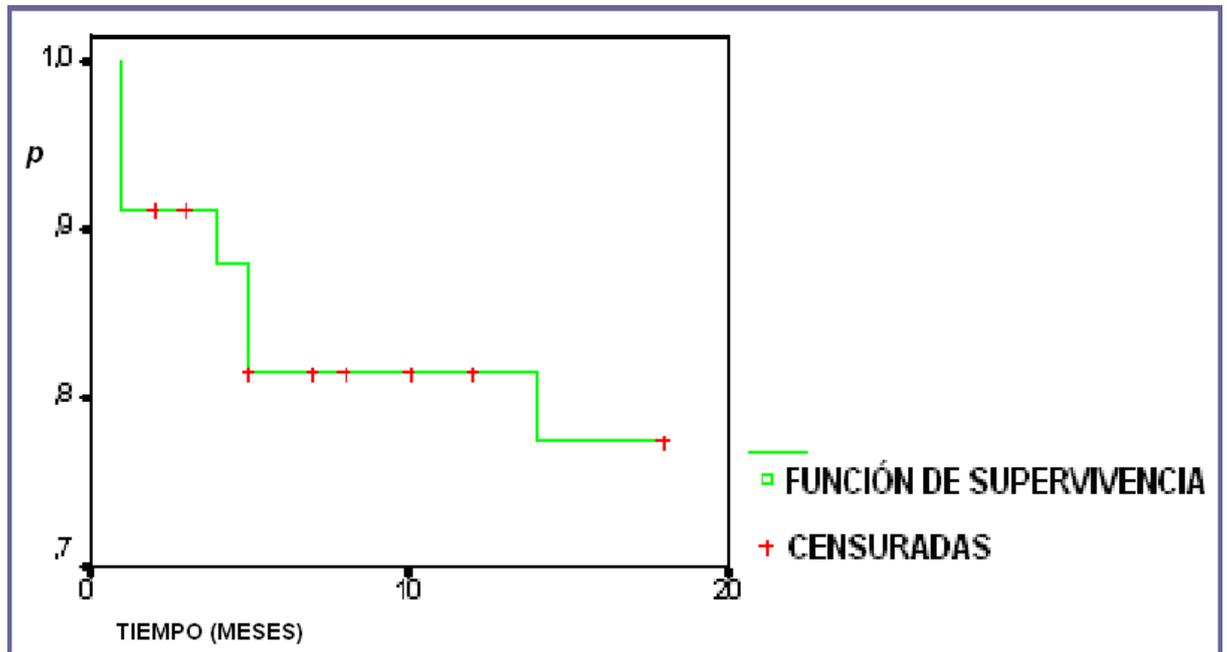


Fig. 18. Curva de supervivencia construida mediante el método de Kaplan-Meier. En el eje de las abscisas se consigna el tiempo de seguimiento en meses, mientras que en el eje de las ordenadas consta la probabilidad (p) de supervivencia.

RELACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ESTUDIADAS CON EL TIEMPO DE SUPERVIVENCIA (para $n = 26$)

⊕ Edad /supervivencia

Los promedios de edad en el momento del diagnóstico fueron

SB: 11,3 años

SM: 15 años (1 caso)

SA: 8,3 años

El caso de SM se exceptuó del análisis. Las diferencias en la edad promedio de las pacientes según el tiempo de supervivencia fueron significativas según la prueba de t, pero el valor de p (0,0482) puede considerarse limítrofe en razón de la baja n .

⊕ Tamaño/supervivencia

Si bien se constató supervivencia alta en 9 de las 10 pacientes con neoplasias de 3 cm o menos, aquellas con neoplasias de mayor tamaño tuvieron supervivencia baja o alta en similar proporción. Las diferencias entre los grupos no alcanzaron significación estadística (tabla 62).

Tabla 62. Supervivencia de las pacientes con distinto tamaño tumoral ($p= 0,122$).

Supervivencia	SB O SM	SA	TOTAL
Tamaño			
≤ 3 cm	1	9	10
>3 cm	6	10	16
TOTAL	7	19	26

SB, SM, SA: supervivencia baja, media y alta, respectivamente

⊕ Tiempo de evolución/supervivencia

El promedio de evolución en los casos de SB o SM (5 casos con datos) fue de 201,4 y el de aquellos con SA fue de 222 días (9 casos con datos).

⊕ Localización /supervivencia

Una de 6 pacientes con neoformaciones de los 3 primeros pares y seis de 20 con neoplasias en los últimos 2 pares tuvieron supervivencia baja o media. Las diferencias entre los grupos se atribuyeron al azar según la prueba de χ^2 (tabla 63).

Tabla 63. Supervivencia de las pacientes en función de la localización tumoral ($p= 0,2477$).

Localización	Supervivencia	SB o SM	SA	TOTAL
primeros 3 pares		1	5	6
últimos 2 pares		6	14	20
TOTAL		7	19	26

SB, SM, SA: supervivencia baja, media y alta, respectivamente

🔗 Estadio/supervivencia

La cantidad de pacientes con SB o SM y SA de distintos estadios clínicos se muestra en la tabla 64.

Tabla 64. Supervivencia de las pacientes en función del estadio clínico.

Estadio	Supervivencia	SB o SM	SA	TOTAL
I		0	8	8
II		0	2	2
III		1	2	3
IV		6	7	13
TOTAL		7	19	26

SB, SM, SA: supervivencia baja, media y alta, respectivamente

🔗 Tipo histológico/supervivencia

La cantidad de pacientes con SB o SM y SA en función del TH se muestra en la tabla 65.

Tabla 65. Supervivencia de las pacientes en función del tipo histológico.

TH	Supervivencia	SB o SM	SA	TOTAL
CC		1	5	6
Cs		4	11	15
CS		2	3	5
TOTAL		7	19	26

SB, SM, SA: supervivencia baja, media y alta, respectivamente. TH: tipo histológico

🔗 Grado histológico/supervivencia

No se encontraron diferencias significativas en la supervivencia de pacientes portadoras de neoplasias GH I, II ó III (tabla 66).

Tabla 66. Supervivencia de las pacientes con tumores de distinto grado de diferenciación ($p= 0,341$).

GH	Supervivencia	SB o SM	SA	TOTAL
I		1	6	7
II		3	4	7
III		3	9	12
TOTAL		7	19	26

SB, SM, SA: supervivencia baja, media y alta, respectivamente. GH: grado histológico

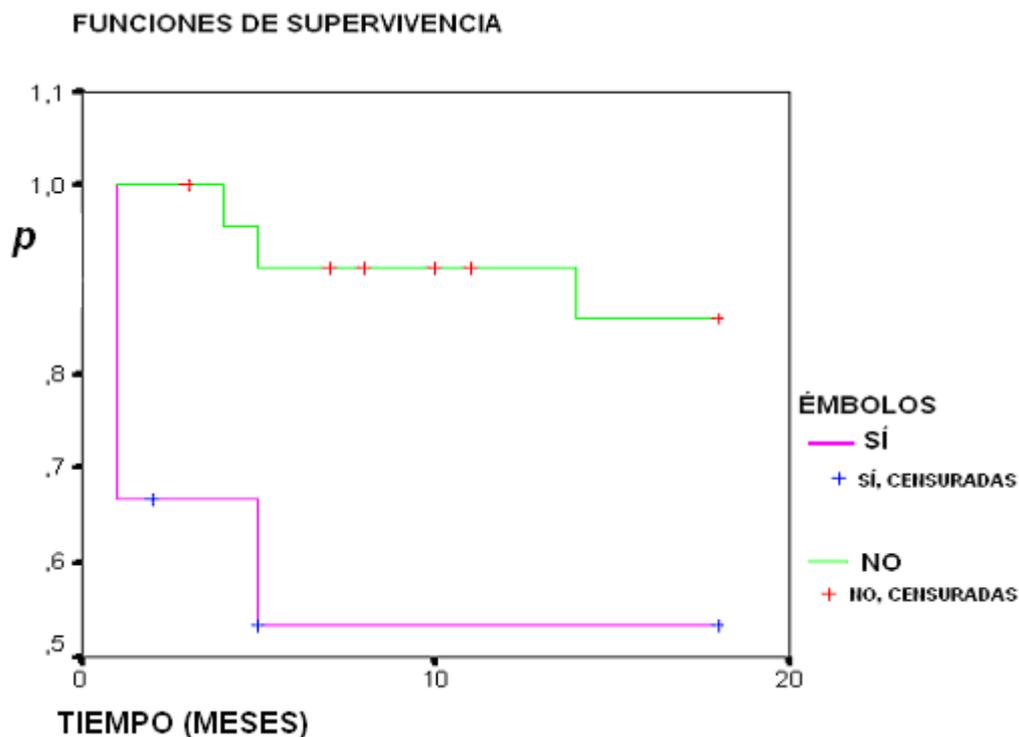
❖ Presencia de émbolos neoplásicos/supervivencia

Con respecto a su influencia en la SV de las pacientes, en muestras de cuatro de las seis pacientes que murieron en menos de seis meses se encontró invasión neoplásica en los vasos. Al analizar los resultados de todo el grupo contrastando categorías mediante la prueba de χ^2 (émbolos SÍ/NO, SV baja o media/ SV alta) las diferencias resultaron significativas, pero p alcanzó un valor cercano al límite de significación (tabla 67). No obstante, mediante la prueba del logaritmo del rango aplicada a la curva de supervivencia de Kaplan-Meier (fig. 19), las diferencias halladas fueron más notorias ($p= 0,0175$), con amplia desigualdad en la probabilidad de supervivencia, por ejemplo, luego de 1, 5 y 18 meses pos diagnóstico (0,66, 0,53 y 0,53 para individuos con EN y de 0,99, 0,91 y 0,85 para aquellos sin EN).

Tabla 67. Supervivencia de las pacientes en función del hallazgo de émbolos neoplásicos ($p= 0,048^{**}$).

EN	Supervivencia	SB o SM	SA	TOTAL
EN (-)		3	16	19
EN (+)		4	3	7
TOTAL		7	19	26

SB, SM, SA: supervivencia baja, media y alta, respectivamente. EN: émbolos neoplásicos en los vasos tumorales



logaritmo del rango= 5,65	GL: 1	$p= 0,0175^{**}$
---------------------------	-------	------------------

Fig. 19. Curvas de supervivencia para pacientes sin y con émbolos neoplásicos y valor de p según el logaritmo del rango. En el eje de las abscisas se consigna el tiempo de seguimiento en meses, mientras que en el eje de las ordenadas consta la probabilidad (p) de supervivencia.

❖ **Estado del LN/supervivencia**

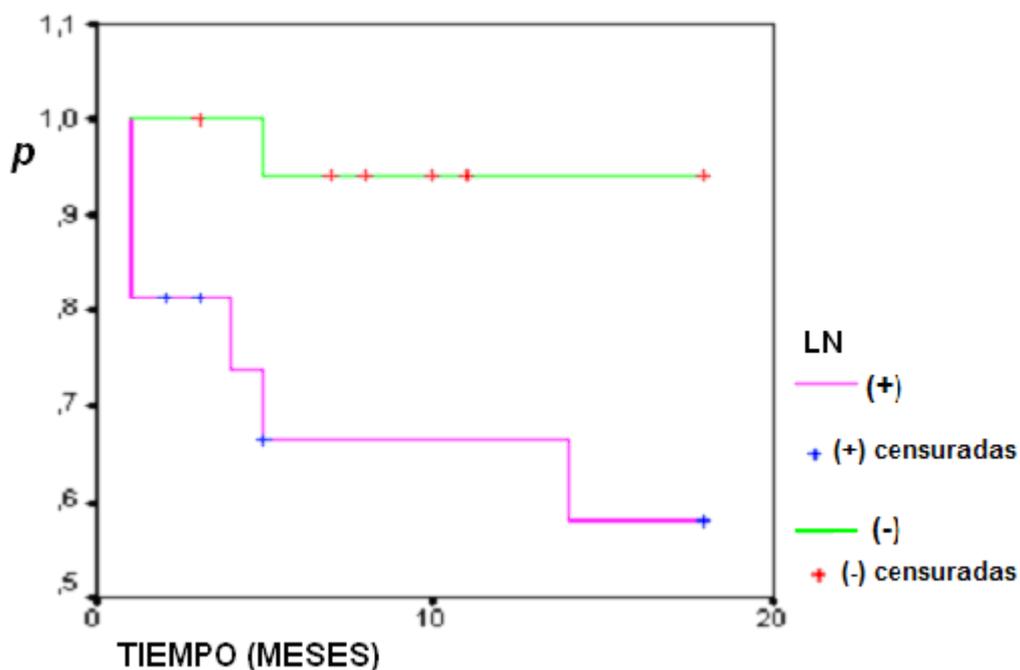
Es altamente probable que las diferencias entre casos LN (+) y LN (-) con respecto a la supervivencia no se hubieran debido al azar ($p= 0,027$), si se analizan los grupos de perras con supervivencia baja y media en relación con el estado del LN (tabla 68). Este resultado se confirmó mediante la prueba del logaritmo del rango aplicada a la curva de supervivencia Kaplan-Meier, que arrojó un valor para $p= 0,016$ (fig.20).

Tabla 68. Supervivencia de las pacientes en función del estado del LN ($p= 0,027^{**}$).

LN	Supervivencia	SB o SM	SA	TOTAL
LN (-)		1	12	13
LN (+)		6	7	13
TOTAL		7	19	26

SB, SM, SA: supervivencia baja, media y alta, respectivamente. LN: linfonódulo

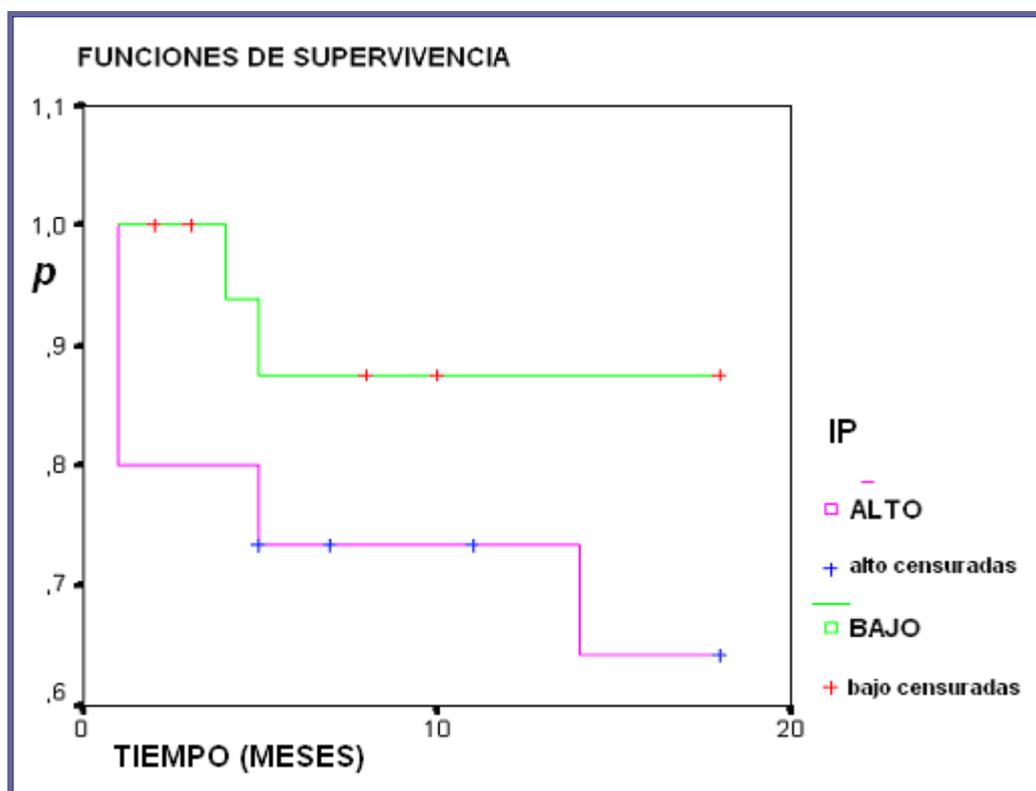
FUNCIONES DE SUPERVIVENCIA



logaritmo del rango= 5,73	GL: 1	$p= 0,0167^{**}$
---------------------------	-------	------------------

Fig. 20. Curvas de supervivencia para pacientes con y sin metástasis en el linfonódulo y valor de p según el logaritmo del rango. En el eje de las abscisas se consigna el tiempo de seguimiento en meses, mientras que en el eje de las ordenadas consta la probabilidad (p) de supervivencia.

Los promedios del IP para los grupos de SB, SM y SA fueron: 40,7, 41,8 y 40,78, respectivamente. Las diferencias entre los grupos son escasas (fig. 21).



logaritmo del rango= 2,32 GL: 1 $p= 0,127$

Fig. 21. Curvas de supervivencia para pacientes con IP alto y bajo (en este concepto se incluyó el caso con SV media) y valor de p según el logaritmo del rango. En el eje de las abscisas se consigna el tiempo de seguimiento en meses, mientras que en el eje de las ordenadas consta la probabilidad (p) de supervivencia.

⊕ DOI/supervivencia

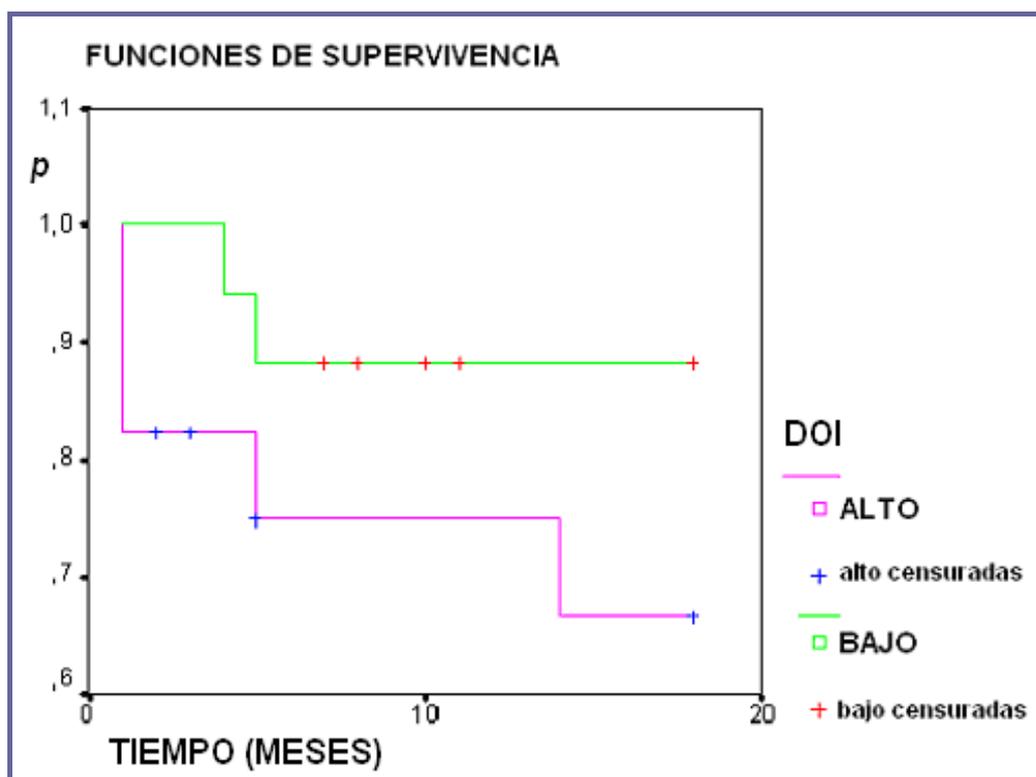
Los promedios de DOI para los grupos fueron:

SB: 395647,132

SM: 342176,71

SA: 216231,008

Según el resultado de la prueba de t para la comparación de medias entre los grupos de SB/SM y el de SA, las diferencias entre ambos con respecto a su DOI no son significativas y probablemente se deban al azar ($p = 0,267$). Similares resultados (aunque con valor de $p = 0,1521$) se obtuvieron mediante la prueba del logaritmo del rango con la curva de Kaplan-Meier (fig.22).



logaritmo del rango= 2,05 GL: 1 $p= 0,152$

Fig. 22. Curvas de supervivencia para pacientes con DOI alta y baja (en este concepto se incluyó el caso con SV media) y valor de p según el logaritmo del rango. En el eje de las abscisas se consigna el tiempo de seguimiento en meses, mientras que en el eje de las ordenadas consta la probabilidad (p) de supervivencia.

⊕ DMV/supervivencia

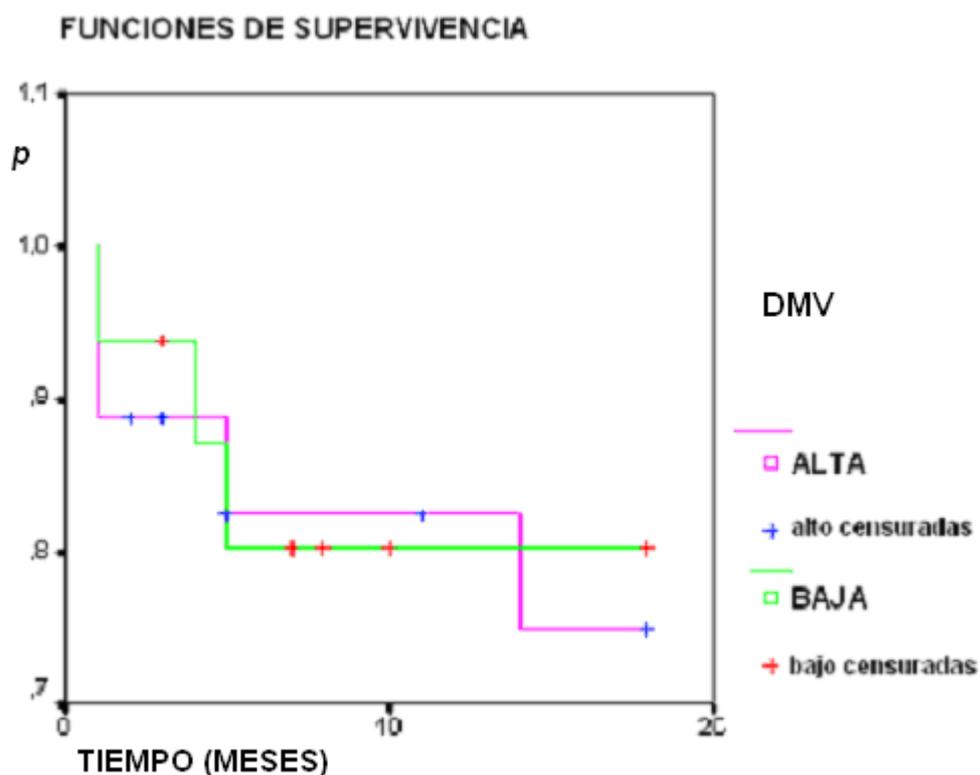
Los promedios de DMV para los grupos fueron:

SB: 57,78

SM: 69,3

SA: 66,73

Según el resultado de la prueba de t para la comparación de medias entre los grupos de SB/M y el de SA, las diferencias entre ambos con respecto a su DMV no son significativas y muy probablemente se deban al azar ($p= 0,686$). El análisis de los datos mediante el logaritmo del rango ($p = 0,80$) lleva a la misma interpretación (fig. 23).



logaritmo del rango= 0,06	GL: 1	p= 0,80
----------------------------------	--------------	----------------

Fig. 23. Curvas de supervivencia para pacientes con DMV alta y baja (en este concepto se incluyó el caso con SV media) y valor de p según el logaritmo del rango. En el eje de las abscisas se consigna el tiempo de seguimiento en meses, mientras que en el eje de las ordenadas consta la probabilidad (p) de supervivencia.

DISCUSIÓN

Las 1671 neoplasias mamarias diagnosticadas entre 1980 y 2003 en el Instituto de Patología Dr Bernardo Epstein constituyeron el 41% del total de tumores de los caninos y el 67,2% de las neoplasias de las perras en particular, valores notablemente superiores a aquellos informados por otros autores (132, 133, 134, 136, 137, 138, 140, 141, 142).

Se encontró una frecuencia relativamente alta de neoplasias mamarias malignas. El porcentaje de malignidad, aún durante los años más recientes del relevamiento (1992-2003: 60,96%), es superior al informado en la mayor parte de los trabajos. La proporción hallada es más cercana a la informada en trabajos realizados en Europa (132, 133, 134, 140, 141) y por el autor japonés (142) cuyos artículos se consultaron que a la encontrada en estudios realizados en EE.UU. (136, 137, 138).

La mayor proporción de neoplasias mamarias sobre las totales puede reflejar una muy alta frecuencia de esta entidad en nuestro medio o, tal vez, el subdiagnóstico de otros tumores originados en órganos menos accesibles al diagnóstico. La alta frecuencia de neoplasias mamarias en general, y malignas en particular, podría atribuirse a la infrecuente ovariectomía temprana de las perras, tanto en nuestro medio como en el resto de américa latina, Europa y Asia. También podría obedecer a que gran parte de las neoplasias “clínicamente benignas” son remitidas para diagnóstico histopatológico en menor proporción que aquellas “clínicamente malignas”.

Tamaño de la neoplasia

En el grupo en que se registró el tamaño, se encontró asociación entre este parámetro y la frecuencia de metástasis en el LN. Observaciones similares han sido publicadas en medicina humana (174, 175). Al igual que en los trabajos de Peña (1998) y de Funakoshi (2000), no se encontró relación entre el IP y el tamaño (164, 201). En el presente estudio no se demostró relación entre el tamaño de las neoplasias y la supervivencia de las pacientes. Si bien ello concuerda con los resultados de Karayannopoulou (166), contrasta con los datos obtenidos por la mayor parte de los autores que estudiaron el tema (142, 162, 176, 177).

Tipo histológico

Los carcinomas simples fueron los más numerosos (aproximadamente el 50 % del total) la mayor parte papilares y sólidos, en concordancia con los datos publicados (138, 142). En orden de frecuencia siguieron los CS (26,47 %). Este valor se aproxima al informado recientemente por Yang (195) y se contrapone a datos aparecidos en artículos anteriores, provenientes de un número mayor de casos, en los que se los consideraba sumamente infrecuentes (137, 138). Estas discrepancias podrían atribuirse a las dificultades que presentan las neoplasias mamarias con desarrollo de tejidos cartilaginoso y/u óseo para su clasificación.

Dos de cada 10 fueron CC, frecuencia acorde con la conocida para este TH en perras (142, 155).

Entre los tipos especiales de carcinomas no se diagnosticaron carcinomas de células fusiformes, mucinosos o ricos en lípidos y los CCE fueron escasos, hallazgo coincidente con la muy baja frecuencia informada en los textos consultados (155).

En el grupo II se documentaron proporciones de THs similares a las indicadas para el grupo I, aunque los Cs se encontraron levemente sobre-representados en detrimento de los CS. No se diagnosticaron tipos especiales de carcinomas en este grupo.

Con respecto a la frecuencia de hallazgo de émbolos en CC, Cs, CS y CCE, las diferencias fueron notorias, aunque no se pudo establecer su significación estadística¹⁰, lo que sí fue posible para las diferencias entre los subtipos de carcinomas simples.

A diferencia de lo informado por otros autores (164, 201, 207), se pusieron de manifiesto diferencias significativas en la proliferación de neoplasias de distintos THs (CC, CS y CS), aún habiéndose encontrado superposición de valores en los desvíos estándar del IP como en los trabajos de los autores mencionados.

En relación con la presencia de EN, IP y perfil angiogénico (DOI del *VEGFR-2* y DMV), luego de distintos análisis de los datos pudieron establecerse dos grupos de THs: aquel constituido por tumores con escasos émbolos neoplásicos, bajos IP, DOI del *VEGFR-2* y DMV (CC, Cs tubulares y CCE) y el conformado por neoplasias de características opuestas (Cs papilares, sólidos, anaplásicos y carcinosarcomas).

En el grupo compuesto por los CC, Cs tubulares y CCE se observaron EN en 1/36 tumores, los IP fueron los más bajos, las medias de la DOI ocho veces menores y la DMV de aproximadamente el 50 % de los valores hallados para el segundo grupo de THs. Los THs que integran cada grupo fueron más homogéneos con respecto a sus DOI que a sus DMV. Ya que la formación de nuevos vasos es un proceso que involucra múltiples vías de señalización (21, 72), la mayor variación en el número de vasos x mm² pudo haberse debido a la participación de vías diferentes de la estudiada. La baja expresión del *VEGFR-2* en los CC puede ser una manifestación del efecto inhibitor de la angiogénesis por parte de las células mioepiteliales. Este se logra mediante diferentes mecanismos, entre los cuales el impedimento para la liberación de la fracción del *VEGF* ligada a proteoglicanos de la matriz (124, 126) puede relacionarse con la baja expresión e *VEGFR-2* aquí descrita. Las características demostradas en los CC estudiados (escasa capacidad de invadir los vasos en forma de émbolos, de proliferar y de generar nuevos vasos) coinciden con lo expresado por varios autores, quienes postulan que las células mioepiteliales tienen un fenotipo supresor tumoral (122, 124, 125,

¹⁰ por la presencia de celdas con 0 (ceros) y $\eta < 5$

126). Estas células actuarían como inhibidores de la proliferación, invasión y angiogénesis e inductores de apoptosis. La base molecular para estas actividades la constituye la expresión de varias moléculas, entre ellas de los inhibidores de proteasas (124, 126). La demostración de *BMPs* y sus receptores en carcinomas complejos de caninos (192) permite especular que, además de mediar la formación ectópica de hueso y cartílago, la alta expresión de esta proteína estaría involucrada en la inhibición de la proliferación y de la migración. La actividad de las moléculas mencionadas pudo tener como resultado los valores bajos hallados en los CC para estimadores de proliferación, angiogénesis e invasión a través de la *ECM*, condición imprescindible para la formación de EN. En los carcinomas con diferenciación escamosa (CCE), agrupados según sus características junto con los CC, también se demostró la expresión de *BMPs* (192). Esta familia de proteínas está involucrada durante el desarrollo con varios procesos, entre ellos las inducciones entre epitelio y mesénquima para la formación y elongación de las estructuras tubulares en la glándula mamaria y su diferenciación. Los carcinomas más diferenciados, que mantienen la polaridad celular y la organización de su lámina basal, son los Cs tubulares, el tercer TH que integra este grupo.

No se manifestaron diferencias en el comportamiento angiogénico entre CS papilares y CS sólidos. Ello podría deberse a que se trata de dos patrones de crecimiento de la masa tumoral que corresponderían a células de diferenciación similar dividiéndose con mayores o menores posibilidades de expansión, respectivamente, sin diferencias importantes en cuanto a su expresión génica.

La frecuencia de CC de GH I hallada fue menor que la informada por Karayannopoulou en 2005 (166). En acuerdo con los resultados obtenidos por dicho autor, aproximadamente el 50 % de los carcinomas simples resultaron de GH III. Ya que la formación de estructuras tubulares es una de las características que compone el grado, era esperable que la mayoría de neoplasias de tipo histológico tubular fueran de GH I (6/7).

Los distintos THs (complejos, simples –tomados como un grupo- y mixtos malignos) originan metástasis con frecuencias diferentes. No obstante, los datos no se ajustan al

continuo de carcinomas “menos metastásicos” a “más metastásicos” propuesto por Misdrorp (WHO):

CC Cs tubular Cs papilar Cs sólido Cs anaplásico tipos especiales CS

Los Cs tubulares originaron menos metástasis que los CC. En efecto, tanto los CC como los Cs tubulares y los CCE se comportaron de la misma manera en referencia a la proporción de metástasis desarrolladas en el LN. Los CS ocasionaron una cantidad de metástasis equiparable a aquella producida por los Cs anaplásicos (en el grupo dos, 4/6 pacientes muertas en menos de 6 meses posdiagnóstico eran portadoras de estos tipos tumorales). Los Cs papilares y sólidos pueden considerarse como de la misma población, con valores intermedios:

CC

Cs tubular Cs papilar CS

CCE Cs sólido Cs anaplásico

Los CC podrían, entonces, considerarse como los de mejor pronóstico, en concordancia con Misdrorp (137, 155), pero acompañados por los Cs tubulares y los CCE mamarios que, si bien son invasivos localmente, no originan metástasis de manera habitual. Si bien los carcinomas simples son considerados por Sorenmo como los más malignos (dentro de aquellos relativamente frecuentes, esta autora no considera los CS por su número “despreciable”) en este estudio solo los anaplásicos pueden ser considerados en el extremo del continuo.

Existe coincidencia en afirmar que los distintos TH influyen en la supervivencia de las pacientes, a excepción de los resultados obtenidos por Chang y col. (2005) y Perez Alenza (1997) (176, 177).

El tiempo de supervivencia constatado en las portadoras de carcinomas simples fue discrepante con el informado por Karayannopoulou, ya que la mayoría sobrevivió, por lo

menos, hasta terminar el estudio. Conforme con dicho autor, que informó que ninguna portadora de un CC murió durante 2 años, en este trabajo 6/7 sobrevivieron 18 meses o más (166). Sin embargo, más allá de la comparación, no corresponde contrastar este resultado con otros publicados debido al bajo η de este grupo. De los datos puede inferirse que la diferencia en la supervivencia de las perras con TH dispares pudo deberse al azar.

No obstante, sí es posible indicar el valor pronóstico que tuvo el TH en las muestras estudiadas, si se considera como variable dependiente el hallazgo de metástasis en el LN.

Grado histológico

En dos trabajos de neoplasias mamarias de caninos se utilizó el mismo criterio para la asignación del GH que en este trabajo (la escala de Nottingham -Bloom Richardson modificada-) (87, 166). Uno de ellos (166) se llevó a cabo utilizando un campo de observación de diámetro mayor, razón por la que los datos del recuento mitótico no pueden compararse ya que a igual cantidad de mitosis por campo, el autor referido asignó un grado menor. Eso explica que en ambos grupos aquí estudiados se encontró mayor proporción de neoplasias con moderada o pobre diferenciación que aquellas informadas en los trabajos de referencia.

Cuanto menor fue la diferenciación (GH mayor) de los tumores estudiados en esta tesis, mayor fue la DMV, con marcada disimilitud entre los valores medios para cada GH. Esta misma relación entre el GH y la DMV fue informada en caninos por Millanta y colaboradores (87), quienes comunicaron una mediana de DMV muy similar a la encontrada en este estudio (74 y 70 vasos por mm^2 , respectivamente). Entre el GH y la expresión del *VEGFR-2* se puso en evidencia la misma relación, en contraposición a los resultados obtenidos en mujeres por Nakopoulou, quien encontró relativa homogeneidad en la expresión del *VEGFR-2* entre tumores de distinto GH (101). En su trabajo la cuantificación de los resultados de la inmunomarcación con anti-*Fik-1* fue diferente de la realizada en este estudio, ya que consignaron los resultados como variables categóricas (“tumor (+)” o “tumor (-)” para el

receptor, en función del porcentaje de células positivas por campo) que, por lo tanto, se analizaron con métodos estadísticos diferentes de los aquí utilizados.

En las neoplasias de GH III (muy indiferenciadas, con patrones de crecimiento diferentes del tubular, con mayor número de mitosis) se observaron EN con mayor frecuencia que en las de GH I y II. Este hallazgo es acorde con el mayor número de EN en neoplasias de TH indiferenciados (sólidos y anaplásicos) y alta proliferación.

El GH es considerado como marcador de categoría 1 (173). Westened informó diferencias significativas en la aparición de metástasis en el LN entre mujeres con neoplasias GH I/II y aquellos con neoplasias de GH III (175). Los resultados obtenidos aquí se ajustan a aquellos aunque, además, se encontraron diferencias de significación estadística en el comportamiento metastásico entre neoplasias de GH I y GH II (166).

Varios autores pusieron de manifiesto la relación entre el GH y la supervivencia de las pacientes (tanto en humanos como en caninos y felinos) (174, 196, 197, 198, 199). En caninos se comunicó que ninguna paciente con neoplasia GH I murió durante dos años de seguimiento. En nuestro estudio, 6/7 pacientes con neoplasias GH I sobrevivieron por lo menos 18 meses. En 73 % de las neoplasias de GH III se encontraron LN (+), un valor varios puntos por encima de lo informado (166).

Émbolos neoplásicos

La frecuencia de neoplasias con EN fue similar en ambos grupos y se encontró dentro del rango informado por otros autores (142, 165, 176, 200).

La influencia de los émbolos de células carcinomatosas en vasos tumorales en el desarrollo de metástasis en el LN es controversial, tanto en la especie humana como en la canina. Actualmente, se lo considera un marcador de categoría II, cuyo valor necesita ser demostrado con un mayor número de pacientes, tiempo de seguimiento más prolongado o más datos de significación estadística (173). En tanto que algunos autores (44, 45, 155), luego de análisis propios o revisión de la bibliografía referida a humanos y caninos, ponen en duda

su utilidad, otros obtuvieron resultados que contribuyen a considerarlo un factor con valor pronóstico (165, 175, 199, 200). En coincidencia con estos últimos autores, en este estudio, las diferencias encontradas entre neoplasias con o sin émbolos en el hallazgo de metástasis en el LN fueron de muy alta significación, tanto mediante el análisis univariado ($p=0,00000008$) como multivariado ($p=0,007$) de los resultados. El *odds ratio* fue de 9 (las probabilidades de hallar un LN+ a partir de una neoplasia con émbolos frente a una sin émbolos son de 9:1). Con respecto a su influencia en la SV de las pacientes, en muestras de cuatro de las seis pacientes que murieron en menos de seis meses se encontró invasión neoplásica en los vasos. Mediante la prueba del logaritmo del rango aplicada a la curva de supervivencia de Kaplan-Meier, las diferencias halladas fueron significativas ($p= 0,0175$). Se pusieron de manifiesto amplias desigualdades en la probabilidad de supervivencia, por ejemplo, a 1 y 18 meses (0,66 y 0,53 para individuos con EN, y de 0,99 y 0,85 para aquellos sin EN). Estos resultados son congruentes con los informados por Itoh (142), si bien en su trabajo las probabilidades de supervivencia a 18 meses fueron menores tanto para las portadoras de neoplasias sin émbolos (0,85 en este trabajo y 0,7 en el trabajo de Itoh) como con EN (0,53 vs 0,4).

Estado del LN

De acuerdo a lo indicado por Sorenmo en referencia a la proporción relativamente baja de casos de LN remitidos para estudio histopatológico, la muestra estudiada constituyó solo un 8,71 % de los carcinomas diagnosticados entre 1980-2003. Al dividir el periodo estudiado en dos, son notorios tanto la baja proporción de casos remitidos con sus LN satélites durante 1980-1991 (4,56 %) como el incremento de este porcentaje en la década siguiente. Podría especularse con que el aumento en la frecuencia pudo obedecer a, por lo menos, dos motivos: la creciente toma de conciencia de los cirujanos referida a la importancia de realizar el diagnóstico histopatológico de los LNs para la estadificación de las pacientes, y la cada vez más frecuente realización de mastectomías en bloque y excéresis de cadenas mamarias (aun

en ausencia de linfadenopatía) en lugar de nodulectomías u otros procedimientos conservadores (230).

Como se mencionó con anterioridad, el examen físico es el método habitual en medicina veterinaria para determinar el estado del LN en forma prequirúrgica. En lo que concierne a la sensibilidad y especificidad del examen, este examen resultó de baja sensibilidad en el grupo en que se estudió (grupo II), ya que 9 de 15 casos resultaron falsos negativos. La proporción de falsos negativos es más alta aun que la hallada mediante el examen clínico en mujeres (158), si bien es necesario tener presente que en humanos el examen clínico no solo incluye la inspección y palpación sino también el diagnóstico por imágenes. En 4 de 10 casos en que se determinó linfadenopatía, no se hallaron metástasis al examinar la pieza extirpada, situación que no debe interpretarse como baja especificidad ya que pudo deberse a otras lesiones del LN que le causaran aumento de tamaño.

La proporción de neoplasias histológicamente malignas que desarrollaron metástasis en el momento del diagnóstico es muy variable según la fuente, de entre 1:2 a 1:10 (155). Dentro de este amplio rango se encuentran los valores obtenidos en este trabajo, en que el 36 % de los carcinomas presentaban metástasis en el LN en el momento del diagnóstico inicial. El porcentaje se elevó a 54 % luego de la revisión HP e IHQ, superando levemente de esta manera los valores de referencia. Cabe recordar que los carcinomas no invasivos (*in situ*) fueron excluidos de este estudio, en tanto que formaban parte del total en los trabajos consultados.

Antes de los 12 meses se diagnosticaron metástasis en 6 casos (en un total de 26), en contraposición con lo enunciado por Sorenmo (138) quien informó que la mayor parte de las metástasis son diagnosticadas menos de un año luego del diagnóstico del tumor primario.

En concordancia con el alto valor pronóstico que se le atribuye al estado del LN en humanos y caninos (136, 158, 162), del análisis de los datos surge que las diferencias entre casos LN (+) y LN (-) con respecto a la supervivencia no se pueden atribuir al azar (tanto mediante χ^2 como *logrank test*). Estos resultados se enmarcan en la noción de que las

metástasis en los LNs están formadas por la progenie (expandida) de las células que sobrevivieron a la presión de selección a la que fueron sometidas en su trayecto desde el tumor primario. Estas neoformaciones constituyen, por lo tanto, una fuente de células capaces de metastatizar hacia los pulmones, hígado, riñones, entre otros órganos distantes. La insuficiencia de estos órganos (cuyo parénquima ha sido comprimido y/o reemplazado en distinto grado por las metástasis) causa la mayor parte de las muertes por cáncer (46).

La detección de micrometástasis mediante anticuerpos específicos puede contribuir a lograr una mejor estadificación clínica de los pacientes (63, 171). Entre el 9 % y el 20 % de los LNs considerados negativos presentó micrometástasis cuando se realizó su inmunomarcación con pancitoqueratinas en la mayor parte de los trabajos referidos (62, 178, 182). El resultado obtenido en esta muestra se ajusta a tales valores. El hallazgo de micrometástasis ocultas mediante IHQ es posible debido a que las células conservan (o pierden y recuperan) la expresión de citoqueratinas en sus filamentos intermedios durante la “cascada metastásica” (29, 61, 62, 63). Si se interpreta la detección de inmunomarcación positiva bajo la suposición de que la expresión de citoqueratinas se ha conservado durante todo el proceso (supervivencia en la sangre, migración, invasión, entre otras actividades), no es posible establecer si las células marcadas se encuentran en tránsito o han desarrollado una metástasis. Si, por el contrario, la hipótesis que subyace a la interpretación es que las células volvieron a expresar genes codificantes para citoqueratinas luego de la reversión del fenotipo (TEM y TME), el hallazgo de marcación con el anticuerpo podría suponer que existieron ciertas señales en el órgano blanco favorecedoras del establecimiento del grupo celular en cuestión, que efectivamente se ha establecido allí (29). El hecho de considerar a las MMO como LN (+), e incluso cambiar la estadificación clínica de una paciente luego de este hallazgo implica, al menos parcialmente, la toma de posición por la segunda de las posturas planteadas, ya que la sola marca con el anticuerpo se consideró positiva, de manera independiente del tamaño o localización del grupo de células marcadas.

En algunos artículos se asimiló el pronóstico de pacientes con MMO con el de aquellas con LN (-), soslayando la importancia de la presencia de estas células o grupos de células en los LNs; en otros, posteriores, se comunicaron tiempos de supervivencia similares entre aquellas con micro y macrometástasis, en ambos casos mucho menores que las pacientes LN (-) (158). En lo que atañe al valor pronóstico de las MMO, solo en una paciente del grupo II se pusieron en evidencia MMO mediante IHQ, por lo que es imposible interpretar la repercusión eventual del hallazgo en el tiempo de supervivencia (que fue alto para la paciente mencionada).

Angiogénesis

Ya sea que se aceptase la ocurrencia de una fase avascular y otra vascular posterior a la transformación tumoral (66) o el inicio del fenómeno angiogénico en neoformaciones pequeñas, aun displásicas (43, 73), puede especularse que las neoformaciones analizadas ya habían desarrollado abastecimiento sanguíneo mayor que el del tejido de origen en el momento del diagnóstico (debido al tamaño de 33/34 de las masas). Por la misma razón, es factible que hubiesen experimentado hipoxia prolongada, condición para la expresión del receptor *VEGFR-2* en estudio (69).

En virtud del conocimiento acerca de las etapas de formación de vasos, las imágenes que se observaron (grupos de células y cordones celulares positivos para *vWF*, y otras estructuras tubulares más diferenciadas) pueden interpretarse como compatibles con procesos activos y actuales de angiogénesis (21).

En concordancia con otros trabajos, se puso de manifiesto la presencia del *VEGFR-2* tanto en células endoteliales como en células carcinomatosas, lo que sugiere la existencia de comunicación auto y paracrina entre las células mencionadas durante los procesos mediados por *VEGFR-2* (87, 100, 101, 225).

Se considera que la vía de señalización iniciada por el *VEGF* y sus receptores es protagónica durante la angiogénesis. Sin embargo, los resultados referidos a la asociación

entre la expresión del *VEGF* y la DMV en tejidos mamarios en caninos son contradictorios (86, 87). Se informó correlación entre la expresión del *VEGF* y la de su receptor *VEGFR2* (100). Según los resultados obtenidos en este trabajo la expresión del *VEGFR-2* y la de DMV se encuentran relacionadas. No se hallaron datos publicados con los que contrastar esta observación.

El *VEGF* aumenta la proliferación y disminuye la apoptosis de las células tumorales (100). Esto debería redundar en crecimiento del volumen de la masa. Sin embargo, no se encontraron diferencias de significación estadística en el tamaño de neoplasias con distinta magnitud de vascularización. El hallazgo de numerosos vasos y expresión del *VEGFR-2* en pequeñas neoplasias podría explicarse por la activación de esta vía por motivos diferentes de la hipoxia (activación de oncogenes, entre otros) (20, 112, 113). Una premisa a considerar para interpretar la baja DMV y expresión del *VEGFR-2* en neoplasias voluminosas es que el tamaño de una neoplasia no obedece solamente al volumen total de las células tumorales, sino que también es consecuencia de la fibroplasia, el desarrollo de quistes y la formación de edema intersticial, entre otros. A este respecto, no se halló correlación entre el IP y el tamaño del tumor.

La relación entre diversos parámetros de angiogénesis y de proliferación es motivo de controversia. En tanto algunos autores (100, 101, 213) encontraron asociación entre la expresión de *GFs*, sus receptores o la DMV y el IP, otros no llegaron a resultados similares (67). En este estudio, mediante el cálculo del coeficiente de correlación, se encontró relación entre el IP y la expresión del *VEGFR-2*, pero no entre el IP y la DMV. El primer hallazgo se explica debido a la acción mitogénica del *VEGF*, si se asume que una mayor expresión del receptor corresponde a una mayor secreción el *GF*. La falta de relación entre la cantidad de vasos por área y la proliferación de las células tumorales podría deberse a que más cantidad de vasos no necesariamente implica mayor o mejor perfusión de los tejidos (además, las células carcinomatosas son más resistentes a la hipoxia que las normales) y los factores

tróficos necesarios para proseguir el ciclo celular llegan a las células blanco por comunicación auto o paracrina.

Según análisis realizados en neoplasias de humanos (216, 217), la mayor DMV está relacionada con el hallazgo de émbolos tumorales. En las muestras analizadas en este trabajo tanto la expresión del *VEGFR-2* como la DMV fueron proporcionales al número de casos con émbolos, en contraposición a lo informado previamente para los caninos por Millanta y colaboradores (87). Las diferencias pueden atribuirse a la n de las muestras estudiadas: dichos autores estudiaron 29 tumores (a diferencia de los 136 en la presente tesis) y la probabilidad que las diferencias de hallazgo de ENs entre tumores de baja o alta DMV se debieran al azar fueron de 0,08. Si la proporción de neoplasias con o sin ENs que comunicó Millanta se mantuviese luego de analizar, por lo menos, 45 casos, las diferencias entre los grupos alcanzarían significación estadística.

Es posible especular con una relación causal directa entre uno y otro fenómeno (presencia de ENs y angiogénesis), no solo porque el aumento en el número de vasos podría significar un lecho vascular más amplio para ser invadido, sino, además, porque debido a sus características histológicas (lámina basal fragmentada o ausente, células endoteliales con fenestraciones, espacios intercelulares, ausencia de pericitos), los vasos neoformados son más permeables que los preformados y la intravasación de células tumorales es ayudada por estas características estructurales (21, 94, 96, 107). Sin embargo, el hecho de clasificar un caso particular como de DMV baja o alta no permitiría realizar ninguna especulación con respecto a una posible embolización no detectada en los cortes en estudio, por lo tanto no tendría mayor utilidad que la realización de mayor número de cortes.

La magnitud de la vascularización tumoral, expresada en cantidad de vasos por superficie, se ha relacionado, en numerosos estudios, con factores de reconocido valor pronóstico en medicina humana, como el hallazgo de metástasis en el LN e incluso el tiempo de supervivencia global (43, 67, 70, 189). Una excepción es el trabajo de Vincent Salomón

(2001), quien no observó relación entre el progreso de la enfermedad y la DMV en carcinomas invasivos mamarios de pequeño tamaño -menores a 3 cm- (217).

Con respecto a la vía *VEGF/VEGFRs*, el receptor *VEGFR-2*, cuya expresión aquí se analiza, es el que media la mayor parte de los efectos río debajo del *GF* en proliferación, invasión, migración y supervivencia de células endoteliales y carcinomatosas, actividades que propenden al desarrollo de metástasis (115). Según Nakopoulou, no se ha establecido relación entre la expresión del *VEGFR-2* y el hallazgo de metástasis o el tiempo de supervivencia (101). En este trabajo, las mayores DOI del *VEGFR-2*, así como la DMV, se asociaron fuertemente con mayores probabilidades de desarrollo de metástasis en el LN y, por lo tanto, peor pronóstico (valor de $p < 0,0009$).

En relación con la supervivencia de las perras en función de las variables DOI y DMV, no se encontraron diferencias significativas. La DOI de *VEGFR-2*, que había sido seleccionada en el análisis multivariado por pasos como de valor pronóstico para estado del LN, presentó menor influencia del azar ($p=0,15$); solo si los valores hallados se mantuviesen en la misma proporción en una muestra de, por lo menos, 208 perras (ocho veces el número de casos con seguimiento concluido en este estudio), el resultado alcanzaría significación estadística ($p=0,048$). La mayor asociación de la expresión del *VEGFR-2* con la supervivencia de las perras (con respecto a la DMV) podría explicarse ya que este receptor media efectos muy variados del *VEGF*, que no se restringen a la formación de nuevos vasos sino que influyen, por ejemplo, en la proliferación de las células tumorales, su supervivencia en entornos hipóxicos y su capacidad invasiva (20, 72, 104, 112).

Tiempo de evolución

Lo más llamativo con respecto a los datos acerca de la evolución previa de la neoplasia, es la ausencia de datos en 13/34 casos. En 4 de esos casos es muy probable que las neoplasias no fuesen observadas ya que se trataba de tumores de 1 cm o menos. El resto había

desarrollado neoplasias de hasta 6 X 3 cm, por lo que se supone que, probablemente, la evolución se conocía, al menos en términos de semanas o meses, pero no se informó durante la anamnesis.

Localización

La mayor cantidad de neoplasias en las mamas abdominales e inguinales no solo es reflejo de la mayor estimulación y actividad cíclica de estas mamas (140), sino también de una particularidad del diseño del experimento. En este estudio solo se incluyeron neoplasias de pacientes a los que les hubieran extirpado (y remitido para su diagnóstico) los LN satélites. Debido a que el LN axilar solo se extirpa en casos de linfadenomegalia, las neoplasias originadas en mamas torácicas se encuentran “subrepresentadas” en este trabajo. Con respecto a su incidencia en la supervivencia, en acuerdo con lo expresado por Sorenmo (138), las diferencias entre los dos grupos de localizaciones se atribuyeron al azar.

Índice de proliferación

La descripción de los datos de IP en este trabajo arrojó una campana de distribución más baja que las obtenidas en otros trabajos, debido a un mayor desvío de los resultados. Se encontró un límite superior del rango (IP=72) conforme al informado en otros trabajos de proliferación en carcinomas mamarios de caninos (146), pero el límite inferior del rango fue notoriamente menor a los informados (IP=21,2). La mayor parte de estos valores bajos atípicos, que coinciden con los hallados en neoplasias benignas e hiperplasias por otros autores (164, 201), correspondieron a carcinomas complejos o simples tubulares, sin ENs ni metástasis en los LNs.

No se encontró asociación entre la IP y la edad de las pacientes, en contraposición con lo hallado por Peña (164), o el tamaño de sus tumores, en concordancia con otros autores (164, 201).

El comportamiento proliferativo fue notoriamente disímil entre las neoplasias que lograron invadir los vasos formando émbolos y aquellas que no, en acuerdo con los resultados de Kato (187) y Peña (164). Esta diferencia también se puso de manifiesto entre neoplasias metastásicas y no metastásicas, en oposición a lo informado en otros trabajos (164, 201).

La proliferación también fue mayor en poblaciones menos diferenciadas (de mayor GH) al igual que lo que ocurrió con respecto al fenómeno angiogénico y en coincidencia con otros autores (164, 187).

Al igual que en el trabajo de Peña (164), en seguimientos de 18 meses, la supervivencia no fue diferente entre pacientes con bajos o altos IP. Este resultado puede deberse a que la medición del IP solo refleja uno de los aspectos de la cinética de las poblaciones tumorales, ya que no se analizó el índice apoptótico o la magnitud de otros tipos de muerte celular. Esta circunstancia también explicaría la falta de relación hallada entre el IP y el tamaño tumoral. Sin embargo, las comparaciones del IP con otras variables como el GH, la presencia de ENs o el estado del LN (llevada a cabo en una muestra n : 136) permitieron establecer relación entre ellos. Debido a que la presencia de ENs y el estado del LN son fuertes predictores de supervivencia, es probable que la n : 26 (seguimientos concluidos) haya sido insuficiente para poner de manifiesto la relación entre la actividad proliferativa y la supervivencia de las pacientes.

Supervivencia

El porcentaje de perras vivas 18 meses luego del diagnóstico (74 %) se encuentra dentro del rango del porcentaje informado por otros autores (138, 142, 164). No es posible comparar el tiempo de supervivencia de las perras con el de las mujeres debido a que, por lo general, en medicina humana se indican regularmente tratamientos médicos además del quirúrgico.

CONCLUSIONES

La frecuencia de neoplasias mamarias caninas diagnosticadas en nuestro ámbito es mayor que la informada en publicaciones extranjeras. Asimismo, en el presente estudio, se identificó un mayor número de neoplasias menos diferenciadas y de comportamiento maligno.

Con respecto a los fenómenos celulares y tisulares analizados, se concluye que:

- ✓ teniendo en cuenta su comportamiento proliferativo, angiogénico e invasivo los diferentes tipos histológicos pueden clasificarse en dos grupos: uno constituido por carcinomas complejos, simples tubulares y de células escamosas y el otro por carcinomas simples papilares, sólidos y anaplásicos y carcinosarcomas,
- ✓ a menor diferenciación histológica corresponde mayor actividad angiogénica, proliferativa e invasión vascular,
- ✓ en neoplasias con mayor expresión del *VEGFR-2*, la densidad microvascular y la proliferación son mayores, y la proliferación es independiente de la densidad de vasos,
- ✓ la mayor densidad de microvasos favorece la invasión vascular,
- ✓ el tamaño tumoral no refleja, necesariamente, la magnitud de la proliferación celular,
- ✓ la probabilidad de supervivencia a dieciocho meses para las portadoras de carcinomas mamarios es alta y se ve fuertemente influenciada por las metástasis en el linfonódulo y la presencia de émbolos,
- ✓ la probabilidad de supervivencia no se relaciona con la expresión del *VEGFR-2* o con la densidad microvascular de manera independiente del estado del linfonódulo y la invasión a los vasos,
- ✓ en los casos con LN (-), el examen de nuevos cortes y su estudio inmunohistoquímico permiten mejorar, de manera notoria, la estadificación de las pacientes,
- ✓ ante la imposibilidad de estudiar los linfonódulos, la capacidad metastásica de una neoplasia puede predecirse mediante el hallazgo de émbolos neoplásicos, alto grado histológico o tamaño mayor a 3 cm,
- ✓ en la misma circunstancia, si es posible realizar análisis inmunohistoquímico de las muestras, valores altos de IP, densidad óptica de marcación del *VEGFR-2* y la densidad de microvasos sugieren altas probabilidades de neoplasia metastásica,
- ✓ el tipo histológico tiene un valor menor como indicador para la predicción de metástasis que el IP, la densidad óptica de marcación del *VEGFR-2* y la densidad de microvasos y no

se relaciona con la supervivencia de manera independiente del estado de los linfonódulos. El carcinoma simple anaplásico y el carcinosarcoma constituyen el grupo de mayor riesgo metastásico, seguidos por los carcinomas simples papilar y sólido (sin diferencias entre ellos). Los carcinomas simples tubular y complejo son los de mejor pronóstico, al igual que el carcinoma de células escamosas mamario cuando se hubiera extirpado con amplios márgenes de seguridad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Virchow R. "Patología celular". 4ta ed. Madrid: Moya y Plaza; 1878. p. 75-88, 435-444, 476.
2. Soto AM, Sonnenschein C. Emergentism as a default: cancer as a problem of tissue organization. J Biosci 2005; 30 (1): 103-118.

3. Sonnenschein C, Soto AM. Carcinogenesis and metastasis now in the third dimension- What's in it for pathologist? *Am J Pathol* 2006; 168: 363-366.
4. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins Pathologic Basis of Disease. 6^o ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1999. p. 89-112, 260-328.
5. Cullen JM, Page R, Misdorp W. An overview of cancer pathogenesis, diagnosis and management. En: Meuten DJ. Tumors in Domestic Animals. 4^o ed. Ames: Iowa State University Press; 2002. p. 3-36.
6. Hendrix MJC, Seftor EA, Seftor REB, Kasemeier-Kulesa J, Kulesa PM, Postovit LM. Reprograming metastatic tumor cells with embryonic microenviroments. *Nature* 2007; 7: 246-255.
7. Mintz B, Illmensee K. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 3585-3589.
8. Bai M, Agnatis NJ, Kamina S, Demou A, Zagorianakou P, Katsaraki A *et al.* *In vivo* cell kinetics in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res* 2001; 3 (4): 276-283.
9. Liu S, Dontu G, Wicha MS. Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. *Breast Cancer Res* 2005; 7 (3): 86-95.
10. Molyneux G, Regan J, Smalley MJ. Mammary stem cells and breast cancer. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 3248-3260.

11. Claus EB, Schildkraut JM, Thompson WD, Risch NJ. The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. *Cancer* 1996; 77 (11): 2318-2324.
12. García-Closas M, Hall P, Nevanlinna H, Pooley K, Morrison J, Douglas A. Heterogeneity of breast cancer associations with five susceptibility *loci* by clinical and pathological characteristics. *PLOS Genetics* 2008, 4: e1000054.
13. Guiot C, Degiorgis PG, Delsanto PP, Gabriele P, Deisboeck TS. Does tumor growth follow a “universal law”? *J Theor Biol* 2003; 225: 147-151.
14. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Introducción a la biología celular*. 2º ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2006. p. 612-614, 628-632, 726-729.
15. Spemann H, Mangold H. Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. En: Willier BH, Oppenheimer JM, (eds). *Foundations of Experimental Embriology*. Englewood Cliffs, Prentice Hall, Inc; 1964. p. 146-184. Traducción del original: Spemann H, Mangold H. Über unduktion von embryonalanlagen durch implantation artfremder organisatoren. *Archiv für mikroskopische anatomie und entwicklungsmechanik* 1924; 100: 599-638.
16. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
17. Cross M, Dexter TM. Growth factors in development, transformation and tumorigenesis. *Cell* 1991; 64: 271-280.

18. Jones SM, Kazlauskas A. Growth factor-dependent signaling and cell cycle progression. *FEBS Lett* 2001; 490: 110-116.
19. Carmeliet P, Jain R. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-257.
20. Parikh AA, Ellis LM. The vascular endothelial growth factor family and its receptors. *Hematol Oncol Clin N Am* 2004; 18: 951-971.
21. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6 (3): 389-395.
22. Vakkala M, Lähteenmäki K, Raunio H, Pääkkö P, Soini Y. Apoptosis during breast carcinoma progression. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 319- 324.
23. White E. Entosis: it's a cell-eat-cell world. *Cell* 2007; 131: 840-842.
24. Liotta LA, Kohn E. Cancer and the homeless cell. *Nature* 2004; 430: 973-974.
25. Bal de Kier Joffé E, Puricelli L, Alonso DF. *Biología tumoral. Claves celulares y moleculares del cáncer*. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Eudeba; 2008. p. 46-64, 66-84, 143-152.
26. De Vico G, Maiolino P, Cataldi M, Mazzullo G, Restucci B. Nuclear morphometry in relation to lymph node status in canine mammary carcinomas. *Vet Res Commun* 2007; 31: 1005-1011.
27. Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nature* 2001; 1: 46-54.

28. Mareel M, Leroy A. Clinical, cellular and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev* 2003; 83: 337-376.
29. Cowin P, Welch DR. Breast cancer progression: controversies and consensus in the molecular mechanisms of metastasis and EMT. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2007; 12 (2-3): 99-102.
30. Ásgeirsson KS, Jónassonb JG, Tryggvadóttir L, Ólafsdóttirb K, Sigurgeirsdóttirb JR, Ingvarssonb S et al. Altered expression of E-cadherin in breast cancer: patterns, mechanisms and clinical significance. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1098-1106.
31. Hartweell KA, Muir B, Reinhardt F, Carpenter AE, Sgroi DC, Weinberg RA. The Spemann organizer gene, Goosecoid, promotes tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103 (50): 18969-18974.
32. John A, Tuszynski G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol Res* 2001; 7 (1): 14-22.
33. Murphy G, Gavrilovic J. Proteolysis and cell migration: creating a path? *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 614-621.
34. Boire A, Covic L, Agarwal A, Jacques S, Sherifi S, Kuliopulos A. PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell* 2005; 120: 303-313.

35. Brown LF, Guidi AJ, Schnitt SJ, Van De Water L, Iruela-Arispe ML, Yeo TK *et al.* Vascular stroma formation in carcinoma *in situ*, invasive carcinoma, an metastatic carcinoma of the breast. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1041-1056.
36. Fidler IJ. The organ microenviroment and cancer metastasis. *Differentiation* 2002; 70: 498-505.
37. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 2007; 449 (7163):682-688.
38. Boggs RM, Wright ZM, Stickney MJ, Porter WW, Murphy KE. MicroRNA expression in canine mammary cancer. *Mamm Genome* 2008; 19: 561-569.
39. Al Rawi MAA, Mansel RE, Jiang WG. Lymphangiogenesis and its role in cancer. *Histol Histopathol* 2005; 20: 283-298.
40. Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn L. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97 (26): 14608-14613.
41. Folkman J. Can mosaic tumor vessels facilitate molecular diagnosis of cancer? *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98 (2): 398-400.
42. Achen MG, McColl BK, Stacker SA. Focus on lymphangiogenesis in tumor metastasis. *Cancer Cell* 2005; 7: 121-127.

43. Schneider BP, Miller KD. Angiogenesis of breast cancer. *J of Clin Oncol* 2005; 23 (8): 1782-1790.
44. Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P *et al.* Induction of tumor lymphangiogenesis by *VEGF-C* promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 2001; 7(2): 192-198.
45. Detmar M. Induction of tumor lymphangiogenesis by *VEGF-C* promotes breast cancer metastases. *Nat Med* 2001; 7 (2): 192-198.
46. Sleeman JP. The lymph node as a bridgehead in the metastatic dissemination of tumors. *Recent Results Cancer Res* 2000; 157:55-81.
47. van Trappen PO, Pepper MS. Lymphangiogenesis and lymph node microdissemination. *Gynecol Oncol* 2001; 82:1-3.
48. Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumor metastasis: myth or reality? *Clin Cancer Res* 2001; 7 (3): 462-468.
49. Pepper MS, Tille JC, Nisato R, Skobe M. Lymphangiogenesis and tumor metastasis. *Cell Tissue Res* 2003; 18: 167-177.
50. Dua RS, Gui GP, Isake CM. Endothelial adhesion molecules in breast cancer invasion into the vascular and lymphatic systems. *Eur J Surg Oncol* 2005; 31 (8): 824-832.
51. Ji RC. Characteristics of lymphatic endothelial cells in physiological and pathological conditions. *Histol Histopathol* 2005; 20: 155-175.

52. van der Auwera I, Cao Y, Tille JC, Pepper M, Jackson DG, Fox SB *et al.* First international consensus of the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. *Br J Cancer* 2006; 95: 1611-1625.
53. Liotta LA. An attractive force in metastasis. *Nature* 2001; 410: 24-25.
54. Fidler IJ, Poste G. The "seed and soil" hypothesis revisited. *Lancet Oncol* 2008, 9: 808.
55. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; 410: 50-56.
56. Fantozzi A, Christofori G. Mouse models of breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res* 2006; 8: 212-222.
57. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, *et al.* VEGFR-1 positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the premetastatic niche. *Nature* 2005; 438: 820-827.
58. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M *et al.* Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 79 (2): 315-328.
59. Camphausen K, Moses MA, Beecken WD, Khan MK, Folkman J, O'Reilly MS. Radiation therapy to a primary tumor accelerates metastatic growth in mice. *Cancer Res* 2001; 61: 2207–2211.

60. Pirie Shepard SR, Coffman KT, Resnick D, Chan R, Kisker O, Folkman J *et al.* The role of angiostatin in the spontaneous bone and prostate cancer of pet dogs. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 292: 886-891.
61. Natarajan S, Xu F, Gilchrist K, Weber SM. Cytokeratin is a superior marker for detection of micrometastatic biliary tract carcinoma. *J Surg Res* 2005;125 (1): 9-15.
62. Matos AJ, Faustino AM, Lopes C, Rutteman GR, Gärtner F. Detection of lymph node micrometastases in malignant mammary tumours in dogs by cytokeratin immunostaining. *Vet Rec* 2006; 158 (18): 626-630.
63. Linder S. Cytokeratin markers come of age. *Tumor Biol* 2007; 28: 189-195.
64. Stein WD, Bates SE, Fojo T. Intractable cancers: the many faces of multidrug resistance and the many targets it presents for therapeutic attack. *Curr Drug Targets* 2004; 5 (4): 333-346.
65. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 1971; 133 (2): 275-288.
66. Folkman J. Incipient angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92 (2): 94-95.
67. Sharma S, Sharma MC, Sarkar C. Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprognostic perspective and significance of neoangiogenesis. *Histopathol* 2005; 46: 481-489.
68. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-Correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324 (1): 1-8.

69. Marti, H. Angiogenesis – a self-adapting principle in hypoxia. *EXS* 2005; 94: 163-180.
70. Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995; 333 (26): 1757-1763.
71. Yancopoulos. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407: 242- 248.
72. Auguste P, Lemiere S, Larrieu-Lahargue F, Bikfalvi A. Molecular mechanisms of tumor vascularization. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 54: 53-61.
73. Menakuru SR, Brown NJ, Staton CA, Reed MWR. Angiogenesis in pre-malignant conditions. *British Journal of Cancer* 2008; 99: 1961- 1966.
74. Folberg R, Hendrix MJC, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 2000; 156: 361-381.
75. Eichmann A, Corbel C, Nataf V, Vaigot P, Bréant C, Le Douarin NM. Ligand-dependent development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5141-5146.
76. Moore MA. Putting the neo into neoangiogenesis. *J Clin Invest* 2002; 109 (3): 313-315.
77. Ribatti D. The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2004; 8 (3): 294-300.

78. Chevalier S, Degoy I, Lacoste J, Hamel L, Guy L, Bégin LR *et al.* Vascular endothelial growth factor and signaling in the prostate: more than angiogenesis. *Mol and Cel End* 2002; 189: 169-179.
79. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005; 23 (5): 1011-1027.
80. Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and *VEGF*. *Oncogene* 1999; 18 (38): 5356-5362.
81. Zhang S, Zhang D, Sun B. Vasculogenic mimicry: current status and future prospects. *Cancer Lett* 2007; 254: 157-164.
82. Shirakawa K, Kobayashi H, Sobajima J, Hashimoto D, Shimizu A, Wakasugi H. Vasculogenic mimicry and its hemodynamics of an inflammatory breast cancer xenograft model. *Breast Cancer Res* 2003; 5 (3): 136-139.
83. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285 (21): 1182-1186.
84. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res* 2000; 60: 203-212.
85. Tsuzuki Y, Fukumura D, Oosthuyse B, Koike C, Carmeliet P, Jain RK. Vascular endothelial growth factor (*VEGF*) modulation by targeting hypoxia-inducible factor-1 α

hypoxia response element *VEGF* cascade differentially regulates vascular response and growth rate in tumors. *Cancer Res* 2000; 60: 6248-6252.

86. Restucci B, Papparella S, Maiolino P, De Vico G. Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. *Vet Pathol* 2002; 39 (4): 488-493.

87. Millanta F, Silvestri G, Vaselli C, Citi S, Pisani G, Lorenzi D *et al.* The role of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk-1/KDR in promoting tumour angiogenesis in feline and canine mammary carcinomas: A preliminary study of autocrine and paracrine loops. *Res Vet Sci* 2006; 81: 350-357.

88. Martinez A. A new family of angiogenic factors. *Cancer Lett* 2006; 236: 157-163.

89. Liao D, Corle C, Seagroves TN, Johnson RS. Hypoxia-inducible factor-1 α is a key regulator of metastasis in a transgenic model of cancer initiation and progression. *Cancer Res* 2007; 67 (2): 563-572

90. Oosthuysen B, Moons L, Storkebaum E, Beck H, Nuyens D, Brusselmans K *et al.* Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet* 2001; 28 (2): 131-138.

91. Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor (*VEGF*) stimulates neurogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99 (18): 11946-11950.

92. Greenberg DA, Jin K. VEGF and ALS: the luckiest growth factor? *Trends in Mol Med* 2004; 10 (1): 1-3.

93. Yu JL, Rak JW. Host microenvironment in breast cancer development. Inflammatory and immune cells in tumour angiogenesis and arteriogenesis. *Breast Cancer Res* 2003; 5 (3): 83-88.
94. Guinebretière JM. Angiogenesis and breast neoplasms. The pathologist point of view. *Gynécol Obstét Fertil* 2005; 33: 140-146.
95. Zachary I, Glikli G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 568-581.
96. Dvorak H. How tumors make bad blood vessels and stroma. *Am J Pathol* 2003; 162 (6): 1747-1757.
97. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219: 983-985.
98. Prewett M, Huber J, Li Y, Santiago A, O'Connor W, King K *et al.* Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors. *Cancer Res* 1999; 59: 5209-5218.
99. Zeng H, Dvorak HF, Mukhopadhyay D. Vascular permeability factor (VPF)/ vascular endothelial growth factor (*VEGF*) receptor-1 down modulates VPF/*VEGF* receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but not migration, through phosphatidylinositol 3 kinase-dependent pathways. *J of Biol Chem* 2001; 276 (29): 26969-26979.

100. Schoeffner DJ, Matheny SL, Akahane T, Factor V, Berry A, Merlino G *et al.* VEGF contributes to mammary tumor growth in transgenic mice through paracrine and autocrine mechanisms. *Lab Invest* 2005; 85: 608-623.
101. Nakopoulou L, Stefanaki K, Panayotopoulou E, Giannopoulou I, Athanassiadou P, Gakiopoulou-Givalou H *et al.* Expression of the vascular endothelial growth factor receptor-2/FIk-1 in breast carcinomas: correlation with proliferation. *Hum Pathology* 2002; 33 (9): 863-869.
102. Abedy H, Zachary I. Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *J Biol Chem* 1997; 272 (24): 15442-15451.
103. Rawlings NG, Simko E, Bechuk T, Caldwell SJ, Singh B. Localization of integrin $\alpha\beta3$ and vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR/FIk-1) in cutaneous and oral melanomas of dog. *Histol Histopathol* 2003; 18: 819-826.
104. Yang W, de Bono DP. A new role for vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factors: increasing endothelial resistance to oxidative stress. *FEBS Lett* 1997; 403 (2): 139-142.
105. Abid MR, Tsai JC, Spokes KC, Deshpande SS, Irani K, Aird WC. Vascular endothelial growth factor induces manganese-superoxide dismutase expression in endothelial cells by a Rac1-regulated NADPH oxidase-dependent mechanism. *FASEB J* 2001; 15: 2548-2550.
106. Sauter B, Foedinger D, Sterniczky B, Wolff K, Rappersberger K. Immunoelectron microscopic characterization of human dermal lymphatic microvascular endothelial cells:

differential expression of CD31, CD34, and type IV collagen with lymphatic endothelial cells vs blood capillary endothelial cells in normal human skin, lymphangioma, and hemangioma in situ. *J of Histochem Cytochem* 1998; 46 (2): 165-176.

107. Verhoeven D, Van Marck E. Proliferation, basement membrane changes, metastasis and vascularization patterns in human breast cancer. *Path Res Pract* 1993; 189: 851-861.

108. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161 (2): 851-858.

109. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246: 1306-1309.

110. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS *et al*. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the *VEGF* gene. *Nature* 1996; 380: 439-442.

111. Ferrara N. *VEGF*: an update on biological and therapeutic aspects. *Curr Opin Biotechnol* 2000; 11: 617-624.

112. Ribatti D. The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. *Br J Haematol* 2004; 128: 303-309.

113. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of *VEGF* and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-676

114. Fong G, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995; 376: 66-70.
115. Millauer B, Longhi MP, Plate KH, Shawver LK, Risau W, Ullrich A *et al.* Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types *in vivo*. *Cancer Res* 1996; 56: 1615-1620.
116. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi T, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML *et al.* Failure of blood island formation and vasculogenesis in Flk-1 deficient mice. *Nature* 1995; 376: 62-66.
117. Achen MG, Stacker SA. Tumor lymphangiogenesis and metastatic spread-New players begin to emerge. *Int J Canc* 2006; 119: 1755-1760.
118. König H, Liebich L. *Anatomía De Los Animales Domésticos*. 2º ed. Tomo 2. Órganos, sistema circulatorio y sistema nervioso. Madrid: Médica Panamericana; 2005. p. 341.
119. Dellman HD. *Histología Veterinaria*. 2º ed. Acribia; 1996. p. 265-267.
120. Gázquez-Ortiz A, Blanco Rodríguez A. *Tratado de Histología Veterinaria*. Barcelona: Masson; 2004. p. 413-415.
121. Melchor L, Smalley MJ. Highway to heaven: mammary gland development and differentiation. *Breast Cancer Res* 2008; 10: 305-307.
122. Deugnier MA, Teulière J, Faraldo MM, Thiery JP, Glukhova MA. The importance of being a myoepithelial cell. *Breast Cancer Res* 2002; 4 (6): 224-230.

123. Adriance MC, Inman JL, Petersen OW, Bissell MJ. Myoepithelial cells: good fences make good neighbors. *Breast Cancer Res* 2005; 7: 190-197.

124. Sternlicht MD, Kedeshian P, Shao ZM, Safarians S, Barsky SH. The human myoepithelial cell is a natural tumor suppressor. *Clinical Cancer Res* 1997; 3: 1949-1958.

125. Lakhani SR, O'Hare MJ. The mammary myoepithelial cell- Cinderella or ugly sister? *Breast Cancer Res* 2001; 3: 1-4.

126. Nguyen M, Lee MC, Wang JL, Tomlinson, Shao ZM, Alpaugh ML *et al.* The human myoepithelial cell displays a multifaceted anti-angiogenic phenotype. *Oncogene* 2000; 19: 3449-3459.

127. World Health Organization. Health topics. *On line* (acceso 13/01/2009). Disponible en URL: <http://www.who.int/topics/en>

128. World Health Organization. World Cancer Report. *On line* (acceso 13/01/2009). Disponible en URL: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr27/en/>

129. American Cancer Society. Cancer facts and figures. *On line* (acceso 13/01/2009). Disponible en URL: http://www.cancer.org/docroot/STT/content/STT_1x_Cancer_Facts_Figures_2009.asp

130. Proschowsky HF, Rugbjerg H, Ersbøll AK. Mortality of purebreed and mixed-breed dogs in Denmark. *Prev Vet Med* 2003; 58: 63-74.

131. Ogilvie GK, Moore AS. Manejo del paciente canino oncológico. Buenos Aires: Intermédica; 2008. p. 675-676.
132. Arnesen K, Gamlem H, Glattre E, Grøndalen J, Moe L, Nordstoga K. The Norwegian canine cancer register 1990-1998. Report from the project "Cancer in the dog". EJCAP 2001; 11: 159- 169.
133. Dobson JM, Samuel S, Milstein H, Rogers K, Wood JLN. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. J Small Anim Pract 2002; 43: 240-246.
134. Egenvall A, Bonnett BN, Öhagen P, Olson P, Hedhammar A, Von Euler H. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. Prev Vet Med 2005; 69: 109-127.
135. Merlo DF, Rossi L, Pellegrino C, Ceppi M, Cardellino U, Capurro C *et al.* Cancer incidence in pet dogs: findings of the animal tumor registry of Genoa, Italy. J Vet Intern Med 2008; 22: 976-984.
136. Mac Ewen E, Withrow S. Tumors of the mammary gland. En: Withrow S, Mac Ewen E (eds.): Small Animal Clinical Oncology. 2º ed. Philadelphia: WB Saunders; 1996. p. 356-372.
137. Misdorp W. Tumors of the mammary gland. En: Meuten DJ. Tumors in Domestic Animals. 4º ed. Ames: Iowa State University Press; 2002. p. 575-596, 764.
138. Sorenmo K. Canine mammary gland tumors. Vet Clin Small Anim 2003; 33: 573-596.

139. Rutteman GR. Hormones and mammary tumour disease in the female dog: an update. *In Vivo* 1990; 4 (1): 33-40.
140. Hellmén E. The pathogenesis of canine mammary tumors. *Cancer J* 1996; 9 (6): 282-286.
141. Pérez Alenza M, Peña L, del Castillo N, Nieto A. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *J Small An Pract* 2000; 41: 287-291.
142. Itoh T, Uchida K, Ishikawa K, Kushima K, Kushima E, Tamada H *et al*. Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: differences between small-breed dogs and others. *J Vet Med Sci* 2005; 67 (3): 345-347.
143. Seixas F, Pires MA, Lopes CA. Complex carcinomas of the mammary gland in cats: pathological and immunohistochemical features. *Vet J* 2008; 176: 210-215.
144. Munson L, Moresco A. Comparative pathology of mammary gland cancers in domestic and wild animals. *Breast Disease* 2007; 28: 7-21.
145. Owston MA, Ramsay EC, Rotstein DS. Neoplasia in felids at the Knoxville Zoological Gardens, 1979-2003. *J Zoo Wildl Med* 2008; 39 (4): 608-613.
146. Kumaraguruparan R, Prathiba D, Nagini S. Of humans and canines: immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. *Res Vet Sci* 2006; 81: 218-224.

147. Antuofermo E, Miller MA, Pirino S, Xie J, Badve S, Mohammed SI. Spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs- A model of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16 (11): 2247-2256.
148. Knapp DW, Waters DJ. Naturally occurring cancer in pet dogs: important models for developing improved cancer therapy for humans. *Mol Med Today* 1997; 3 (1): 8-11.
149. Laumbacher B, Fellerhoff B, Herzberger B, Wank R. Do dogs harbour risk factors for human breast cancer? *Med Hypotheses* 2006; 67: 21-26.
150. Feinstein RE. Tumores mamarios malignos en perras. Clasificación histopatológica actual (OMS 1974) y estudio estadístico [tesis doctoral]. La Plata (Buenos Aires): Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata; 1979.
151. Moe L. Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. *J Reprod Fertil Suppl* 2001; 57: 439-443.
152. Saba CF, Rogers KS, Newman SJ, Mauldin GE, Vail DM. Mammary gland tumors in male dogs. *J Vet Intern Med* 2007; 21 (5):1056-1059.
153. Støvring M, Moe L, Glattre E. A population-based case-control study of canine mammary tumours and clinical use of medroxyprogesterone acetate. *APMIS* 1997; 105: 590-596.
154. Queiroga FL, Pérez-Alenza MD, Silvan G, Peña L, Lopes CS, Illera JC. Crosstalk between GH/IGF-I axis and steroid hormones (progesterone, 17 β -estradiol) in canine mammary tumours. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008; 110: 76-82.

155. Misdorp W, Else RW, Hellmén E, Lipscomb TP. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. 2º serie. Vol VII. Washington: AFIP; 1999.
156. Patsikas MN, Dessiris A. The lymph drainage of the mammary glands in the bitch: a lymphographic study. Part II: the 3rd mammary gland. *Anat Histol Embryol* 1996; 25 (2):139-143.
157. Mangieri J. Sistema TNM, estadificación del paciente y características del tumor, las linfadenopatías y las metástasis en el canino con cáncer mamario. En: Mangieri J. (ed.): *Oncología Veterinaria*. Buenos Aires: Prensa Veterinaria Argentina; 1994. p. 144-172.
158. Rosen PP, Oberman HA. Atlas of Tumor Pathology. Tumors of the mammary gland. 3º serie. Vol VII. Washington: AFIP; 1993.
- 158 bis. Greene FL, Page DL, Fleming ID (eds.) Fritz A, Balch CM. *AJCC Cancer Staging Handbook*. Parte VII. 6º edición. New York: Springer Verlag; 2002. p. 269.
159. Stratmann N, Failing K, Ritcher A, Wehrend A. Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy. *Vet Surg* 2008; 37 (1): 82-86.
160. Birchard SJ. Definitive treatment for cancer. En: Bonagura JD (ed): *Kirk's Current Veterinary Therapy XII. Small Animal Practice*. Philadelphia: WB Saunders; 1995. p. 462-467.
161. Novosad CS. Principles of treatment for mammary gland tumors. *Clin Tech Small Anim Pract* 2003; 18 (2): 107-109.

162. Yamagami T, Kobayashi T, Takahashi K, Sugiyama M. Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. *J Vet Med Sci* 1996; 58 (11): 1079-1083.
163. Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC, Dessiris A. Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. *J Vet Med A* 2001; 48: 85–96.
164. Peña L, Nieto A, Pérez-Alenza D, Cuesta P, Castaño M. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *J Vet Diagn Invest* 1998; 10: 237-246.
165. Sarli G, Preziosi R, Benazzi C, Castellani G, Marcato PS. Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. *J Vet Diagn Invest* 2002; 14 (1): 25-34.
166. Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC, Dessiris A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *J Comp Path* 2005; 133: 246-252.
167. Hellmen E, Lindgren A. The expression of intermediate filaments in canine mammary glands and their tumors. *Vet Pathol* 1989; 26: 420-428.
168. Hampe JF, Misdorp W. Tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bull WHO* 1974; 50:111–133.
169. Mouton JE (ed.). *Tumors in Domestic Animals*. California: University of California Press; 1990. p. 518-552.

170. Benjamin SA, Lee AC, Saunders WJ. Classification and behaviour of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. *Vet Pathol* 1999; 36: 423-436.
171. Mukaratirwa S. Prognostic and predictive markers in canine tumours: rationale and relevance. A review. *Vet Q* 2005; 27 (2): 52-64.
172. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747-752.
173. Coronato S, Laguens G, Spinelli O, Di Girolamo W. Marcadores tumorales en cáncer de mama. *Medicina* 2002; 62: 73-82.
174. Kato T, Kameoka S, Kimura T, Soga N, Abe Y, Nishikawa T *et al.* Angiogenesis as a predictor of long-term survival for 377 Japanese patients with breast cancer. *Breast Cancer Res and Treat* 2001; 70: 65-74.
175. Westened PJ, Meurs CJC, Damhuis RAM. Tumor size and vascular invasion predict distant metastasis in stage I breast cancer. Grade distinguishes early and late metastasis. *J Clin Pathol* 2005; 58: 196-201.
176. Pérez Alenza M, Peña L, Nieto A, Castaño M. Clinical and pathological prognostic factors in canine mammary tumours. *Ann Ist Super Sanità* 1997; 33 (4): 581-585.
177. Chang S, Chang C, Chang T, Wong M. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). *JAVMA* 2005; 227 (10): 1625-1629.

178. Dowlatshahi K, Fan M, Zinder HC, Aviv FA. Lymph node micrometastases from breast carcinoma. *Cancer* 1997; 80 (7): 1188-1197.
179. Langenbach A, McManus PM, Hendrick MJ, Shofer FS, Sorenmo KU. Sensitivity and specificity of methods of assessing the regional lymph nodes for evidence of metastasis in dogs and cats with solid tumors. *JAVMA* 2001; 218 (9): 1424-1428.
180. Ishida M. Detection of micrometastasis in the sentinel lymph nodes in breast cancer. *J Surgery* 2002; 131: 211-216.
181. Höinghaus R, von Wasielewski R, Hewicker-Trautwein M, Freund M, Mischke R. Immunocytological detection of lymph node metastases in dogs with malignant epithelial tumours. *J Com Pathol* 2007; 137: 1-8.
182. Chagpar A, Middleton LP, Sahin AA, Meric-Bernstam F, Kuerr HM, Feig BW *et al.* Clinical outcome of patients with lymph node-negative breast carcinoma who have sentinel lymph node micrometastases detected by immunohistochemistry. *Cancer* 2005; 103: 1581- 1586.
183. Busch U, Rudolph R. Mammakarzinom der Hündin: Eine neue Routinediagnostik zum Nachweis okkultes Mikrometastasen in den regionären Lymphknoten. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 1995; 108: 43-46.
184. Busch U, Rudolph R. Mammakarzinom der Hündin: Klinische Bedeutung der immunhistochemisch nachgewiesenen Mikrometastasen in den regionären Lymphknoten. *Tierärztl Prax* 1995; 23: 280-286.

185. Cserni G, Bianchi S, Vezzosi V, van Diest P, van Deurzen C, Sejbien I *et al.* Variations in sentinel node isolated tumour cells/micrometastasis and non-sentinel node involvement rates according to different interpretations of the TNM definitions. *Eur J Cancer* 2008; 44(15): 2185-2191.
186. Reed J, Rosman M, Verbanac KM, Mannie A, Cheng Z, Tafra L. Prognostic implications of isolated tumor cells and micrometastases in sentinel nodes of patients with invasive breast cancer: 10 years analysis of patients enrolled in the prospective East Carolina University/Anne Arundel Medical Center Sentinel Node Multicenter Study. *J Am Coll Surg* 2009; 208 (3): 333-340.
187. Kato T, Kameoka S, Kimura T, Nishikawa T, Kobayashi M. The combination of angiogenesis and blood vessel invasion as a prognostic indicator in primary breast cancer. *Br J Cancer* 2003; 88:1900-1908.
188. Elzaheid A, Kuopio T, Pyrhönen S, Collan Y. Lymph node status as a guide to selection of available prognostic markers in breast cancer: the clinical practice of the future? *Diagn Pathol* 2006; 1 (41): 23-30.
189. Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Res* 2004; 64: 2941-2955.
190. Benoy IH, Salgado R, Elst H, Van Dam P, Weyler J, Van Marck E *et al.* Relative microvessel area of the primary tumour, and not lymph node status, predicts the presence of bone marrow micrometastases detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction in patients with clinically non-metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res* 2005; 7(2): 210-219.

191. Rack B, Janni W, Gerber B, Strobl B, Schindlbeck C, Klanner E *et al.* Patients with recurrent breast cancer: does the primary axillary lymph node status predict more aggressive tumor progression? *Breast Cancer Res and Treat* 2003; 82: 83-92.

192. Akiyoshi T, Uchida K, Tateyama S. Expression of bone morphogenetic protein-6 and bone morphogenetic protein receptors in myoepithelial cells of canine mammary gland tumors. *Vet Pathol* 2004; 41: 154-163.

193. Gilbert SF. *Biología del desarrollo*. 7º ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2005. p. 165, 176, 576.

194. Genelhu MC, Cardoso SV, Gobbi H, Cassali GD. A comparative study between mixed-type tumours from human salivary and canine mammary glands. *BMC Cancer* 2007; 7: 218-226.

195. Yang WY, Liu CH, Chang CJ, Lee CC, Chang KJ, Lin CT. Proliferative activity, apoptosis and expression of oestrogen receptor and Bcl-2 oncoprotein in canine mammary gland tumours. *J Comp Path* 2006; 134: 70-79.

196. Elston CW, Ellis LO. 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* 1991; 19: 403-410.

197. Castagnaro M, Casalone C, Bozzetta E, De Maria R, Biolatti B, Caramelli M. Tumour grading and the one-year post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *J Comp Pathol* 1998; 119(3): 263-75.

198. Volpi A, Bacci F, Paradiso A, Saragoni L, Scarpi E, Ricci M *et al.* Prognostic relevance of histological grade and its components in node-negative breast cancer patients. *Mod Pathol* 2004; 17: 1038-1044.
199. Meyer JS, Alvarez C, Milikowski C, Olson N, Russo I, Russo J *et al.* Breast carcinoma malignancy grading by Bloom-Richardson system vs proliferation index: reproducibility of grade and advantages of proliferation index. *Mod Pathol* 2005; 18: 1067-1078.
200. Brunetti B, Sarli G, Preziosi R, Monari I, Benazzi C. E-cadherin and β -catenin reduction influence invasion but not proliferation and survival in canine malignant mammary tumors. *Vet Pathol* 2005; 42: 781-787.
201. Funakoshi Y, Nakayama H, Uetsuka K, Nishimura R, Sasaki N, Doi, K. Cellular proliferative and telomerase activity in canine mammary gland tumors. *Vet Pathol* 2000; 37: 177-183.
202. van Diest PJ, van der Wall E, Baak JPA. Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: a review. *J Clin Pathol* 2004; 57: 675- 681.
203. Baak JPA, van Diest PJ, Voorhorst FJ, van der Wall E, Beex LVAM, Vermorken JB *et al.* The prognostic value of proliferation in lymph-node-negative breast cancer patients is age dependent. *Eur J Cancer* 2007; 43: 527-535.
204. Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart MJ. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? *Ann Oncol* 2005; 16: 1723-1739.

205. Bãnkfalvi À, Öfner D, Schmid KW, Schmitz KJ, Breukelmann D, Krech R *et al.* Standardized *in situ* AgNOR analysis in breast pathology: diagnostic and cell kinetic implications. *Pathol Res Pract* 1999; 195: 219-229.
206. Zacchetti A, van Garderen E, Teske E, Nederbragt H, Dierendonck JH, Rutteman GR. Validation of the use of proliferation markers in canine neoplastic and non-neoplastic tissues: comparison of Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression versus *in vivo* bromodeoxyuridine labelling by immunohistochemistry. *APMIS* 2003; 111: 430-438.
207. Löhr CV, Teifke JP, Failing K, Weiss E. Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors by the standardized AgNOR method with postfixation and immunohistologic detection of Ki-67 and PCNA. *Vet Pathol* 1997; 34: 212-221.
208. Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S. PCNA, the Maestro of the replication fork. *Cell* 2007; 129 (4): 665-679.
209. Maga G, Hübscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci* 2003; 116: 3051-3060.
210. Betchel PE, Hickey RJ, Schnaper L, Sekowski JW, Long BJ, Freund R *et al.* A unique form of proliferating cell nuclear antigen is present in malignant breast cells. *Cancer Res* 1998; 58: 3264-3269.
211. Malkas LH, Herbert BS, Abdel-Aziz W, Dobrolecki LE, Liu Y, Agarwall B *et al.* A cancer-associated PCNA expressed in breast cancer has implications as a potential biomarker. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103 (51): 19472-19477.

212. Paunesku T, Mittal S, Protic, Oryhon J, Korolev SV, Joachimiak A *et al.* Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *Int J Radiat Biol* 2001; 77 (10): 1007-1021.
213. McCarthy NJ, Yang X, Linnoila IR, Merino MJ, Hewitt SM, Parr AL *et al.* Microvessel density, expression of estrogen receptor α , MIB-1, p53, and c-erbB-2 in inflammatory breast cancer. *Cl Cancer Res* 2002; 8: 3857-3862.
214. Restucci B, Maiolino P, Paciello O, Martano M, De Vico G, Papparella S. Evaluation of angiogenesis in canine seminomas by quantitative immunohistochemistry. *J Comp Pathol* 2003; 128: 252-259.
215. Torres LN, Matera JM, Vasconcellos CH, Avanzo JL, Hernández-Blazquez FJ, Dagli MLZ. Expression of connexins 26 and 43 in canine hyperplastic and neoplastic mammary glands. *Vet Pathol* 2005; 42: 633-641.
216. Visscher DW, Lawrence D, Boman S. Angiogenesis in breast carcinoma- Clinicopathological relevance and potential use as a quantifiable surrogate endpoint biomarker. *J Cell Biochem* 1994; 19: 146-152.
217. Vincent Salomon A, Carton M, Zafrani B, Fréneaux P, Nicolas A, Massemin B *et al.* Long term outcome of small size invasive breast carcinomas independent of angiogenesis in a series of 685 cases. *Cancer* 2001; 92: 249-256.
218. Fox SB, Harris AL. Histological quantitation of tumour angiogenesis. *APMIS* 2004; 112 (7-8): 413-430.

219. De Young BR, Swanson PE, Argenyi ZB, Ritter JH, Fitzgibbon JF, Stahl DJ *et al.* CD31 immunoreactivity in mesenchymal neoplasms of the skin and subcutis: report of 145 cases and review of putative immunohistologic markers of endothelial differentiation. *J Cutan Pathol* 1995; 22: 215-222.
220. Preziosi R, Sarli G, Paltrinieri M. Prognostic value of intratumoral vessel density in cutaneous mast cell tumours of the dog. *J Comp Path* 2004; 130: 143-151.
221. Busam K, Berwick M, Blessing K, Fandrey K, Kang S, Karaoli T *et al.* Tumor vascularity is not a prognostic factor for malignant melanoma of the skin. *Am J Pathol* 1995; 147 (4): 1049-1056.
222. Srivastava A, Laidler P, Hughes LE, Woodcock J, Shedden EJ. Neovascularization in human cutaneous melanoma: a quantitative morphological and Doppler ultrasound study. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1986; 22: 1205-1209.
223. Lindmark G, Gerdin B, Sundberg C, Pahlman L, Bergstrom R, Glimelius B. Prognostic significance of the microvascular count in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14: 461-466.
224. Kato Y, Asano K, Mogi T, Kutara K, Teshima K, Edamura K *et al.* Clinical significance of circulating vascular endothelial growth factors in dogs with mammary gland tumors. *J Vet Med Sci* 2007; 69 (1): 77-80.
225. Restucci B, Borzacchiello G, Maiolino P, Martano M, Paciello O, Papparella S. Expression of vascular endothelial growth factor receptor Flk-1 in canine mammary tumours. *J Comp Path* 2004; 130: 99-104.

226. Herbst RS, Onn A, Sandler A. Angiogenesis and lung cancer: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3243-3256.
227. [Pytel D](#), [Sliwinski T](#), [Poplawski T](#), [Ferriola D](#), [Majsterek I](#). Tyrosine kinase blockers: new hope for successful cancer therapy. [Anticancer Agents Med Chem](#) 2009; 9(1): 66-76.
228. Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Puztai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist* 2009; 14 (4): 320-368.
229. Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chilsom V, Meng YG, Krummen L *et al*. Humanization of anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 1997; 57: 4593-4599.
230. Theilen GH, Madewell BR. *Veterinary Cancer Medicine*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1979. p. 198-199.

ANEXO

INMUNOHISTOQUÍMICA

Técnica de la peroxidasa

- 1- Obtener cortes de 3 micras de espesor y acondicionarlos sobre portaobjetos con cargas positivas.
- 2- Mantener en estufa durante las 24 horas previas al procedimiento.
- 3- Desparafinar: 2 pasajes por xilol, de 10 minutos cada uno (observar que el xilol no esté hidratado, con burbujas o turbio).
- 4- Hidratar: 2 pasajes por alcohol 100° de 3 a 5 minutos cada uno.
 2 pasajes por alcohol 96° de 3 minutos cada uno
 1 pasaje por alcohol 80° de 3 minutos
 1 pasaje por alcohol 70° de 3 minutos.
- 5- Lavar con *PBS* (ver “soluciones utilizadas”) durante 10 minutos (los tiempos de lavado pueden extenderse).
- 6- Quitar el exceso de *PBS* e incubar con solución de peróxido de hidrógeno (para inactivar la peroxidasa endógena) entre 4 y 6 minutos¹¹.
- 7- Lavar con *PBS*.
- 8- Realizar la recuperación antigénica si se considera pertinente (ver procedimiento en este mismo apartado).
- 9- Retirar los portaobjetos del *buffer*, dejar escurrir la solución y secar cuidadosamente el exceso de líquido del corte. Evitar la desecación de los cortes. No tocarlos.
- 10- Incubar con solución de leche descremada Molico® (0,5 g en 20 ml de *PBS*) durante 40 minutos.
- 11- Volcar el exceso.

¹¹Nota: conservar las soluciones del *kit* a 4°C.

- 12- Cubrir con el anticuerpo primario (excepto los controles) durante 30 minutos a temperatura ambiente o toda la noche a 4° C. Para cada anticuerpo debe utilizarse una punta (*tip*) diferente en la micropipeta. Asegurar la posición horizontal de los portaobjetos.
- 13- Realizar 3 lavados con *PBS*, cada anticuerpo por separado.
- 14- Secar.
- 15- Incubar con el anticuerpo puente (inmunoglobulinas biotiniladas de cabra anti-conejo y anti-ratón en *PBS*) durante 10 minutos.
- 16- Lavar con *PBS* durante 15 minutos.
- 17- Secar cuidadosamente.
- 18- Incubar con la solución de estreptavidina-peroxidasa durante 10 minutos.
- 19- Lavar con *PBS* durante 15 minutos.
- 20- Revelado: incubar con DAB de 2 minutos, o hasta observar coloración parda en el corte.
- 21- Interrumpir el revelado sumergiendo los cortes en *PBS* o agua corriente. Sumergir luego en agua destilada.
- 22- Realizar la coloración de contraste sumergiendo en hematoxilina de Gill durante aproximadamente 30 segundos (ajustar el tiempo en función de los resultados).
- 23- Cubrir con agua corriente durante 10 minutos para que vire el colorante.
- 24- Lavar con agua destilada.
- 25- Realizar un pasaje rápido por alcohol 96°.
- 26- Realizar un pasaje rápido por alcohol 100°. Escurrir.
- 27- Sumergir en xilol.
- 28- Montar con bálsamo sintético.

Recuperación antigénica mediante el uso del horno de microondas.

- 1- Colocar los cortes en jarras de Koplín de plástico sin tapar, sumergidos en *buffer* de citrato 10 mM, pH 6,0 (ver "soluciones utilizadas"). Colocar siempre el mismo número de jarras cerca del centro del plato giratorio, con un número fijo de preparados (4 ó 5); agregar portaobjetos vacíos si es necesario.
- 2- Irradiar a 750 W durante 4 minutos.
- 3- Reponer el *buffer* de citrato evaporado y repetir la operación con los mismos parámetros.
- 4- Dejar enfriar 20 minutos en el *buffer*.
- 5- Sumergir los preparados en *PBS*.
- 6- Continuar con la técnica de IHQ de elección.

Recuperación antigénica mediante el uso de vaporiera.

- 1- Colocar la cantidad de agua corriente necesaria para evaporar durante 40 minutos en el recipiente inferior.
- 2- Una vez que se produce vapor, colocar los portaobjetos en la bandeja superior en un Koplín horizontal, sumergidos en *buffer* de citrato 10 mM, pH 6,0 y tapar.
- 3- Luego de 40 minutos, dejar enfriar en el *buffer*, sumergir los preparados en *PBS* y continuar con la técnica de IHQ de elección.

Soluciones utilizadas

Solución madre de *buffer* fosfato (*PB Stock*)

Fosfato de sodio dibásico anhidro-----11,4 g
Fosfato de sodio monobásico dihidrato----- --3,3 g
Agua destilada----- 1000 ml

Solución de trabajo de *buffer* fosfato (*PBS*)

Solución 1-----100 ml
Cloruro de sodio-----8,5 g
Agua destilada-----900 ml

Solución 3: *buffer* de citrato pH 6,0 mM

Ácido cítrico monohidrato ($H_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$)—2,1 g
Agua destilada-----1000 ml
Ajustar el pH a 6,0 con hidróxido de sodio 2 N.

Tabla 5. Características histopatológicas e inmunohistoquímicas de las neoplasias (ambos grupos)

CASO	NI	TH	GH	EN	LN	IP	Expresión de VEGFR-2					D M V	
							ÁREA	D	DOI	DOI/mm2	DOI/AIM	DMV/campo	DMV/mm2
1	6696	Cs papilar	II	NO	-	31,8	4358,2	152,5	11939	152471793	65,8	1,89	25,3
2	6723	CC	II	NO	+ (IHQ)	49	160,1	149,7	23940	149678877	2,5	4,7	62,7
3	6802	CC	II	NO	-	32	1050,6	154,2	162491	154210650	15,6	8,9	118,7
4	7057	Cs papilar	III	SÍ	-	67,5	470,2	153,5	72136	153511235	7,0	6,5	86,7
5	7210	Cs papilar	II	NO	-	62,2	38,2	155,3	5939	155333108	0,6	8	106,7
6	7292	Cs papilar	III	SÍ	+	65	3020,9	155,2	468780	155155875	44,8	11	146,7
7	7316	Cs papilar	III	SÍ	+ (RH)	59	927,2	155,2	143896	155165538	13,7	4	53,3
8	7453	CC	II	NO	-	32,5	53,3	153,5	8176	153472327	0,8	5,4	72,0
9	7457	Cs sólido	III	NO	-	38	117,6	153,4	18030	153433457	1,8	18,2	242,7
10	7831	CS	II	NO	+	42,6	763,6	156,2	119254	156190142	11,2	14	186,7
11	7907	CS	III	SÍ	+	47,3	132,3	154,2	20463	154237525	2,0	11,5	153,3
12	7932	CS	III	SÍ	+	53,7	2113,4	155,7	328784	155706410	31,2	17,1	228,0
13	7995	CS	II	NO	+	72	3216,3	153,2	492600	153221770	48,3	11,1	148,0
14	8104	CC	I	NO	-	27,6	592,7	155,6	92237	155646312	8,8	4,6	61,3
15	8579	CC	I	NO	-	43	603,6	154,5	93338	154525283	9,0	1,9	25,3
16	8703	Cs papilar	II	SÍ	+	54,1	527,2	154,8	81640	154770668	7,8	4,5	60,0
17	8733	CS	III	NO	-	56	160,3	154,7	24808	154716583	2,4	11	146,7
18	8734	CS	III	NO	+ (IHQ)	37,8	190,0	153,8	29253	153758798	2,8	17,7	236,0
19	8755	CC	I	NO	-	36	638,9	156,9	99192	156938456	9,5	4	53,3
20	9165	Cs tubular	I	NO	-	29,9	51,8	155,3	8056	155275465	0,8	3,7	49,3
21	9280	Cs papilar	II	NO	+	35,5	1531,1	154,4	236507	154449523	22,8	7,8	104,0
22	9282	Cs papilar	III	NO	+	32,1	831,9	154,3	128369	154294031	12,4	13,2	176,0
23	9345	CS	III	SÍ	+	48	2781,7	156,7	435739	156700826	40,8	15	200,0
24	9399	CS	III	SÍ	-	42	313,9	154,1	48320	154093188	4,7	4,1	54,7
25	9514	Cs anaplásico	III	NO	-	40,9	3409,4	156,7	8309	156714014	50,0	2	26,7
26	9555	Cs papilar	II	NO	+ (IHQ)	39,1	3162,5	156,2	493323	156198802	46,6	5,9	78,7
27	9582	Cs papilar	II	NO	+	38	2675,8	155,2	415403	155228329	39,6	4,2	56,0
28	9621	CS	III	NO	+	41,3	2921,5	155,6	455335	155649931	43,1	7	93,3

Tabla 5 (continuación)

CASO	NI	TH	GH	EN	LN	IP	Expresión de VEGFR-2					D M V		
							ÁREA	D	DOI	DOI/mm2	DOI/AIM	DMV/campo	DMV/mm2	
29	9837	Cs papilar	II	NO	+	(RH)	38	182,5	153,7	28061	153718424	2,7	9	120,0
30	10113	Cs tubular	I	NO	-		26	12,3	157,0	1932	156977912	0,2	5	66,7
31	10164	Cs anaplásico	III	SÍ	+		45	775,4	155,8	120829	155806311	11,4	5	66,7
32	10196	Cs papilar	II	NO	+		41,5	3634,3	154,4	561383	154412466	54,1	7,1	94,7
33	10286	Cs papilar	II	NO	-		41,2	969,8	154,0	149293	153974393	14,5	2,5	33,3
34	10526	CCE	III	NO	+		32	368,4	157,0	58020	157011030	5,4	9,1	121,3
35	10553	Cs papilar	III	SÍ	+	(IHQ)	42	4168,8	154,5	643343	154515277	62,1	6,2	82,7
36	10570	CS	III	SÍ	+		52,9	5434,6	156,9	850979	156865125	79,8	7	93,3
37	10696	CC	I	NO	-		21,2	1407,8	158,2	222547	158226524	20,5	2,9	38,7
38	11139	CC	II	NO	+	(IHQ)	36,5	842,1	155,9	131326	155876260	12,4	3,3	44,0
39	11205	CS	III	SÍ	+		44,7	6459,3	156,6	1011093	156560330	94,9	8,8	117,3
40	11237	CC	I	NO	-		40	75,5	156,3	11795	156337003	1,1	4	53,3
41	11265	Cs anaplásico	III	SÍ	+		57,6	3866,4	154,0	595951	154013008	57,7	5	66,7
42	11337	CS	III	NO	-		37,5	2,8	153,4	400	153432637	0,0	2,4	32,0
43	11395	Cs sólido	III	NO	-		49	284,0	154,0	43704	154006020	4,2	1,7	22,7
44	11414	Cs sólido	III	SÍ	+		49,9	2410,5	155,2	373808	155164296	35,8	7	93,3
45	11539	Cs anaplásico	III	SÍ	+	(RH)	55,6	1137,9	155,3	176643	155278648	16,9	3	40,0
46	11640	Cs sólido	III	SÍ	+	(RH)	61,7	3656,8	153,9	562741	153914332	54,7	1,4	18,7
47	11661	Cs papilar	II	NO	+		42,1	5948,9	156,2	929148	156174540	87,6	11	146,7
48	11699	Cs papilar	III	SÍ	+		35	4340,4	155,5	675213	155539941	64,2	7	93,3
49	11769	Cs papilar	II	NO	+		31,6	889,8	155,1	138068	155129079	13,2	6,5	86,7
50	11807	Cs papilar	II	NO	-		35,2	433,7	154,6	66984	154560128	6,5	8,5	113,3
51	11827	Cs tubular	I	NO	-		43,8	30,3	156,5	4747	156486792	0,4	4,3	57,3
52	11919	Cs papilar	II	NO	-		28,8	6,9	157,8	1089	157799284	0,1	5,8	77,3

Tabla 5 (continuación)

CASO	NI	TH	GH	EN	LN	IP	Expresión de VEGFR-2					D M V		
							ÁREA	D	DOI	DOI/mm2	DOI/AIM	DMV/campo	DMV/mm2	
53	11950	CS	III	NO	+	42	5328,2	155,8	830835	155822156	78,6	7	93,3	
54	11968	Cs papilar	II	NO	-	33	856,6	155,3	133042	155347251	12,7	14	186,7	
55	12009	Cs anaplásico	III	SÍ	+	44,1	6865,2	155,8	1069427	155774206	101,4	9	120,0	
56	12035	Cs sólido	III	SÍ	+	40,2	277,3	161,5	44975	161474997	3,9	5,2	69,3	
57	12041	CS	III	SÍ	+	(IHQ)	43,7	5128,8	156,0	799216	155996536	75,7	5,2	69,3
58	12174	Cs tubular	I	NO	-	25	1,0	156,1	154	156127168	0,0	6,2	82,7	
59	12203	Cs sólido	III	SÍ	+	(IHQ)	37	2163,9	156,3	337676	156254751	31,9	5	66,7
60	12227	CCE	III	NO	-	31	368,4	157,0	58020	157011030	5,4	10,4	138,7	
61	12249	CS	III	NO	+	52	4666,0	156,6	731958	156627596	68,4	11,8	157,3	
62	12312	CS	II	NO	+	28,8	3134,1	156,7	491452	156693236	46,0	6	80,0	
63	12324	CS	III	NO	+	(IHQ)	45,8	2898,9	153,7	445426	153663602	43,4	6	80,0
64	12391	CS	II	NO	-	21,5	7,9	156,1	1227	156081849	0,1	7	93,3	
65	12408	CS	III	NO	+	(IHQ)	44,7	1302,0	155,8	202939	155844209	19,2	7,9	105,3
66	12442	CS	II	NO	+	50,6	5708,5	156,6	894398	156590050	83,8	4	53,3	
67	12497	Cs sólido	III	NO	+	48	4342,1	156,0	676883	155960805	64,1	6	80,0	
68	12561	CC	I	NO	+	37,4	944,4	156,0	147327	156017452	13,9	2,1	28,0	
69	12604	CS	II	NO	-	27,1	92,3	156,0	14395	156013212	1,4	7,3	97,3	
70	12621	CC	II	NO	+	(IHQ)	27	761,3	156,0	118761	155954417	11,2	5	66,7
71	12622	CS	III	NO	+	39	1973,5	157,1	310520	157099048	28,8	2	26,7	
72	12821	CC	I	NO	-	40,4	61,8	155,3	9611	155304952	0,9	5,3	70,7	
73	12984	CS	III	SÍ	+	56,5	3108,4	155,9	483633	155887205	46,0	7,6	101,3	
74	13161	CS	III	SÍ	+	52,3	917,2	155,9	142970	155910399	13,5	9,3	124,0	
75	13222	CC	I	NO	-	38,5	59,6	155,9	9285	155912090	0,9	5,4	72,0	

Tabla 5 (continuación)

CASO	NI	TH	GH	EN	LN	IP	Expresión de VEGFR-2					D M V	
							ÁREA	D	DOI	DOI/mm2	DOI/AM	DMV/campo	DMV/mm2
76	13225	CC	II	NO	-	35,3	60,0	155,2	9312	155215044	0,9	1,1	14,7
77	13350	Cs papilar	II	NO	+ (RH)	50,3	1230,0	155,8	191471	155750856	18,2	3,9	52,0
78	13358	CS	III	NO	-	42,5	99,2	156,0	15488	156093968	1,5	8,8	117,3
79	13397	Cs sólido	III	NO	+ (IHQ)	32	1175,0	156,7	184075	156681485	17,3	8	106,7
80	13608	CS	III	NO	-	43,1	86,7	157,0	13617	156979845	1,3	6,2	82,7
81	13611	Cs sólido	III	NO	-	50,8	3745,2	156,5	10696	156453419	55,6	1,7	22,7
82	13623	CC	II	NO	-	39,5	48,5	155,8	7572	155832859	0,7	2,5	33,3
83	13637	CC	II	NO	-	40,1	38,6	156,2	6034	156207109	0,6	1	13,3
84	13650	CS	III	NO	+ (RH)	48,8	4098,7	155,4	636503	155375479	60,7	1	13,3
85	13671	CS	III	NO	+ (RH)	42,7	4724,3	156,7	739931	156676336	69,4	3,3	44,0
86	13675	Cs sólido	III	NO	-	31,8	428,9	156,3	67040	156337542	6,3	9,3	124,0
87	13691	Cs sólido	III	NO	-	33	155,2	156,1	24287	156101877	2,3	4	53,3
88	13692	CS	III	NO	+	41,9	4381,4	156,0	684156	156006800	64,5	10,9	145,3
89	13697	CCE	II	NO	-	38,2	50,0	156,4	7821	156360656	0,7	1	13,3
90	13711	CCE	III	NO	-	45	107,0	155,2	16627	155178180	1,6	4	53,3
91	13741	CS	III	SÍ	+	42	5833,1	156,6	912311	156590050	85,8	10	133,3
92	13760	CS	III	SÍ	+	37,6	2584,4	156,4	404472	156445815	38,0	7,5	100,0
93	13795	Cs sólido	III	SÍ	+ (IHQ)	40,3	4680,5	156,0	729946	155988510	69,0	18	240,0
94	13833	CS	III	NO	+	33,4	2932,0	155,7	456438	155724871	43,3	14,1	188,0
95	13902	Cs sólido	III	SÍ	+ (RH)	47,9	3499,5	156,3	546982	156285261	51,5	5,2	69,3
96	13907	Cs sólido	III	SÍ	+	45	2904,7	155,7	452051	155673578	42,9	9	120,0
97	13934	Cs sólido	III	NO	-	36,6	502,5	155,9	78276	155917290	7,4	7,1	94,7
98	14007	CC	I	NO	-	33,8	380,0	155,9	59370	155922028	5,6	4	53,3
99	14048	Cs papilar	III	SÍ	+ (RH)	52,1	5430,7	155,9	846389	155885114	80,1	8,2	109,3
100	14061	Cs papilar	III	SÍ	+	54,2	5098,0	155,9	795041	155943712	75,2	9,9	132,0

Tabla 5 (continuación)

CASO	NI	TH	GH	EN	LN	IP	Expresión de VEGFR-2					D M V	
							ÁREA	D	DOI	DOI/mm2	DOI/AM	DMV/campo	DMV/mm2
101	14082	Cs anaplásico	III	SÍ	+	48,2	4619,7	156,5	723148	156485535	67,9	1,7	22,7
102	14146	CS	III	NO	-	37,8	527,5	156,2	82429	156245275	7,8	2,6	34,7
103	14246	CC	II	NO	-	33,4	58,1	155,4	9059	155350516	0,9	4	53,3
104	14252	Cs papilar	III	SÍ	+ (RH)	53,1	2786,0	156,3	436267	156268136	40,9	2,1	28,0
105	14349	Cs papilar	II	NO	+	47,5	2676,6	156,1	417850	156142429	39,4	5,1	68,0
106	14430	Cs papilar	II	NO	-	54,7	975,7	149,1	146344	149096502	20,0	9	120,0
107	14482	CC	I	NO	-	38,3	105,3	154,4	16243	154425669	1,6	2,2	29,3
108	14502	Cs papilar	II	NO	-	37	438,6	155,0	68106	154994150	6,5	4,5	60,0
109	14507	Cs sólido	III	NO	-	57,2	203,0	155,1	31484	155072495	3,0	2	26,7
110	14543	CC	II	NO	-	33,7	136,5	154,9	21157	154885894	2,0	4,4	58,7
111	14725	Cs papilar	II	NO	-	42,6	657,6	156,2	102801	156196359	9,7	4	53,3
112	14727	Cs papilar	III	NO	-	40,5	644,9	155,0	99994	154965690	9,6	12	160,0
113	14750	Cs papilar	III	NO	+ (IHQ)	49,5	2164,6	155,2	335877	155169415	32,1	3,9	52,0
114	14751	CC	II	NO	+ (RH)	28	382,5	153,8	95738	254582520	4,6	0,9	12,0
115	14779	CC	I	NO	-	37	258,5	156,2	40432	156247935	3,8	4,3	57,3
116	14789	CC	II	NO	-	32	285,6	155,0	44279	154977173	4,2	5,2	69,3
117	14870	CS	III	SÍ	+	68	195,3	154,1	30077	154106360	2,9	0,5	6,7
118	14882	CC	I	NO	-	40,1	227,1	154,6	35068	154645981	3,4	0,2	2,7
119	14919	Cs sólido	III	SÍ	+	69,4	5875,3	155,6	914166	155599885	86,9	9	120,0
120	14936	Cs tubular	I	NO	-	42,5	530,3	156,6	82998	156623825	7,8	4,9	65,3
121	14969	Cs tubular	I	NO	-	38	198,5	155,9	30945	155903598	2,9	5,3	70,7
122	14994	Cs sólido	III	SÍ	+	50,1	5364,3	155,2	832365	155220233	79,5	11,8	157,3
123	15018	Cs papilar	III	SÍ	+ (RH)	41,7	1676,8	156,1	261693	156052786	24,7	18	240,0
124	15520	Cs papilar	I	SÍ	-	30,3	236,9	155,5	36853	155455882	3,5	5	66,7
125	15573	CC	I	NO	-	39,4	172,3	154,9	26659	154896424	2,6	2,8	37,3

Tabla 5 (continuación)

CASO	NI	TH	GH	EN	LN	IP	Expresión de VEGFR-2					D M V	
							ÁREA	D	DOI	DOI/mm2	DOI/AIM	DMV/campo	DMV/mm2
126	15574	CC	I	NO	-	60,7	125,1	155,6	19420	155562852	1,9	4,1	54,7
127	15752	Cs sólido	III	SÍ	+	39,3	3121,5	155,5	485170	155543443	46,2	6,4	85,3
128	15833	Cs sólido	III	SÍ	+	40,7	3728,3	156,5	584255	156472890	54,7	14,2	189,3
129	15926	CS	II	NO	+	45,7	3510,8	155,3	545654	155256733	52,0	4	53,3
130	16026	CS	II	NO	+	42,4	3508,1	155,7	545849	155663579	51,9	11	146,7
131	16080	CC	II	NO	+	33	226,4	154,6	35088	154577868	3,4	0,3	4,0
132	16548	CC	I	NO	-	38	2441,3	155,5	379809	155500145	36,1	6,39	85,3
133	16854	Cs papilar	II	NO	-	45,3	762,8	155,7	118841	155700652	11,3	4,2	56,0
134	17358	CC	I	NO	-	39,8	976,2	156,3	152662	156286179	14,4	3	40,0
135	17383	Cs tubular	II	SÍ	-	37,2	2116,0	155,2	328734	155220475	31,3	4,7	62,7
136	18652	Cs sólido	II	NO	+	41,8	2194,9	156,0	342177	156020591	32,4	5,2	69,3

NI: número de inclusión

TH: tipo histológico

VEGFR-2: receptor 2 del factor de crecimiento de endotelios vasculares

DMV: densidad de microvasos

GH: grado histológico

EN: émbolos neoplásicos

LN: linfonódulo

IP: índice de proliferación

D: densidad

DOI: densidad óptica integrada

AIM: área inmunomarcada

Cs: carcinoma simple

CC: carcinoma complejo

CS: carcinosarcoma

CCE: carcinoma de células escamosas

(-): negativo

(+): positivo

IHQ: inmunohistoquímica

RH: revisión histopatológica

Tabla 6. Datos clínicos y de supervivencia (exclusivos del grupo II)

Nº	Edad	R	EA	LOC.	T	LN ExC	Met D	TNM	E Cl	S I	S II	S III	MRN	MnoRN	S	CA
1	8 a	Dob	6 m	Abd.Ca.D	3 cm	S/P	NO	1-0-0	I	S/P	S/P	S/P	NO	NO	A	Des
2	13a	M	Des	T.Ca.D	5 X 2 cm	S/P	NO	2-1-0	IV	S/P	S/P	S/P	NO	NO	A	murió
3	10 a	M	6 m	Abd.Cr.I	4 cm	S/P	NO	2-1-0	IV	S/P	S/P	S/P	NO	NO	A	vive
4	11 a	FT	1 m	Abd.Ca.D	1,3 cm	S/P	NO	1-1-0	IV	S/P	S/P	S/P	NO	NO	A	murió
5	10 a	Pk	Des	Ing.I	1 cm	S/P	NO	1-0-0	I	S/P	S/P	S/P	NO	NO	A	vive
6	5 a	Cck	1 a	Abd.Cr.D	5 cm	I.a.m	NO	2-0-0	II	S/P	S/P	S/P	NO	NO	A	murió
7	7 a	OA	Des	Abd.Ca.I	4 cm	S/P	NO	2-1-0	IV	(-)	(-)	(-)	SI	(-)	B (1 m)	(-)
8	12 a	M	1 m	T.Cr.D	4 cm	I.a.m	NO	2-1-0	IV	(-)	(-)	(-)	SI	(-)	B (1 m)	(-)
9	8 a	OA	Des	Ing.D	3 cm	S/P	NO	1-0-0	I	S/P	S/P	S/P	NO	NO	A	Des
10	8 a	M	3 m	Ing.I	4 cm	S/P	NO	2-1-0	IV	S/P	S/P	S/P	NO	NO	A	murió
11	10 a	M	8 m	Ing.D	10 X 6 cm	I.a.m	NO	3-0-0	III	S/P	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	SRG
12	11 a	BH	2a	Ing.I	0,5 cm	S/P	NO	1-0-0	I	S/P	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	SRG
13	11 a	OA	Des	Ing.I	0,3 cm	S/P	NO	1-0-0	I	S/P	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	SRG
14	7 a	OB	2 m	Ing.D	6 X 4 cm	S/P	NO	3-1-0	IV	NR	NR	S/P	NO	NO	A	vive
15	8 a	Br	6 m	Ing.I	3 X 2 cm	S/P	NO	1-0-0	I	S/P	S/P	S/P	NO	NO	A	vive
16	12 a	Dob	1 m	Ing.I	2 X 10 cm	I.a.m	NO	3-1-0	IV	(-)	(-)	(-)	SI	(-)	B (1 m)	(-)
17	8,5a	Br	6 m	Ing.D	4 X 3 cm	S/P	NO	2-1-0	IV	S/P	S/P	S/P	NO	NO	A	murió
18	7 a	M	Des	Abd.Ca.D	3,5 cm	I.a.m	NO	2-0-0	II	S/P	NR	S/P	NO	NO	A	Des
19	8 a	M	7m	Abd.Cr.D	2,5 cm	S/P	NO	1-0-0	I	S/P	S/P	S/P	NO	NO	A	murió
20	7 a	M	Des	Ing.I	3,5 cm	S/P	NO	2-0-0	II	S/P	S/P	S/P	NO	NO	A	vive
21	6ª	OA	Des	Abd.Ca.D	0,5 cm	S/P	NO	1-0-0	I	S/P	S/P	S/P	NO	NO	A	vive
22	4ª	Lab	2 m	Ing.D	15 cm	S/P	NO	3-0-0	III	S/P	S/P	S/P	NO	NO	A	vive

Tabla 6 (continuación)

Nº	Edad	R	EA	LOC.	T	LN ExC	Met D	TNM	E Cl	S I	S II	S III	MRN	MnoRN	S	CA
23	15a	M	Des	Ing.I	6 X 3 cm	S/P	NO	3-1-0	IV	S/P	S/P	(-)	SI	(-)	M (14 m)	(-)
24	8 a	Rott	1 m	Abd.Ca.I	7 X 4 cm	l.a.m	NO	3-1-0	IV	(-)	(-)	(-)	NO	SI	B (64 días)	SRG
25	9ª	M	1,5 a	Ing.D	4 X 3 cm	S/P	NO	2-0-0	II	S/P	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	SRG
26	8ª	Pk	Des	Abd.Ca.D	0,3 cm	S/P	NO	1-0-0	I	S/P	S/P	S/P	NO	NO	A	Des
27	11a	Br	1s	Ing.D	4 X 8 cm	S/P	NO	3-0-0	III	S/P	(-)	(-)	SI	(-)	B (5 m 20 d)	(-)
28	14a	Cck	7m	Ing.I	2 X 1 cm	l.a.m	NO	1-1-0	IV	RP	(-)	(-)	SI	(-)	B (6 m)	(-)
29	12a	FT	2ª	Abd.Ca.D	6 X 3 cm	l.a.m	SI	3-1-1	IV	Dis/PP	(-)	(-)	SI	(-)	B (4 m)	(-)
30	10a	VPI	4 m	Ing.D	6 X 6 cm	l.a.m	NO	3-1-0	IV	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	SRG
31	10 a	M	1 a	Abd.Ca.D	3 X 2 cm	S/P	NO	1-1-0	IV	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	SRG
32	8a	M	1 a	Ing.D	7 X 5 cm	l.a.m	NO	3-0-0	III	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	SRG
33	13 a	M	Des	Ing.I	6 X 3 cm	S/P	NO	3-0-0	III	S/P	S/P	S/P	NO	NO	A	vive
34	15 a	M	Des	T.Ca.I	3 cm	S/P	NO	1-0-0	I	S/P	S/P	S/P	NO	NO	A (19 m)	murió
Abreviaturas utilizadas en el encabezado								Abreviaturas utilizadas en el cuerpo								
Nº= número de caso R= raza EA= evolución aproximada LOC= localización, mama afectada T= tamaño (cuando consta una sola dimensión se trata del diámetro) LN ExC= estado del LN establecido por examen clínico Met D: metástasis a distancia (durante examen clínico) TNM= sistema tumor - linfonódulo - metástasis E Cl= estadio clínico del paciente S I, II, III = exámenes clínicos de seguimiento (1º, 2º y 3º) MRN= muerte relacionada con la neoplasia MnoRN= muerte no relacionada con la neoplasia S= supervivencia a partir del diagnóstico patológico CA= condición al 12/2007 (tras el periodo de seguimiento)								a= años d= días m= meses Des= desconocida Abd= abdominal Ing= inguinal T= torácica Ca= caudal Cr= craneal D= derecha I= izquierda S/P= sin particularidades l.a.m= linfadenomegalia NR= seguimiento no realizado (paciente conservada en el grupo) (-) = seguimiento no realizado (muerte de la paciente o eliminación del grupo) RP= rales pulmonares Dis= disnea PP= pérdida de propiocepción A= alta B= baja M= media SRG= se retiró del grupo								

Tabla 6 (continuación)

BH= basset hound
Br= bretón
Cck= cócker spaniel
Dob= dobermann
FT= fox terrier
Lab= labrador retriever
M= mestizo
OA= ovejero alemán
OB= ovejero belga
Pk= pequinés
Rott= rottweiler
VPI= viejo pastor inglés