

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA DE SHOCK TÉRMICO HSP90 EN
TUMORES MAMARIOS EN HEMBRAS CANINAS**

“por”

Laura ALSINA GARINO

TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias.
Orientación: Higiene e inspección de los
alimentos de origen animal.

MODALIDAD: ENSAYO EXPERIMENTAL

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2019**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de Mesa:

Dra. Paula Pessina

Segundo Miembro (Tutor):

Dra. Graciela Pedrana

Tercer Miembro:

Dr. José M. Verdes

Cuarto Miembro:

Lic. Paula Lombide

Fecha:

Autora:

Laura Alsina

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Ana María Garino y Héctor Eduardo Alsina, Por ser siempre mi apoyo e impulso para seguir estudiando y no rendirme hasta lograr mis metas. ¡Los amo infinitamente!

A mis hermosos hijos, Agustina y Joaquín, soy muy feliz gracias a ellos, y más por poder dejarles este mensaje de que todo es posible cuando uno se lo propone, aunque lleve tiempo. Me da mucha felicidad que puedan verme vivir esta etapa, en la que me siento completa. Gracias por adaptarse a mis ausencias y el que no pueda estar tanto como quisiera con ustedes, ¡gracias bebitos los amo muchísimo!

A mi esposo, Enrico, porque sin tu ayuda no hubiera podido estudiar, ni tener el tiempo y tranquilidad necesarios para hacerlo. ¡Gracias por tus consejos, por el apoyo moral y por ser tan hermoso siempre ¡Te amo!

A mis hermanos, Andrés y Flavia, a mi hermoso sobrino Fabricio y a toda mi familia tíos y primos que siempre están presentes dándome ánimo en todo. A Cristina, mi suegra también le agradezco por su apoyo.

A mi tutora Dra. Graciela Pedrana, por confiar en mí para este trabajo, y gracias también a mi co- tutora Paula Lombide.

A mis compañeras Mariana Jassid y Noelia Misevicius, con las que tuve el placer de compartir toda la experiencia en el aprendizaje de este tema. Gracias a Helen, Ana, Fernanda, Camila, Mónica y Alicia, compañeras de histología que también me ayudaron siempre durante la tesis.

A mis compañeros/as de anatomía, porque aprendí mucho de ellos, en todos estos años compartidos diariamente. Especialmente gracias a todo mi equipo “Mano pelada”, por la buena energía y el apoyo constante, gracias Leda por tus consejos, gracias William, Mariana, Emiliano, Kathy y María los aprecio muchísimo. Gracias también a William Pérez que me incentivó para terminar mis estudios de grado.

A mis amigos de toda la vida, Lourdes, Derli, Aliné y a los que conocí durante la carrera, Naty, Emi, Iva, Nata, Diana, Vero, Vale, Santy, Fabián, Caro, Luciana, Yanela y muchos más, muy buenas personas que tuve la suerte de conocer, y que me hacen sentir dichosa de tenerlos y siempre acompañada.

A los compañeros de la AEV (Asociación de estudiantes de Veterinaria), lugar donde supe encontrar mi espacio para estudiar, formarme, para crear, también distenderme y sentirme parte como estudiante.

A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por financiar este trabajo.

A el equipo de cirugía y funcionarios que trabajan relacionados al block quirúrgico del hospital por permitirme acceder a las muestras y a las fichas clínicas, siempre con amabilidad y buena disposición. Y Gracias al Dr. Verdes y Dr. Cruz por realizar los diagnósticos histopatológicos.

Dedico este trabajo:

A mis abuelos, en especial mis abuelas Yolanda Ferré y Justina Claustre, a quienes perdí a consecuencia del cáncer.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE CUADRO Y FIGURAS	7
RESUMEN.....	9
SUMMARY	10
2. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 IMPORTANCIA DE LAS NEOPLASIAS MAMARIAS	11
1.2 PROTEÍNAS DE SHOCK TÉRMICO COMO MARCADORES TUMORALES	11
1.3 PROTEÍNA DE SHOCK TÉRMICO 90 EN TUMORES MAMARIOS	11
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS DE LAS MAMAS CANINAS.....	13
2.1.1 <i>Irrigación sanguínea de las mamas caninas</i>	13
2.1.2 <i>Irrigación linfática de las mamas caninas</i>	15
2.2 HISTOLOGÍA DE LA GLÁNDULA MAMARIA NORMAL	15
2.2.1 <i>Lóbulos y lobulillos mamarios</i>	15
2.2.1.1 Porción de conducción de la glándula	15
2.2.1.2 Porción secretora de la glándula mamaria	16
2.3 CAMBIOS DURANTE EL DESARROLLO PREPUBERAL, PUBERAL Y POSTPUBERAL DE LA GLÁNDULA MAMARIA	16
2.3.1 <i>Estrógeno y sus receptores como moduladores del crecimiento de la glándula mamaria</i>	16
2.3.2 <i>Prolactina y su función de secreción</i>	16
2.3.3 <i>Cambios de la mama durante el ciclo estral</i>	17
2.4 NEOPLASIAS	19
2.5 DESARROLLO DE LOS TUMORES, CARCINOGENESIS	19
2.6 TUMORES DE LA GLÁNDULA MAMARIA EN HUMANOS Y ANIMALES	20
2.6.1 <i>Factores que influyen en el desarrollo de tumores mamarios en caninos</i>	20
Sexo.....	20
Edad	20
Influencia hormonal	21
Receptores hormonales en la glándula mamaria tumoral	21
Raza.....	21
2.7 MEDIOS UTILIZADOS PARA LLEGAR AL DIAGNÓSTICO DE TUMORES MAMARIOS.....	21
2.7.1 <i>Exploración clínica en la consulta</i>	21
2.7.2 <i>Citología</i>	22
2.7.3 <i>Técnica de inmunohistoquímica</i>	22
2.7.4 <i>Histopatología</i>	22
2.7.4.1 Clasificación histopatológica de tumores mamarios	23
2.8 DESCRIPCIÓN LOS TIPOS MÁS COMUNES DE TUMORES EN GLÁNDULA MAMARIA CANINA (CLASIFICACIÓN DE GOLDSHMIDT ET AL, 2011)	27
2.8.1 <i>Neoplasia Epitelial maligna</i>	27
2.8.2 <i>Neoplasia Epitelial maligna tipo especial</i>	27
2.8.3 <i>Neoplasia mesenquimal maligna</i>	27
2.8.4 <i>Tumor mamario mixto maligno</i>	28
2.8.5 <i>Neoplasia benigna</i>	28
2.8.6 <i>Hiperplasia</i>	28
2.9 PROTEÍNAS DE SHOCK TÉRMICO (HSPs)	29
2.9.1 <i>Rol de las proteínas de shock térmico en tumores</i>	30
2.9.2 <i>Gen de HSP90B1</i>	30
2.9.3 <i>Estructura y función de la proteína HSP90</i>	30
2.9.4 <i>Proteína de shock térmico 90 en condiciones normales</i>	32
2.9.5 <i>Proteína de shock térmico 90 en condiciones patológicas</i>	32
2.10 TRATAMIENTOS ANTI-TUMORALES	34

2.10.1	Tratamientos utilizados en caninos.....	34
2.10.2	HSP90 como tratamientos contra el cáncer en humanos.....	34
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GENERAL	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4	HIPÓTESIS	35
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	36
5.1	ANIMALES Y DISEÑO EXPERIMENTAL	36
5.2	ANÁLISIS DE FICHAS CLÍNICAS	36
5.3	OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO.....	37
5.4	MICROTOMÍA	37
5.5	COLORACIÓN DE HEMATOXILINA-EOSINA	37
5.6	CLASIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA	38
5.7	TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA.....	41
5.8	CAPTURA DE IMÁGENES DE PREPARACIONES DE INMUNOHISTOQUÍMICA.....	41
5.9	ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA INMUNOLocalIZACIÓN DE LA PROTEÍNA HSP90.....	42
5.10	ANÁLISIS DE IMÁGENES DE INMUNOHISTOQUÍMICA	42
5.11	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	42
6	RESULTADOS	43
6.1	ANÁLISIS DE CASUÍSTICA DE TUMORES MAMARIOS EN PERRAS	43
6.1.1.	<i>Casuística según edad</i>	43
6.1.2	<i>Casuística según raza</i>	43
6.1.3	<i>Casuística según estatus hormonal</i>	43
6.1.4	<i>Casuística según ocurrencia del tumor</i>	43
6.1.5	<i>Casuística según histopatología</i>	43
6.2	RESULTADO DESCRIPTIVO DE LA INMUNOLocalIZACIÓN DE LA PROTEÍNA HSP90 EN TUMORES MAMARIOS DE HEMBRAS CANINAS	48
6.2.1	<i>Localización de la proteína HSP90 en células de epitelios glandulares</i>	48
6.2.2	<i>Localización HSP90 en células epiteliales de conductos</i>	48
6.2.3	<i>Localización de la proteína HSP90 en células del estroma conjuntivo</i>	48
6.2.4	<i>Localización extracelular de la proteína de shock HSP90</i>	48
6.3	ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA INMUNOEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA HSP90 EN TUMORES MAMARIOS DE HEMBRAS CANINAS.....	51
6.3.1	<i>Efecto de la edad sobre la variable HSP90</i>	51
6.3.2	<i>Efecto del estatus hormonal sobre la variable HSP90</i>	51
6.3.3	<i>Efecto de la ocurrencia del tumor mamario sobre la variable HSP90</i>	51
6.3.4	<i>Efecto de la interacción entre variables estatus hormonal y ocurrencia del tumor sobre la inmunexpresión de HSP90</i>	51
6.4	RESULTADOS DESCRIPTIVOS DEL ÁREA INMUNOMARCADA DE HSP90 EN TUMORES DE MAMA EN HEMBRAS CANINAS.	55
6.4.1	<i>Histopatología</i>	55
6.4.2	<i>Raza</i>	55
7	DISCUSIÓN.....	57
7.1	¿DÓNDE SE LOCALIZA LA PROTEÍNA DE SHOCK TÉRMICO HSP90 EN TUMORES MAMARIOS DE PERRAS?.....	57
7.2	¿CÓMO SE EXPRESA LA PROTEÍNA DE SHOCK TÉRMICO HSP90 EN TUMORES DE MAMA SEGÚN EL ESTATUS HORMONAL DE LA PERRA?	57
7.3	¿LA CASUÍSTICA DE TUMORES MAMARIOS EN PERRAS EN EL PRESENTE ESTUDIO CON RESPECTO A ESTATUS HORMONAL FUE SIMILAR EN LOS CASOS ESTUDIADOS PREVIAMENTE?.....	58
7.4	¿EXISTEN SIMILITUDES EN LA EDAD DE PRESENTACIÓN DE TUMORES MAMARIOS EN PERRAS REGISTRADOS EN EL PRESENTE ESTUDIO CON RESPECTO A OTROS ESTUDIOS?	59
8	CONCLUSIONES	60
8.1	ESTUDIOS A FUTURO	61

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 62

LISTA DE CUADRO Y FIGURAS

Tabla N° 1. Tumores mamarios caninos según la clasificación histológica propuesta por Goldschmidt et al., 2011 y validada por Rasotto et al., 2017.

Tabla N° 2. Clasificación histopatológica y su pronóstico en tumores de mama en hembras caninas, según Rasotto, Berlato, Goldschmidt, Zappulli, 2017.

Tabla N°3. Resumen de datos histopatológicos de muestras de tumor mamario utilizadas. Detalle del número de animales por grupo de tumor (n) según clasificación histopatológica.

Figura 1. Conformación e irrigación de las glándulas mamarias caninas a) conformación interna de la mama y papila mamaria de la perra. b) distribución de mamas e irrigación sanguínea de las glándulas mamarias caninas, Adaptados de Barone (2011).

Figura 2. Características histológicas de la glándula mamaria canina. a) esquema representativo de un lóbulo de la glándula mamaria canina conformado por los lobulillos y conductos interlobulillares. b) Esquema de un lobulillo, donde se observa el estroma de tejido conjuntivo laxo, junto a vasos y tejido adiposo, la unidad secretora, el túbulo-alvéolo mamario y los conductos intralobulillares. c) Conformación esquemática de un túbulo-alvéolo mamario, se muestran los lactocitos y las principales estructuras celulares asociadas (células mioepiteliales y células adiposas), modificado de Callejo (2012). d) imagen de un corte histológico de tejido mamario normal canino, donde observamos el tejido conjuntivo denso que rodea los lóbulos, un conducto y diferentes cortes de alvéolos (adaptado de Fernandes,2012)

Figura 3. Plegamiento de proteína cliente asistido por proteínas de shock térmico y estructura de Hsp90. a) Función de las Hsps como chaperonas en el plegamiento asistido a otras proteínas, a quienes vuelven funcionales (flecha a la derecha). Se observa también una proteína que no ha sido asistida y mediante el autoplegado logra ser funcional o puede quedar defectuosa (Flecha a la izquierda), (modificado de Coronato et al., 1999). b) Estructura de proteína de shock térmico 90 (Hsp90) constituida por sus tres dominios, un N-terminal, el dominio medio y el dominio C-terminal. Se observa la forma de dímero flexible, y en este caso semicerrado conteniendo molécula de ADP en el dominio N-terminal, Adaptado de Saibil (2013).

Figura 4. Respuesta celular ante situación de estrés. Como respuesta celular ante una situación de estrés de variada índole, por ejemplo, altas temperaturas, el factor de transcripción HSF1 que se encuentra normalmente en el citoplasma de la célula unido a las HSP90 y HSP70, se disocia de ellas e ingresa al núcleo uniéndose a secuencias específicas de elementos de choque térmico para activar la transcripción de genes promotores de más HSP90, entre otras, con el fin de lograr la protección de la célula (Modificado de Chatterjee, 2017).

Figura 5. Imágenes histológicas con tinción de Hematoxilina- Eosina representativa de tumores de glándula mamaria en perras ingresadas al Centro Hospital de Facultad de Veterinaria durante los años 2014 a 2018. Se describe en a, b, c, d, e, f el tipo de tumor presente, la raza del animal, su edad de acuerdo a categorías adultas jóvenes (de 2 a 5 años), adultas (de 6 a 10 años) ancianas (de 11 a 16 años) y por último el estatus hormonal si esta con ovariectomía o sin ovariectomía.

Figura 6. Imágenes histológicas con tinción de Hematoxilina- Eosina representativa de tumores de glándula mamaria en perras ingresadas al Centro Hospital de Facultad de Veterinaria durante los años 2014 a 2018. Se describe a cada imagen g, h, i, j, el tipo de tumor presente, la raza del animal, su edad de acuerdo a categorías adultas jóvenes (de 2 a 5 años), adultas (de 6 a 10 años) ancianas (de 11 a 16 años) y por

último el estatus hormonal si esta con ovariectomía (castrada) o sin ovariectomía (entera).

Figura 7. Casuística de tumor de glándula mamaria de hembras caninas ingresadas en Centro Hospital de Facultad de Veterinaria (2014 – 2018) según edad y raza.

a) Según edad perra adulta de 2 a 5 años (n=5), adulta de 6 a 10 años (n=15), de más de 11 años (n=8). b) Según raza.

Figura 8. Casuística de tumor de glándula mamaria de hembras caninas ingresadas en Centro Hospital de Facultad de Veterinaria (2014 – 2018). C) Según estatus hormonal: con ovariectomía / sin ovariectomía. D) Según ocurrencia del tumor: primario / secundario.

Figura 9. Casuística de tumor de glándula mamaria de hembras caninas ingresadas en Centro Hospital de Facultad de Veterinaria (2014 – 2018). Casuística según diagnóstico histopatológico: Carcinomas (n=25), Sarcoma (n=2), Hiperplasia de células mioepiteliales (n=1).

Figura 10. Inmunolocalización de la proteína de shock térmico HSP90 en tumor de glándula mamaria de hembras caninas. Imágenes de inmunohistoquímica representativas de los tumores mamaros de perras, donde se indican la inmunolocalización de la proteína, a) Hiperplasia células mioepiteliales, b) Adenocarcinoma, c) Carcinoma mamario quístico papilar, d) Carcinoma mamario sólido, e) Sarcoma, f) Tumor mixto. Barra de escala =10µm.

Figura 11. Imágenes de inmunohistoquímica que indican la Inmunolocalización de la proteína de shock térmico HSP90 en tumores mamaros de hembras caninas: a) observe la intensa inmunomarcación en citoplasma de células epiteliales en adenocarcinoma mamario b) inmunomarcación en citoplasma de célula del epitelio de conductos c) inmunomarcación más leve en núcleo de células epiteliales (imagen ampliada) d) Inmunomarcación en células del tejido conectivo (fibroblastos), e) Control Negativo de la técnica. Barra de escala =10µm. Magnificación final 400 aumentos.

Figura 12. Inmunoexpresión de la proteína HSP90 en tumores de mama de hembras caninas de acuerdo a la edad. Adulta joven/adulta/anciana), Las barras representan los valores de media ± eem.

Figura 13. Inmunoexpresión de la proteína HSP90 en tumores de mama de hembras caninas de acuerdo a el estatus hormonal y ocurrencia del tumor. a) Según estatus hormonal: hembras sin ovariectomía (n=18) y hembras con ovariectomía (n=10), b) según ocurrencia del tumor: primario (n=17) o secundario (n=11). ANOVA. Diferentes literales sobre las barras indican diferencias significativas (p<0.05). Las barras representan los valores de media ± eem.

Figura 14. Inmunoexpresión de la proteína HSP90 en tumores de mama de hembras caninas de acuerdo a interacción entre estatus hormonal y ocurrencia del tumor. Hembras sin ovariectomía (n=18) y hembras con ovariectomía (n=10) versus ocurrencia del tumor: primario (n=17) o secundario (n=11). ANOVA Diferentes literales sobre las barras indican diferencias significativas (p<0.05). Las barras representan los valores de media ± eem.

Figura 15. Inmunoexpresión de la proteína HSP90 en tumores de mama de hembras caninas de acuerdo a histopatología tumoral. a) HSP90 y cada tipo de tumor por Clasificación histopatológica. b) Inmunoexpresión de HSP90 en las razas estudiadas. Las barras representan los valores de media ± eem.

RESUMEN

Los tumores de mama presentan elevada incidencia tanto en perras como en humanos. Las proteínas de shock térmico se sobreexpresan en tumores promoviendo la supervivencia celular, y por ende la malignidad y resistencia tumoral. Entre ellas la proteína HSP90 actúa en los mecanismos de resistencia a quimioterapia y por lo tanto favorece la progresión tumoral. Sin embargo, en los recientes estudios en perras no se ha dilucidado aún cómo la proteína HSP90 varía su expresión según el tipo de tumor y las características clínicas. El objetivo del presente estudio fue caracterizar la inmunoexpresión de la proteína HSP90 en tumores de glándula mamaria de perras. Se utilizaron muestras de tumores mamarios de perras que fueron derivadas a mastectomía en el Centro Hospital Veterinario (n=28). Las muestras fueron fijadas en formol buffer y procesadas en parafina para análisis histológicos y de inmunohistoquímica. Se utilizó anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-HSP90 para determinar la inmunoexpresión de HSP90. El área de inmunomarcación de HSP90 se midió en imágenes de la inmunohistoquímica mediante el software ImageJ. Asimismo, se analizó en la ficha clínica los factores: edad, raza, ovariectomía previa realizada o no, ocurrencia del tumor por primera vez (primarios), recidiva o reincidencia (secundarios) y clasificación histopatológica del tumor. Los tumores más frecuentes, de acuerdo a la edad, fueron en perras de 6 a 10 años. Los resultados de casuística muestran que la mayoría de los tumores mamarios se registraron en hembras caninas cruce, sin ovariectomía y primarios. Los carcinomas fueron el tipo tumoral más frecuente registrado. En cuanto a la inmunoexpresión de la proteína HSP90 se localizó en citoplasma de células epiteliales glandulares, citoplasma de células epiteliales de conductos, en citoplasma de células del estroma conjuntivo. Asimismo, se observó una leve inmunoexpresión de HSP90 a nivel del núcleo de estas células epiteliales y conjuntivas y también extracelularmente. La inmunoexpresión de HSP90 no presentó diferencias según la edad (2 a 16 años) del animal. En tumores mixtos fue donde más se vio inmunoexpresión de HSP90. Los grupos que registraron mayor inmunoexpresión de HSP90 fueron los tumores primarios de hembras caninas sin ovariectomía y los tumores secundarios de hembras caninas con ovariectomía. En conclusión, la inmunoexpresión de la proteína de shock térmico HSP90 en tumores mamarios de hembras caninas es mayor en tumores primarios en comparación con secundarios. Asimismo, la proteína HSP90 aumenta en tumor primario de perras sin ovariectomía en comparación con perras ovariectomizadas. Sin embargo, en el caso de perras con tumor secundario y ovariectomizadas la proteína HSP90 se sobreexpresa, lo que supone una desregulación por carencia de estrógenos. Dado que el aumento de la expresión de la proteína HSP90 está asociado a un pronóstico reservado en perras, se sugiere la precaución en el seguimiento de los tumores primarios con elevada inmunoexpresión de HSP90. Los resultados de este estudio sientan las bases para realizar más estudios comparativos de la inmunoexpresión de HSP90 y las variables mencionadas, con un *n* mayor.

Palabras clave: HSP90, glándula-mamaria, tumor, perra

SUMMARY

Breast tumors have a high incidence in both dogs and humans. Heat shock proteins (HSP) are over expressed in tumors promoting cell survival, and therefore malignancy and tumor resistance. Among them the HSP90 protein works in the mechanisms of resistance to chemotherapy and therefore increasing tumor progression. However, recent studies in bitches tumors did not clarified how HSP90 varies according several types of tumors and several clinical features. So, the aim of the present study was to characterize the immunoexpression of the HSP90 protein in bitches mammary gland tumors. Mammary tumors samples from bitches (n = 28) were analyzed after mastectomy derived in Veterinary Hospital Center. Samples were formalin fixed and paraffin embedded for histological analyses and immunohistochemistry. Mouse monoclonal antibody anti-HSP90 was used to determine the immunoexpression of HSP90. Immunostaining area of HSP90 was measure in histochemical images by ImageJ software. The following factors were also analyzed in the clinical record: age, breed, previous ovariectomy performed or not, tumor occurrence for the first time (primary) or recurrence or recidivism (secondary) and histopathological classification of the tumor. The most frequent tumors were, according to age, in female canine of both 6 to 10 years. Casuistic results showed that the majority of mammary gland tumors were crossbreed females, without ovariectomy and primary tumors. Carcinoma types were the most frequent tumor. Regarding the immunoexpression HSP90 protein was localized in cytoplasm of glandular epithelial cells, cytoplasm of ductal epithelial cells, in cytoplasm of connective stroma cells. Also a less immunoexpression was observed at the nucleus level of these epithelial and connective cells and also extracellularly. The immunoexpression of HSP90 did not present differences according to age (2 to 16 years). In mixed tumors, it was where there was greater immunoexpression of HSP90. The groups that registered the highest immunoexpression of HSP90 were the primary tumors of females without ovariectomy and the secondary tumors of females with ovariectomy. In conclusion, the immunoexpression of HSP90 thermal shock protein in mammary tumors of female dogs is higher in primary than in secondary tumors. Likewise, HSP90 increases according to bitches with a primary tumor without ovariectomy compared with ovariectomised bitches. However, in the case of bitches with secondary tumor and ovariectomised the HSP90 protein is over expressed, which supposes a deregulation due to lack of estrogen. Given that the increase in the expression of HSP90 protein is associated with a reserved prognosis, this suggests, on the one hand, caution in the follow-up of primaries with high immunoexpression of HSP90 protein. The results of this study provide the basis for further comparative studies of the immunoexpression of HSP90 and the aforementioned variables with a higher n.

Keywords: HSP90, mammary, gland, tumors, canine

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia de las neoplasias mamarias

Las neoplasias son una de las principales causas de muerte en nuestra población, siendo los tumores de mama los de mayor frecuencia en la mujer, determinando un importante problema de salud a nivel nacional y mundial por ello es de gran interés su estudio en el ámbito de la medicina humana (De Andrés Gamazo, 2016).

Asimismo, en hembras caninas existe una elevada frecuencia en la presentación de tumores mamarios (Zatloukal et al., 2005). Estudios previos realizados en el Centro Hospital Veterinario de la Facultad de Veterinaria indican que un 43,8% de las consultas clínicas son por apariciones de tumores mamarios (Demicheli et al., 2011, Elgue et al., 2012), coincidiendo con registros similares realizados en países europeos (Zatloukal et al., 2005) y en países de América (Caicedo et al., 2012).

Dado que el humano comparte, en muchos casos, el mismo ambiente que los animales de compañía, es posible considerar realizar estudios en animales domésticos, como centinelas para evaluación de los riesgos de padecer cáncer de mama según ciertos estilos de vida (Withrow, 2009).

1.2 Proteínas de shock térmico como marcadores tumorales

Para establecer el diagnóstico, pronóstico y estadio de la neoplasia se utilizan marcadores tumorales. Asimismo, se utilizan para detectar la presencia de metástasis y recidivas o monitorear la respuesta a tratamientos (Coronato et al., 2002). Estos marcadores tumorales son moléculas presentes en las células tumorales, se sobreexpresan en ellas y pueden ser detectadas en: plasma, fluidos corporales, tumores sólidos, nódulos linfáticos y médula ósea. Se incluyen dentro de los marcadores tumorales a antígenos de superficie celular, proteínas citoplasmáticas, enzimas, hormonas y sus receptores.

Existe un grupo de marcadores moleculares que se denominan proteínas de shock térmico (del inglés Heat shock proteins, HSP). Dichas proteínas son denominadas "chaperonas moleculares" ya que tienen la propiedad de modificar las estructuras e interactuar con otras proteínas. Participan en la síntesis, el plegamiento y el ensamblaje de otras proteínas, las acompañan para que puedan volverse funcionales, pero no forman parte de su estructura final. Su función es esencial en las células, ya que se expresan tanto en condiciones fisiológicas como en fisiopatológicas. Cuando se presenta una situación de estrés se modifican ciertas proteínas, desnaturalizándolas o volviéndolas defectuosas, y por lo tanto se comienzan a sintetizar más de estas proteínas anti shock para que colaboren en la protección celular (Coronato et al., 1999).

1.3 Proteína de shock térmico 90 en tumores mamarios

La proteína de shock térmico 90 (HSP90) es una de las chaperonas moleculares más abundantes en el citoplasma de células eucariotas. Representa el 1-2% de la proteína celular siendo un regulador clave conformacional, cuando la célula recibe alguna situación de estrés, esta proteína aumenta su expresión en un 4-6% (Prodromou, 2016). La proteína HSP90 en la perra, es altamente expresada en los tumores con segundo grado de malignidad desde el punto de vista histológico. Esta expresión de

HSP90 fue correlacionada en estudios previos con alta actividad proliferativa por lo cual ha sido implicada en la carcinogénesis de la glándula mamaria canina (Kumar et al., 2018).

Dado que la HSP90 está altamente expresada en tumores mamarios, se han estudiado a nivel humano terapias contra dicha proteína. Por ejemplo, estudios recientes demuestran que inhibidores de HSP90 pueden ser utilizados como tratamiento anti tumoral (Li y Buchner, 2012). De esta forma, el bloqueo o inhibición de estas proteínas frena el desarrollo del tumor, con la ventaja de no ser un tratamiento tan agresivo para el paciente, como los que existen hoy en día.

No obstante, a pesar de los estudios en humanos, la proteína de shock térmico HSP90 no ha sido aún puesta en consideración para ser blanco de las terapias anti tumorales en perras. Por lo tanto, en el presente estudio, se determinó la inmunoexpresión de dicha proteína HSP90 en diversos tumores mamarios de perras, con el fin de caracterizar su expresión. Este primer paso permitirá a futuro plantear nuevas terapéuticas una vez conocido su accionar en dichos tumores.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características anatómicas de las mamas caninas

La glándula mamaria forma parte del tejido cutáneo como una glándula sudorípara modificada, Sus secreciones, cuando se encuentra activa, son la leche y el calostro que se producen como alimento para la descendencia de ese animal. Esta glándula constituye uno de los órganos que determina una de las características más destacables de los mamíferos, el dar de mamar (Barone, 1978).

A nivel anatómico en la hembra canina encontramos de 4 a 6 pares de mamas, los mismos se encuentran separados en derechos e izquierdos por la línea alba o línea blanca en la porción ventral de la región torácica, abdominal e inguinal. En la región torácica encontramos dos pares de mamas uno craneal y otro caudal (puede existir un solo par), en la región abdominal hay un par craneal y otro caudal, pero en la región inguinal existe un solo par de mamas, las que, por lo general, presentan mayor desarrollo en comparación con las torácicas (Dyce et al., 2012).

Cada mama está comprendida en un complejo mamario, que se conforma por un cuerpo glandular, que se corresponde a la zona de parénquima glandular y otra porción es el pezón. Los pezones (*papilla mammae*) también son llamados conductos excretores, y al igual que el cuerpo glandular, suelen variar en su forma y tamaño según el estado reproductivo en que se encuentre la hembra, siendo por lo general cortos, cónicos en hembras juveniles que no tienen camada en lactación, y semi esféricos cuando se encuentra en lactación, con variaciones individuales (König, 2015). En el vértice de su porción más distal los pezones presentan de 6 a 20 orificios papilares por los que vierte la secreción de la glándula al exterior (Ellensport,1999). Externamente la porción del cuerpo glandular se encuentra cubierta por pelo, a diferencia del pezón que no los presenta (Figura 1a).

2.1.1 Irrigación sanguínea de las mamas caninas

En los caninos, el aporte sanguíneo a las glándulas mamarias es brindado en mayor medida por las arterias epigástricas craneal y caudal superficial, derecha e izquierda respectivamente, para distribuirse a cada lado de la línea alba sobre toda la porción ventral de tórax, abdomen y región inguinal del animal (Figura 1b). Las glándulas torácicas también reciben aporte sanguíneo de ramas mamarias, provenientes de ramas perforantes que derivan de la arteria torácica interna, antes de su bifurcación en arteria epigástrica craneal, de esta arteria se emite una rama más superficial que se dirige principalmente sobre las mamas de la región torácica y los pares abdominales craneales (Barone, 2001). Existe a su vez un aporte adicional de ramas mamarias provenientes de la arteria torácica lateral (rama de la arteria axilar) hacia las mamas torácicas (Dyce, 2012; Schaller et al., 1992). La arteria epigástrica caudal tiene su origen del tronco pudiendo epigástrico, donde se separa de la arteria pudenda externa y mediante una rama superficial llega a las mamas abdominales caudales e

inguinales. Las venas de igual nombre, acompañan a las arterias pero en sentido opuesto, y siendo su destino las venas cavas craneal y caudal (König, 2016).

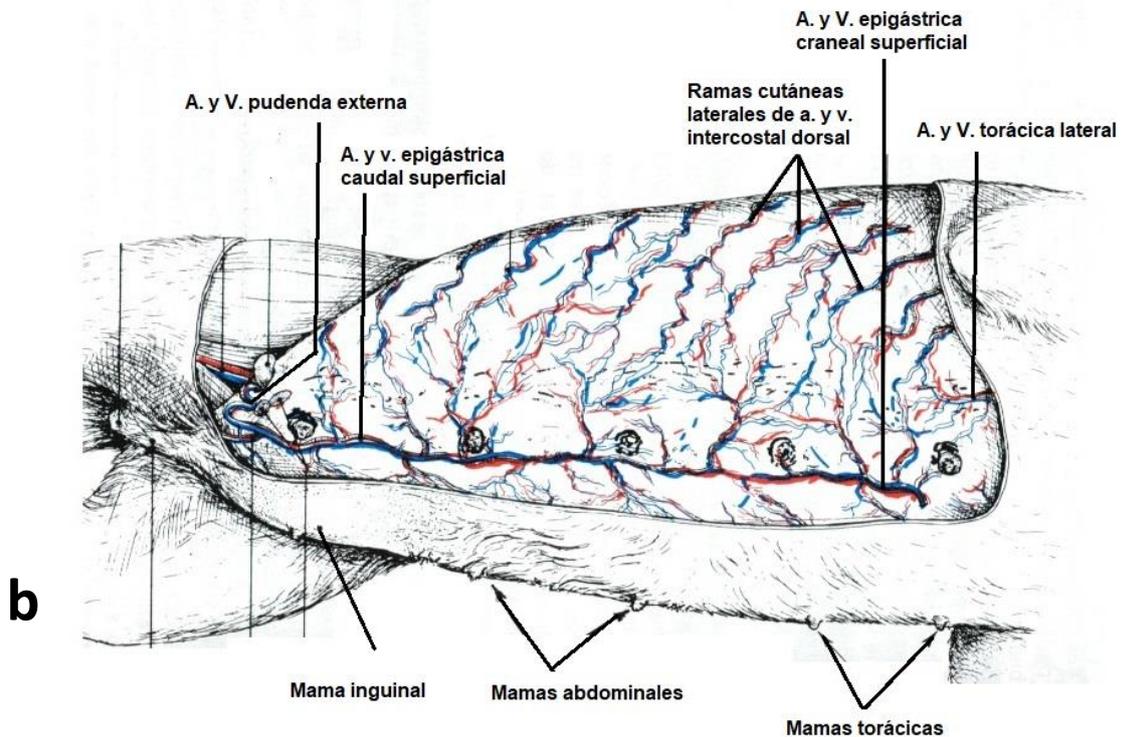
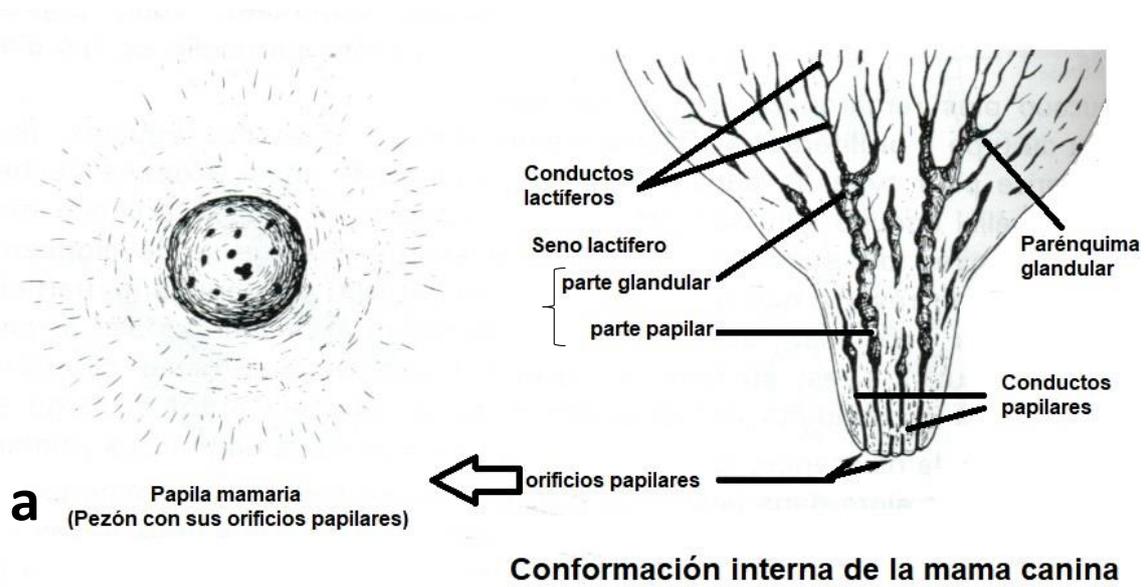


Figura 1. Conformación e irrigación de las glándulas mamarias caninas a) conformación interna de la mama y papila mamaria de la perra. b) distribución de mamas e irrigación sanguínea de las glándulas mamarias caninas, Adaptados de Barone (2001).

2.1.2 Irrigación linfática de las mamas caninas

Los vasos linfáticos que provienen de las mamas más torácicas y abdominales craneales transportan su linfa hacia los linfonodos axilares y linfonodo cervical superficial. En el caso de las mamas más caudales, como el par abdominal caudal y el par de mamas inguinales, la linfa se conduce hacia los nódulos inguinales superficiales. El par de mamas abdominal craneal puede dirigir su linfa en parte a los linfonodos axilares, así como también a los linfonodos inguinales. Conocer estas conexiones es importante en la clínica, cuando se deben examinar las glándulas mamarias y los linfonodos relacionados a ellas, ya que son los que nos pueden advertir de procesos infecciosos o tumorales cuando están agrandados o alterados (König, 2015).

2.2 Histología de la glándula mamaria normal

Como mencionamos anteriormente, la glándula mamaria es una glándula de la piel altamente modificada para la secreción de leche y calostro.

2.2.1 Lóbulos y lobulillos mamarios

Histológicamente encontramos que las mamas están formadas por lóbulos que se separan por un estroma interlobulillar de tejido conjuntivo denso (Figura 2a). En cada lóbulo, a su vez, encontramos lobulillos separados por un estroma intralobulillar de tejido conjuntivo laxo (Figura 2b).

El aumento en tamaño de la glándula se debe también a la formación de más tejido adiposo. La presencia de dicho tejido adiposo varía con la edad y con la etapa de la vida de la hembra. Asimismo, la cantidad de tejido mamario y adiposo presente es muy variable y es más abundante en las glándulas abdominales e inguinales que en las glándulas torácicas.

2.2.1.1 Porción de conducción de la glándula

La porción de conducción de la glándula está constituida por conductos intralobulillares que provienen de las unidades funcionales de la mama, llamadas túbulo alvéolos mamarios que corresponden a la porción secretora (Pawlina, 2016).

Estos conductos desembocan en otros conductos denominados interlobulillares que se van unir con los intralobales que terminan formando el conducto lactífero, este último va a desembocar en el seno lactífero el que se continúa al exterior por el orificio papilar (Diessler, 2009). Los conductos transportan la leche o calostro desde su origen en los túbulo-alvéolos mamarios hacia el exterior.

Los conductos están formados por células epiteliales rodeadas de tejido conjuntivo denso y por tejido adiposo (Fernandes, 2012). Los conductos intralobulillares están constituidos por un epitelio cúbico simple bajo. Los conductos interlobulillares drenan de diversos lóbulos presentan dos capas de células cúbicas (Barone, 2001).

2.2.1.2 Porción secretora de la glándula mamaria

2.2.1.2.1 Túbulo-alvéolos mamarios

Los túbulo-alvéolos se desarrollan una vez que la hembra queda gestada, y su máximo desarrollo se presenta con una forma tubular dilatada durante la etapa de lactación. Los alvéolos mamarios se componen por **células secretoras** llamadas **lactocitos** (Figura 2c). Dichas células, poseen forma cuboidal o columnar y en su interior presentan gotas intracelulares de grasa (Sorenmo et al., 2011). Cuando la mama no está activa, se denominan conductos terminales (Pawlina, 2016). Cuando la glándula está en desarrollo se producen ramificaciones de nuevos conductos que surgen a través de espacios que se forman entre las células mioepiteliales desde las células epiteliales localizadas medialmente (Sorenmo et al., 2011). Las células mioepiteliales, poseen forma estrellada, rodean la lámina basal del túbulo-alvéolo y contribuyen en su remodelación y síntesis (Diessler, 2009).

2.3 Cambios durante el desarrollo pre-puberal, puberal y pos-puberal de la glándula mamaria

Las glándulas mamarias son órganos que muestran constantemente cambios en su estructura según la etapa del ciclo reproductivo en que se encuentre la hembra. Las mamas se desarrollan en ambos sexos, pero llegada la pubertad en las hembras es el estímulo hormonal de estrógenos, prolactina y somatotropina u hormona de crecimiento que ocasionan dicha ramificación, alargamiento y engrosamiento de los conductos (Velandia, 2014).

2.3.1 Estrógeno y sus receptores como moduladores del crecimiento de la glándula mamaria

Es ese estímulo hormonal que recibe la glándula mamaria lo que determina su funcionalidad y acción. En el caso de los machos, la hormona testosterona inhibe el crecimiento de la glándula, por el contrario, en la hembra el estímulo de estrógenos y progesterona contribuye al desarrollo de esta.

Para lograr el desarrollo normal de la glándula existen en ella receptores de estrógeno y de progesterona además de factores de crecimiento, la acción del estrógeno se da sobre el crecimiento ductal y la de progestágenos lo hace sobre bifurcaciones ductales y los alvéolos mamarios (Hermo y Gobello, 2002).

2.3.2 Prolactina y su función de secreción

La maduración completa de la misma se produce durante la gestación, período en el cual se vuelven funcionales (Pawlina, 2016). Estando la hormona prolactina encargada del mantenimiento de la secreción de la glándula (Bonnet, 2011). Es entonces durante la preñez, con el apoyo de estas hormonas y otras, como la prolactina y el lactógeno placentario, el tejido glandular de la mama se diferencia aún más y el epitelio alveolar prolifera y luego se convierte en secretor.

2.3.3. Cambios de la mama durante el ciclo estral

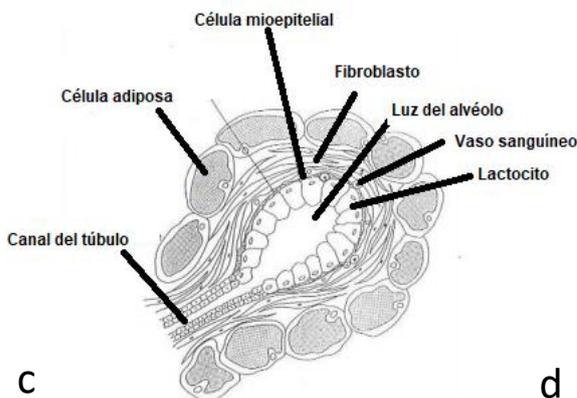
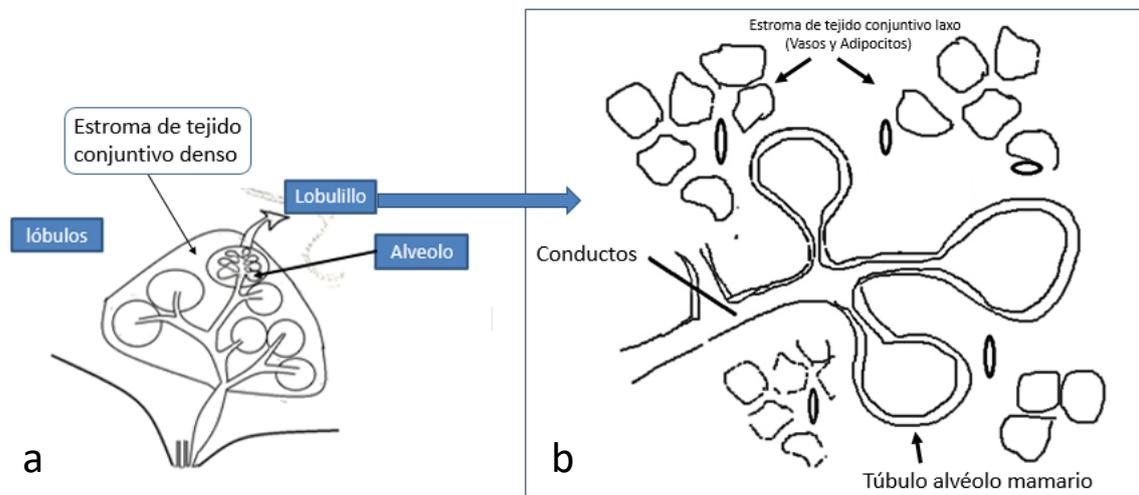
Estudios previos en perras describen la histología de la glándula mamaria canina durante el ciclo estral, lo que es útil al momento de evaluar los cambios patológicos (Rehm et al., 2007).

En perras pre-púberes en la fase de pro-estro, solo se encuentran conductos grandes (conductos interlobulares) revestidos por una doble capa de células epiteliales y una sola capa de células mioepiteliales, rodeados por un estroma interlobular denso de tejido conjuntivo.

Las estructuras epiteliales denominados brotes terminales o túbulos, consisten en paquetes compactos de células con grandes núcleos eucromáticos, 1 a 2 nucléolos prominentes y bordes celulares indistintos.

En perras adultas en etapa pro-estro, la glándula está inactiva y se compone principalmente de conductos interlobulares y pequeños lóbulos ocasionales rodeados por grandes cantidades de tejido conjuntivo intralobular. Pueden existir estructuras alveolares ocasionales del ciclo de celo y gestaciones anteriores, tapizadas por células aplanadas o células epiteliales vacuoladas cuboidales, todavía pueden estar presente en los pequeños lóbulos. Puede observarse la presencia de macrófagos que contienen lipofuscina dentro de la luz de estos.

En la gestación los alvéolos están llenos de una secreción proteica eosinofílica brillante y recubierto por células que varían de epitelio de tipo cuboidal alto a bajo.



Partes que conforman el Tubulo alvéolo mamario (Porción secretora)
(Modificado de Callejo, 2012)



Corte histológico de glándula mamaria normal canina
(adaptado de Fernandes, 2012)

Figura 2. Características histológicas de la glándula mamaria canina. a) esquema representativo de un lóbulo de la glándula mamaria canina conformado por los lobulillos y conductos interlobulillares. b) Esquema de un lobulillo, donde se observa el estroma de tejido conjuntivo laxo, junto a vasos y tejido adiposo, la unidad secretora, el túbulo-alvéolo mamario y los conductos intralobulillares. c) Conformación esquemática de un túbulo-alvéolo mamario, se muestran los lactocitos y las principales estructuras celulares asociadas (células mioepiteliales y células adiposas), modificado de Callejo (2012). d) imagen de un corte histológico de tejido mamario normal canino, donde observamos el tejido conjuntivo denso que rodea los lóbulos, un conducto y diferentes cortes de alvéolos (adaptado de Fernandes, 2012)

2.4 Neoplasias

Una neoplasia significa un “nuevo crecimiento”, y se presenta como una alteración en la regulación de los procesos normales de una célula, formando masas anormales de tejido que crecen de forma descontrolada, excesiva, autónoma e irreversible. Este nuevo crecimiento celular implica un aumento en el volumen del tejido involucrado que es conocido clínicamente como tumor (Velandia, 2014). Los tumores se clasifican en dos grupos principales benignos y malignos, según su comportamiento clínico, en el caso de los tumores benignos, son localizados, menos graves y pueden tratarse quirúrgicamente, en los malignos, se producen metástasis y se afectan estructuras adyacentes, por lo que son más agresivos y más difíciles de controlar (Demicheli et al., 2011).

2.5 Desarrollo de los tumores, carcinogénesis

En una revisión bibliográfica del año 2011 sobre el tema carcinogénesis en humanos, se describen las principales características del desarrollo tumoral.

En dicha revisión se menciona, que en las células tumorales determinados genes, que están silenciados en una célula normal, pueden comenzar a expresarse, volviendo a la célula indiferenciada e inmortal (Martín de Civetta y Civetta, 2011).

Resulta interesante destacar aquí a nivel de oncología de pequeños animales se menciona que, dicha célula indiferenciada, por sí sola no podría ser capaz de desarrollar un tumor, debido a factores ambientales, cuando existe una segunda, o varias, mutaciones, en células próximas a ella, reciben el estímulo para crecer o expandirse formando así un tumor (Withrow, 2009). Si existe una tercera mutación se ve reforzado el potencial de células malignas que pueden conducir a la progresión del tumor (metástasis, invasión de otros tejidos). El desarrollo del proceso de metástasis, es complejo, siendo los órganos más afectados por las metástasis los de mayor irrigación, como por ejemplo los pulmones (Modiano, 2009).

2.6 Tumores de la glándula mamaria en humanos y animales

La incidencia, a nivel mundial, de los tumores de mamas en estos últimos años ha ido en aumento, siendo consideradas las neoplasias más frecuentes tanto en mujeres como en hembras caninas (Raduly et al., 2018).

Los tumores mamarios espontáneos caninos y felinos son empleados como modelo de cáncer mamario humano ya que la glándula mamaria canina comparte características morfológicas muy similares a la glándula mamaria humana (Antuofermo et al., 2007). También comparten características histológicas, moleculares, el desarrollar tumores de forma espontánea, la edad de presentación y la relación con el curso de la enfermedad (Raduly et al., 2018). En otras especies como en la yegua, oveja, cabras y cerdas no es habitual que desarrollen tumores de mama y encontramos mayores diferencias con la glándula mamaria de humanos, por lo que resulta más adecuado utilizar la especie canina para estudiar y comparar el comportamiento de estos tumores y asociarlo con los humanos (Munson y Moresco, 2007).

A nivel local, estudios previos realizados en el Centro Hospital Veterinario de Facultad de Veterinaria, se determinó que un 43,8% de los tumores en perras fueron tumores mamarios (Elgue et al., 2012).

Asimismo, en hembras caninas existe una elevada frecuencia en la presentación de tumores mamarios (Zatloukal et al., 2005). Se han realizado estudios previos en el Centro Hospital Veterinario de la Facultad de Veterinaria entre los años 2001-2006 (Demicheli et al., 2011) indican que un 43,8% de las consultas clínicas son por apariciones de tumores mamarios (Demicheli et al., 2011, Elgue et al., 2012), coincidiendo con registros similares realizados en países europeos (Zatloukal et al., 2005) y en países de América (Caicedo et al., 2012).

2.6.1 Factores que influyen en el desarrollo de tumores mamarios en caninos

Existen varios factores que influyen en el desarrollo de tumores mamarios, es decir en la incidencia de aparición de los mismos, como lo son, la edad, el sexo, la raza, la influencia hormonal, la alimentación, el estilo de vida, entre otros (Sorenmo et al., 2012) como la exposición a sustancias oncogénicas (Salas y Romero, 2013).

Sexo

Existe un riesgo más marcado en las hembras, debido al mayor tropismo que posee la glándula mamaria a los estrógenos naturales (Salas y Romero, 2013). En el caso de los machos solo un 1% desarrollan tumores mamarios (Demicheli et al., 2011) y cuando lo hacen suelen ser benignos (Bonnet, 2011).

Edad

Uno de los factores más importantes es la edad, según especifica Bonnet (2011), el riesgo de desarrollar tumores se incrementa luego de los 8 años de edad, considerando la esperanza de vida según la raza de ese animal, pero se considera el rango que va de 10 a 11 años como de mayor predisposición a desarrollar neoplasias (Demicheli et al., 2011).

Influencia hormonal

La acción de ciertas hormonas que actúan sobre la glándula mamaria incide directamente en el desarrollo de neoplasias mamarias. Por ejemplo, la hormona del crecimiento, que es secretada por la hipófisis e incide en el crecimiento de la glándula. Inciden también, el estrógeno y la progesterona que influyen en los procesos de diferenciación celular. La progesterona aumenta su secreción en la fase lútea mamaria o cuando se administra vía oral (Demicheli et al., 2011; Munson y Moresco, 2007). El uso de progestágenos se asocia con una mayor predisposición a desarrollar de forma precoz tumores mamarios benignos (Oliveira et al., 2003).

Receptores hormonales en la glándula mamaria tumoral

Las mamas poseen fisiológicamente receptores de estrógeno, progesterona y prolactina, en tumores benignos estos receptores suelen aumentar al comienzo del proceso tumoral. Estas concentraciones elevadas de receptores disminuyen al aumentar la malignidad de la célula. El estado hormonal en el que se encuentra la hembra predispone a la aparición de tumores, es decir, si fue ovariectomizada o no, si la ovariectomía se realizó antes del primer celo, disminuye en mayor medida la predisposición a presentar tumores de mama (Demicheli et al., 2011; Etcheverría, 2013; Salas y Romero, 2013).

Raza

Según estudios previos se ha visto que, en cuanto a la raza, existe una mayor predisposición a presentar tumores mamarios en razas de pequeño tamaño y en razas puras (Sorenmo et al., 2012). Sin embargo, otros autores mencionan que esto puede variar según origen geográfico (Salas y Romero, 2013).

2.7 Medios utilizados para llegar al diagnóstico de tumores mamarios

En la consulta por tumores mamarios en los caninos, los mismos pueden ser advertidos por el propietario, o pueden ser descubiertos por el veterinario en la exploración clínica de otra afección o en controles de rutina (Diessler, 2009).

2.7.1 Exploración clínica en la consulta

Por lo general, en el caso de los caninos, cuando son llevados a consulta clínica, los tumores mamarios suelen presentar un desarrollo importante (Demicheli et al., 2011), debido a que cuando son pequeños pueden no ser visibles a simple vista, ya sea por el pelo o por pasar inadvertido por el propietario. En la exploración clínica realizada por los especialistas son fáciles de detectar por palpación, el sistema TNM (tumor, nódulo linfático, metástasis) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), es empleado comúnmente para clasificar en 5 estadios clínicos a la perra, estando el estadio 1 asociado a un mejor pronóstico (Benavente, 2018). Según estudios realizados, tumores de diámetro mayor o igual a 5 cm presentan mayor probabilidad de hacer metástasis a los nódulos linfáticos (Chang et al., 2005). Los tumores pueden ser únicos o múltiples (Roscioni et al., 2004, Hermo et al., 2005, Bonnet, 2011), e incluso, pueden coexistir tumores benignos y malignos en una misma mama (Oliveira

et al., 2003). Se pueden presentar ulcerados o no, pueden estar adheridos o no al tejido subcutáneo, lo que se determina por su movilidad, el que no estén adheridos facilita en gran medida el tratamiento quirúrgico. Los nódulos linfáticos relacionados a la mama afectada pueden estar aumentados de tamaño o no (Bonnet, 2011). Es por esto que se realiza el procedimiento TNM de rutina en casos de tumores, donde primero se observa el tumor, luego los nódulos linfáticos asociados y por último si existe metástasis, mediante radiografías, por ejemplo, el tratamiento a realizar (Benavente, 2018).

2.7.2 Citología

Estudios citológicos se realizan a través de la punción y aspiración con aguja fina del contenido del tumor mamario (Gallego, 2005). Esta técnica es relativamente sencilla y económica, puede dar una orientación al tipo de tumor del que se trata, y puede determinar en algunos casos si se trata de un tumor benigno o maligno (Rodríguez et al., 2009). En el caso de sospechas de tumor maligno se puede derivar a estudios más específicos y complementarios (Gallego, 2005). El mayor problema al realizarla es el de tener en cuenta el carácter mixto que pueden presentar algunos tumores, debiendo tomar muestras de diferentes partes del tejido, pudiendo así tener una mayor probabilidad de extraer los diferentes tipos posibles de estructuras involucradas (Etcheverría, 2013).

2.7.3 Técnica de inmunohistoquímica

El uso de la inmunohistoquímica para diagnóstico de tumores ha ido en aumento, se suele utilizar como complemento de la histopatología, porque resulta muy específica para confirmar el diagnóstico histológico de los tumores complejos, ya que permite realizar una caracterización detallada del tipo celular que origina la neoplasia (Rodríguez et al., 2013). Esta técnica consiste en el principio de la reacción antígeno-anticuerpo, el cual es muy específico. Se utilizan anticuerpos monoclonales o policlonales comerciales (Rodríguez et al., 2013).

2.7.4 Histopatología

Los análisis de muestras por medio de la histopatología son considerados de elección cotidianamente luego de realizar la extirpación quirúrgica del tumor (Rasotto et al., 2017). El comportamiento de los distintos tipos de tumores en caninos que afectan las glándulas mamarias es algo que continúa en constante estudio, ya que en ciertos tipos de tumores es difícil de predecir, por lo que la clasificación histopatológica colabora para su comprensión (Roschiani et al., 2004). El objetivo de realizar el estudio histopatológico del tejido mamario, y utilizando la coloración de rutina de hematoxilina-eosina, es diferenciar estructuras que tengan algún grado de malignidad y así hacerlas concordar con las diferentes neoplasias, para ellos se utilizan criterios en común, como ser, el que exista un pleomorfismo marcado entre la célula y el núcleo, se ve el índice mitótico de la célula, que las áreas de necrosis se vean distribuidas al azar, si existe invasión de células linfáticas, y se analiza también si existen metástasis a nódulos linfáticos de la región (Goldschmidt et al., 2011).

2.7.4.1 Clasificación histopatológica de tumores mamarios

Se han encontrado amplios debates entre autores sobre cómo organizar los distintos tipos tumorales, Goldschmidt junto con colegas suyos, elaboró una clasificación histológica que tiene amplia utilización actualmente, y que fue modificada varias veces con el fin de incorporar subtipos nuevos que han sido encontrados posteriormente, para así, mejorar la clasificación histológica de tumores de mama (Tabla 1),

Se crearon diferentes formas de clasificación para lograr visualizar con mayor claridad los tumores, y el grado de malignidad o no que poseen. la cual, a su vez también se basa en la clasificación elaborada años antes en 1974 y 1999 por la OMS (Goldschmidt et al., 2011).

Recientemente en el año 2017, Rasotto y otros investigadores, basándose en los criterios de la clasificación de Goldschmidt et al., (2011), realizaron un estudio en 229 animales (caninos hembras) que presentaban tumores mamarios, y no solo clasificaron los tumores presentes en estos animales, sino que hicieron un seguimiento completo de los mismos, registrando datos importantes como supervivencia del animal o en caso de muerte del mismo, si la causa de muerte estaba relacionada a el tumor que presentaba.

Con estos datos, pudieron realizar un registro más detallado y completo sobre los distintos procesos tumorales, su grado de invasión, metástasis, malignidad e incluso tiempos de vida estimados (Tabla 2).

En dicha clasificación se confeccionó un resumen de los diferentes pronósticos basados en este trabajo de Rasotto et al. (2017). Lo que se pretende con el mismo es facilitar aún más la clasificación de los tumores mamarios en caninos hembras y brindar de alguna manera medios que faciliten el diagnóstico y pronóstico de estos tumores. De esta manera el veterinario puede informar a los propietarios de mascotas cuál será la posible evolución del tumor.

Los peores pronósticos fueron para el carcinoma adeno escamoso, con un tiempo de vida estimado en 18 meses, el comedocarcinoma con un promedio de 14 meses, seguido de el carcinoma sólido que presento una expectativa de vida de 8 meses. El carcinoma anaplásico y el carcinosarcoma, por otro lado, demostraron ser los más agresivos y malignos, con un pronóstico de vida de solo 3 meses en cada caso (Rasotto et al., 2017).

El tejido de origen de las neoplasias mamarias puede ser tanto el estroma como también el parénquima de la glándula. Es decir que pueden tener un origen epitelial secretorio, originándose de células que revisten conductos, túbulos y alvéolos. También puede estar originado en células de origen mioepitelial y mesenquimatoso (Etcheverría, 2013, Rodríguez et al., 2013). Algunos tumores, además, pueden producir inflamaciones en el lugar donde se encuentran (Ehrhat, 2009). Pueden también originarse en otros tejidos, variando así también el grado de malignidad de estos. Algunos autores sugieren que los tumores mamarios malignos podrían derivar de tumores benignos preexistentes, y a su vez también relacionan el tamaño del tumor con el grado de malignidad (Asqui, 2017). Para poder diferenciar los procesos tumorales se observan las células, sus características conformacionales, mediante la histología, podemos observar el tejido y ver si se trata de células tumorales, y según cuales y/o como estén afectadas vamos diferenciando los diferentes tipos de tumores. Existe de forma normal una hiperplasia y atrofia del tejido mamario, que tiene que ver con la actividad de la glándula, estos procesos afectan de alguna forma a las células que los componen durante estos procesos, por esto, es necesario saber reconocer las células y tejidos en cada situación que atraviesan, para comprender mejor el tejido

mamario al momento de la observación, más que nada para llegar a establecer algún diagnóstico presuntivo (Ehrhat, 2009).

Tabla N° 1. Tumores mamarios caninos según la clasificación histológica propuesta por Goldschmidt et al., 2011 y validada por Rasotto et al., 2017.

Neoplasia Epitelial maligna	Neoplasia Epitelial maligna especial	Neoplasia mesenquimal maligna-sarcoma	Tumor mamario mixto maligno	Neoplasia Benigna	Hiperplasia displasia	Neoplasias del pezón	Hiperplasia displasia del pezón
Carcinoma in situ	Carcinoma de células escamosas	Osteosarcoma	carcinosarcoma	Adenoma simple	Ectasia ductal Hiperplasia lobular	Adenoma	Melanoma
Carcinoma simple	Carcinoma adenoescamoso	Condrosarcoma		Adenoma papilar intraductal	Epiteliosis	Carcinoma	
Carcinoma micropapilar invasivo	Carcinoma mucinoso	Fibrosarcoma		Adenoma ductal	Papilomatosis	Carcinoma con infiltración epidermal	
Carcinoma sólido	Carcinoma secretor (rico en lípidos)	Hemangiosarcoma		Fibro adenoma	Cambio Fibro adenomatoso		
Comedocarcinoma	Carcinoma de células fusiformes	Otros sarcomas		Mioepitelioma	Ginecomastia		
Carcinoma anaplasico	Carcinoma inflamatorio			Adenoma complejo			
Carcinoma complejo adenoma/ tumor mixto				Tumor benigno mixto			
Carcinoma tipo complejo							
Carcinoma y mioepitelioma maligno							
Carcinoma tipo mixto							
Carcinoma ductal							
Carcinoma papilar intraductal							

TABLA N°2 Clasificación histopatológica y su pronóstico en tumores de mama en hembras caninas, según Rasotto et al., 2017.

Buen Pronóstico	Pronóstico Reservado	Mal pronóstico (Tiempo de vida estimado)
Tumor benigno (Adenoma complejo, Adenoma simple)	Carcinoma túbulo papilar simple	Tumor mixto maligno (Carcinosarcoma) (3 meses)
Tumor mixto benigno	Carcinoma papilar intraductal	Carcinoma anaplásico (3 meses)
Carcinoma complejo	Carcinoma	Carcinoma sólido (8 meses)
Carcinoma tubular simple	Mioepitelioma maligno	Comedocarcinoma (14 meses)
		Carcinoma adenoescamoso (18 meses)

2.8 Descripción los tipos más comunes de tumores en glándula mamaria canina (Clasificación de Goldshmidt et al., 2011)

2.8.1 Neoplasia Epitelial maligna

Este tipo de tumores son los que muestran mayor frecuencia de aparición, y se producen en las células epiteliales, son denominados carcinomas, según sea la estructura en la que se encuentren vamos a tenerlos diferenciados, según si se relacionan a túbulos, conductos, o a otros epitelios de la glándula.

Pueden tener mayor o menor malignidad (Goldschmidt et al., 2011). Dentro de ellos, encontramos el carcinoma *in situ* o no infiltrativo, porque la célula tumoral no atraviesa la membrana basal (Herme et al., 2005).

En cuanto al carcinoma simple, que tiene varios subtipos, dónde el tubular es el más común en los caninos, el carcinoma micropapilar invasivo, el carcinoma sólido, comedocarcinoma, carcinoma anaplásico, carcinoma ductal, éstos últimos con un alto grado de malignidad (Rasotto et al., 2017). Otros tipos de carcinomas que entran en esta clasificación son los carcinomas complejos adenoma / tumor mixto, el carcinoma tipo completo, carcinoma y epiteloma maligno, carcinoma tipo mixto y el carcinoma papilar intraductal. Algunos de estos tipos de tumores tuvieron un origen en un tumor benigno previo como lo es el carcinoma ductal, que proviene del adenoma ductal que es un tumor benigno (Goldschmidt et al., 2011).

2.8.2 Neoplasia Epitelial maligna tipo especial

En esta clasificación encontramos el carcinoma de células escamosas, tumor común de animales gerontes, presentan células epiteliales escamosas de gran tamaño, además de queratinizadas, y las células epiteliales muestran también un núcleo y nucléolo grandes (Withrow, 2009). También se clasifican aquí los carcinomas adenoescamoso, carcinoma mucinoso (porque produce mucina), carcinoma rico en lípidos (tiene vacuolas en su citoplasma, es secretor) y carcinoma de células espinosas, mioepitelioma maligno, el cual ingresó hace poco tiempo en esta clasificación, ya que fue clasificado por medio de marcadores de inmunohistoquímica para células epiteliales y células basales/mioepiteliales (Goldschmidt et al., 2011).

2.8.3 Neoplasia mesenquimal maligna

Estas neoplasias tienen su origen en el mesénquima, es decir en el estroma de tejido conectivo, y vamos a encontrar aquí a los sarcomas, vemos en ellos por lo general el citoplasma celular de color azul claro, levemente eosinófilo, sigue el contorno del núcleo que puede ser ovalado y tener forma de punta en los extremos, las células son grandes, variando también la cantidad de nucléolos presentes (Withrow, 2009). Tenemos diferentes tipos de sarcomas, entre ellos el osteosarcoma, que tiene la característica de comenzar siendo una masa de tamaño uniforme que está igual por años, y en poco tiempo se diferencia en células ovoides con formato osteoide, creciendo de forma rápida y maligna en poco tiempo (Goldschmidt et al., 2011), el condrosarcoma, fibrosarcoma, hemangiosarcoma, según sea la estructura implicada.

2.8.4 Tumor mamario mixto maligno

En el caso de este tumor, estamos ante dos tipos de estructuras involucradas, por un lado, las células epiteliales y por otro el tejido conjuntivo, ambos de tipo maligno. Por estar formado por estas dos partes se llama a estos tumores carcinosarcoma (Goldschmidt et al., 2011).

2.8.5 Neoplasia benigna

En esta categoría entran todos los tumores que no muestran malignidad, y que no llevan a la muerte del animal, teniendo pronósticos de expectativa de vida muy altos (Rasotto et al., 2017). Algunos de los tumores que se clasifican aquí son por ejemplo el adenoma simple, el adenoma papilar intraductal, por ejemplo, en este caso vemos células superficiales de tipo epitelial en una sola capa, con núcleo ovalado de coloración normal, con citoplasma eosinófilo. Debajo de esta capa de epitelio se ven las células mioepiteliales características. Las mitosis son raras de que ocurran. Luego tenemos también el adenoma ductal, el fibroadenoma, el mioepitelioma, el adenoma complejo, y el tumor benigno mixto (Goldschmidt et al., 2011).

2.8.6 Hiperplasia

En este tipo de clasificación se muestra una marcada proliferación en varias estructuras de la glándula, pueden ser en los lóbulos (hiperplasia lobular) o en las células epiteliales de los conductos (epiteliosis), entre otras estructuras como fibroblastos (cambio fibroadenomatoso), pero sin tener relación con malignidad (Goldschmidt et al., 2011).

La hiperplasia no está considerada en la clasificación como una neoplasia maligna, pero puede indicar el comienzo para el desarrollo de estas. Los papilomas y la ectasia ductal también entran dentro de esta categoría.

2.9 Proteínas de shock térmico (HSPs)

Está demostrado que las proteínas de shock térmico (HSPs) existen en todos los organismos, tanto en procariotas como en humanos y todos los organismos eucariotas que conocemos (Dubey et al., 2015). Las células, están expuestas a muchos cambios en el medio que las rodea, como por ejemplo a factores que pueden alterar su conformación u homeostasis. Es por esta razón que activan genes que sintetizan proteínas como las de shock térmico, capaces de proteger la integridad celular (Cortés et al., 2008), por esto su rol es esencial en las células.

En el año 1962, Ferrucci Ritossa, investigador italiano, observó que exposiciones a altas temperaturas inducían a una elevada actividad transcripcional, con formación de nuevas proteínas, en ese caso, fue en larvas de la mosca *Drosophila melanogaster*. Sin embargo, años más tarde, en 1974 esas proteínas fueron identificadas y se nombraron como proteínas inducidas por estrés térmico, aunque se sabe que también son inducidas por otros estímulos como los factores de crecimiento, infecciones virales, el estrés oxidativo, la inflamación y la infección (Vallespí, 2008).

Las HSPs forman diferentes familias que son nombradas según su peso molecular, (Vallespí, 2008) su estructura y función (Vallespí, 2008, Dubey et al., 2015). Se clasifican por ejemplo en HSP15-30, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 y HSP100 (Badowska-Kozakiewicz y Malicka, 2012).

Éstas proteínas de shock térmico se encuentran en las células de forma fisiológica, tienen funciones específicas según la HSP involucrada, pero en general funcionan como reguladoras del plegamiento de proteínas (Figura 3a), en el transporte intracelular de las mismas, tanto por el citoplasma como por el retículo endoplásmico y las mitocondrias de la célula; reparando o degradando las proteínas defectuosas (Dubey et al., 2015).

El objetivo y función de las HSPs es reestablecer el equilibrio en la célula, y luego de una agresión térmica responden ayudando a las proteínas que fueron dañadas consecuencia de esa agresión celular (Mosser y Morimoto, 2004). Por lo tanto, la acción de estas proteínas se resume en proteger a la célula a fin de evitar la muerte celular o apoptosis.

2.9.1 Rol de las proteínas de shock térmico en tumores

Cuando estamos frente a una célula tumoral, es decir, que tiene como característica propia evitar la apoptosis para sobrevivir, además de aumentar la proliferación, las proteínas mutantes mal plegadas y las oncoproteínas (Calderwood y Gong, 2012).

Entre otras particularidades de todos los procesos tumorales, la acción de estas HSPs está sobreexpresada, favoreciendo así el proceso de carcinogénesis (Zagouri et al., 2012). Muchos autores a raíz de éstas características relacionan las HSPs directamente con la proliferación y diferenciación neoplásica (Coronato et al., 2002).

2.9.2 Gen de HSP90B1

El gen que codifica para la proteína de shock térmico HSP90 B1 (Símbolo VGNC; Acc: VGNC: 54212], está ubicado para *Canis lupus familiaris* en el cromosoma 15: 42, 456,790-42,474,117 hebra delantera (CanFam3.1: CM000015.3).

Este gen posee 1 transcrito (variante de empalme), 217 ortólogos, 3 parálogos ("Gene: HSP90B1 (ENSCAFG00000007427) - Ensembl protein families - *Canis lupus familiaris* - Ensembl genome browser 96")

2.9.3 Estructura y función de la proteína HSP90

La proteína de shock térmico 90 forma un homodímero, donde encontramos subunidades alargadas que poseen tres dominios flexibles, N-terminal, C-terminal y un dominio medio entre ellos (Figura 3 b).

Las funciones de cada dominio son unir e hidrolizar el ATP, mediar la dimerización y el dominio medio colabora con esta hidrólisis, y con la unión del sustrato (Saibil, 2013). Al ser flexible el dímero de HSP90 adopta distintas formas por ejemplo abierta o cerrada, pero la que más predomina es su forma abierta en forma de V (Jing et al., 2012). Las isoformas de HSP90 que se conocen actualmente y son reconocidas por su localización en la célula son la Grp94, la HSP90N, la TRAP1, HSP90alfa y HSP90beta. Éstas dos últimas son las que se encuentran en el citoplasma celular y corresponden al 80% de la subfamilia (Camacho y Vasconcellos, 2016).

La HSP90 tiene funciones variadas e importantes en la célula, como lo es su unión a polipéptidos no nativos y evitando su agregación, asistir a otras proteínas o en el plegado de las mismas, en el caso de los receptores de estrógenos, colabora para que el esteroide sea cargado de forma eficiente (Saibil, 2013).

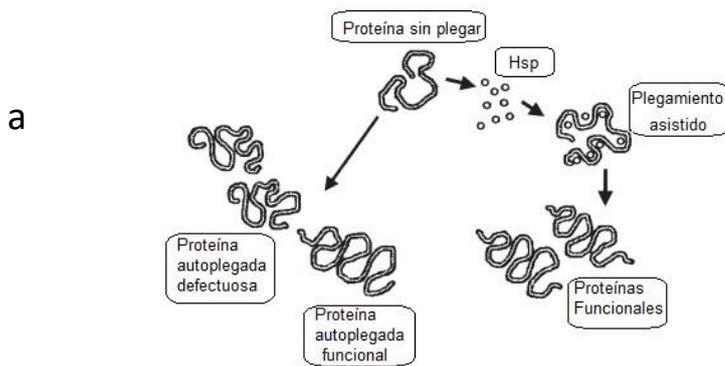


Fig. 1.-- Plegamiento proteico asistido por Hsp

Plegamiento proteico asistido por Hsp

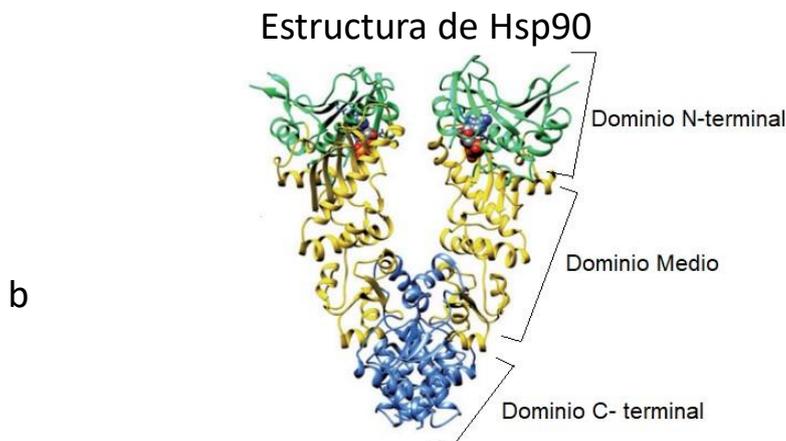


Figura 3. Plegamiento de proteína cliente asistido por proteínas de shock térmico y estructura de Hsp90 a) Función de las Hsps como chaperonas en el plegamiento asistido a otras proteínas, a quienes vuelven funcionales (flecha a la derecha). Se observa también una proteína que no ha sido asistida y mediante el autoplegado logra ser funcional o puede quedar defectuosa (Flecha a la izquierda), (modificado de Coronato et al., 1999). b) Estructura de proteína de shock térmico 90 (Hsp90) constituida por sus tres dominios, un N-terminal, el dominio medio y el dominio C-terminal. Se observa la forma de dímero flexible, y en este caso semicerrado conteniendo molécula de ADP en el dominio N-terminal, Adaptado de Saibil (2013).

2.9.4 Proteína de shock térmico 90 en condiciones normales

HSP90 en eucariotas tiene una localización intracelular como extracelular en otros tipos de células, cuando está en la célula la vemos en mayor medida en el citoplasma de la misma, y también a nivel nuclear pero mostrando ser una pequeña fracción en condiciones fisiológicas (Camacho y Vasconcellos, 2016). Se diferencia de otras chaperonas porque la HSP90 actúa junto con un gran número de co-chaperonas o cofactores que activan y facilitan la maduración de un conjunto de proteínas cliente, las que, a su vez, están implicadas en importantes vías celulares. La HSP90, entonces, influye en los procesos fisiológicos, como el transporte intracelular, la degradación de proteínas, transducción de señales (Li y Buchner, 2012). La HSP90 amortigua mutaciones que ocurren en el proceso morfológico normal, lo que es de gran importancia en el proceso evolutivo (Röhl et al., 2013).

2.9.5 Proteína de shock térmico 90 en condiciones patológicas

Además de encontrarse de forma constitutiva, en el momento que la célula se enfrenta a situaciones de estrés, estas proteínas, HSP90 aumentan notablemente su expresión (Badowska-Kozakiewicz y Malicka, 2012). El factor de transcripción HSF1 que se encuentra normalmente en el citoplasma de la célula unido a las HSP90 y HSP70, al producirse una situación de estrés celular, como exposición a altas temperaturas, HSF1 se disocia de estas proteínas (HSP70 y HSP90) e ingresa al núcleo uniéndose a secuencias específicas de elementos de choque térmico para activar la transcripción de genes promotores de más HSP90, entre otras, con el fin de lograr la protección de la célula (Chatterjee, 2017). Se actúa directamente en la supervivencia celular durante la hipertermia, inhibiendo de la muerte celular programada y la senescencia celular (Figura 4). Con esta acción anti-apoptótica que realizan colaboran con los procesos neoplásicos si la célula afectada es una célula tumoral (Coronato et al., 1999). En humanos se estudió mucho la expresión de la proteína de choque térmico 27 entre otras, en cáncer de mama de mujeres (Ciocca et al., 2012).

En caninos, Badowska-Kozakiewicz y Malicka en 2012 estudiaron las proteínas HSP90 y HSP70 en tumores mamarios caninos, y vieron que las mismas mostraban mayor expresión cuando los tumores eran más malignos, correlacionado esto con la actividad proliferativa, por lo que implicaron a la HSP90 en la carcinogénesis de la glándula mamaria canina, de igual manera a lo demostrado por Romanucci et al. (2006). Se destaca en estos trabajos la necesidad de generar mayor información clínica y más estudios similares para asociar esta proteína HSP90 como posible factor pronóstico (Badowska-Kozakiewicz y Malicka, 2012).

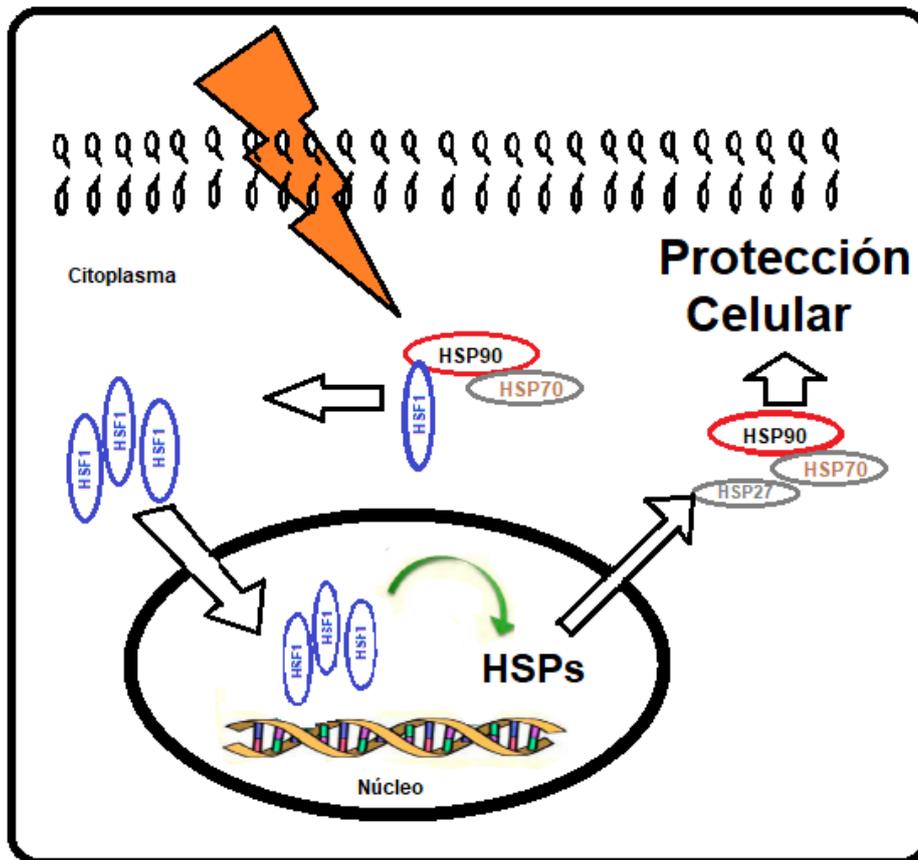


Figura 4 - Respuesta celular ante situación de estrés. Como respuesta celular ante una situación de estrés de variada índole, por ejemplo, altas temperaturas, el factor de transcripción HSF1 que se encuentra normalmente en el citoplasma de la célula unido a las HSP90 y HSP70, se disocia de ellas e ingresa al núcleo uniéndose a secuencias específicas de elementos de choque térmico para activar la transcripción de genes promotores de más HSP90, entre otras, con el fin de lograr la protección de la célula (Modificado de Chatterjee, 2017).

2.10 Tratamientos anti-tumorales

2.10.1 Tratamientos utilizados en caninos

En el caso de los caninos, el tratamiento de elección para neoplasias mamarias es la cirugía, con excepciones como por ejemplo que exista presencia de metástasis, o en carcinoma inflamatorio o en caso de que el animal se encuentre con un estado general muy grave. La técnica más frecuente en cirugía es la mastectomía en bloque, radical, uni o bilateral, y la nodulectomía. En caso de tratamientos oncológicos, se administran drogas quimioterápicas en casos de metástasis establecidas, tumores primarios infiltrados o como adyuvante o neoadyuvante a la cirugía (Herms et al., 2002).

2.10.2 HSP90 como tratamiento contra el cáncer en humanos

La inmunexpresión de HSPs es utilizada como marcador tumoral, incluso en el tratamiento contra neoplasias en humanos, para evaluar la respuesta del paciente a la terapia, teniendo en cuenta que la sobreexpresión de estas proteínas indica un mal pronóstico y posible mala respuesta a la terapia habitual contra el cáncer (Ciocca et al., 2013). Se ha probado que hay un vínculo entre la reactividad a las HSPs y la patogénesis de las enfermedades o el rechazo a los trasplantes de órganos (Vallespí, 2008). Se desarrollaron inhibidores sintéticos de HSP90, la geldanamicina fue el primero de ellos, su acción es unirse al sitio de enlace de ATP en el dominio N de HSP90 y evita así el cambio conformacional, pero no pudo ser utilizado por tener baja solubilidad y alta toxicidad. Igualmente se realizaron derivados como el 17-AAG que es más hidrófilo y demostró funcionar con éxito en estudios realizados. Además de éstos hay otros medicamentos más que están siendo probados y evaluados (Li y Buchner, 2012). Lo más criticado en la utilización de estos tratamientos, es el que se inhibiera por completo la actividad de las HSP90 en la célula, que como dijimos tiene importante relación a las funciones celulares, pero se vio clínicamente en un estudio realizado con dos inhibidores de la HSP90, el 17-alilamino y 17-demetoxigeldanamicina (17AAG) y se demostró que esta droga puede ser administrada a pacientes con una baja toxicidad y además se detectó alteraciones en los niveles de las proteínas clientes de esta chaperona después del régimen terapéutico, lo que indica la funcionalidad esperada. Los inhibidores cumplieron el objetivo sin producir una total desaparición de la función de las proteínas (Vallespí, 2008).

Por todo lo anteriormente expuesto es que se considera a la HSP90 como una de las proteínas clave en los procesos tumorales. En perras, el estudio de la caracterización en los diferentes tipos tumorales permitirá comprender la dinámica tumoral en la glándula mamaria para poder planificar estrategias anti proteínas HSP90 a futuro.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Caracterizar la inmunoexpresión de la proteína HSP90 en tumores de glándula mamaria de perras derivadas a mastectomía en el Centro Hospital Veterinario.

3.2 Objetivos específicos

- Analizar la casuística de tumores mamarios según la edad, raza, estatus hormonal, ocurrencia del tumor e histopatología.
- Cuantificar la inmunoexpresión de la proteína de shock térmico HSP90 en tumores de glándula mamaria de perras.
- Determinar si existe efecto de los factores estatus hormonal y ocurrencia del tumor sobre la inmunoexpresión de HSP90.

4 HIPÓTESIS

La proteína de shock térmico HSP90 se sobreexpresa en tumores mamarios de hembras caninas enteras en comparación con hembras castradas, y en primarios en comparación con secundarios.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Animales y diseño experimental

Animales y muestreos

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay (número de expediente: 111130-000855-14). Se obtuvieron tumores de mama (n=28) a partir de hembras caninas que fueron derivadas a cirugía para realizarse mastectomía, en el Centro Hospital Veterinario de la Facultad de Veterinaria-UdelaR.

5.2 Análisis de fichas clínicas

Se obtuvieron los siguientes datos a partir de las fichas clínicas de cada animal.

1) Edad (años)	n por grupo
i. Adulta Joven (2 a 5)	5
ii. Adulta (6 a 10)	15
iii. Anciana (11 a 16)	8
2) Estatus hormonal	
i. Sin ovariectomía	18
ii. Con ovariectomía	10
3) Ocurrencia del tumor	
i. Tumor primario	17
ii. Tumor secundario	11
4) Raza	
Cruza	9
Caniche	4
Cocker spaniel	4
Pitbull	2
Ovejero alemán	2
Golden Retriever	2
Labrador	2
Mastín Napolitano	1
Rotweiler	1
Dóberman	1
5) Histopatología	
Carcinomas	25
Sarcomas	2
Hiperplasia de células mioepiteliales	1

Dado que en la ficha clínica no se encontraban los diagnósticos histopatológicos en todos los casos, se realizó el estudio posterior por los Drs. Verdes y Cruz en el Área de Patología a partir de los cortes realizados y coloreados en el presente estudio.

5.3 Obtención de muestras y procesamiento histológico

Cada muestra de tumor de mama obtenida fue recolectada al momento de finalizar la cirugía correspondiente, en el block quirúrgico del Centro Hospital Veterinario, en el mismo se procedió a fotografiar las muestras con calibre para registrar el tamaño estimado del tumor. Luego se realizó un lavado de la muestra para quitar excesos de sangre y se limpió de tejido adiposo y piel circundante. Se extrajo una muestra del tumor que fue guardada en condiciones apropiadas para su almacenamiento en freezer a una temperatura de -80°C , para estudios posteriores.

La muestra se seccionó en trozos de 0,5 a 1 cm^3 . Se hicieron dos lavados en solución de buffer fosfato salino (PBS, pH 7,4) y finalmente se fijó la muestra por inmersión en formaldehído bufferado durante 24 horas.

Todos los procedimientos histológicos se llevaron a cabo en el laboratorio del Área de Histología y Embriología, en la Facultad de Veterinaria. Las muestras obtenidas fueron colocadas en cassetes de inclusión rotulados con el número de ficha del animal, se deshidrataron sumergiéndolas en concentraciones crecientes de etanol (70° , 95° y 100°), seguido de inmersión en cloroformo por 24 horas. Posteriormente se realizaron tres pasajes sucesivos por parafina líquida 30 minutos cada una, para finalizar con la inclusión y confección de un bloque de parafina con la muestra (Tissue-Tek VIP Processing Embedding Medium, Sakura Finetek U.S.A., INC).

5.4 Microtomía

Los bloques de parafina se cortaron con micrótopo, con un espesor de $5\mu\text{m}$ (Leica Reichert Jung Biocut 2030, Wetzlar, Germany). Los cortes se colocaron en un baño de agua corriente a 37°C de temperatura y se levantaron en láminas portaobjetos, 10 láminas por muestra, las que fueron previamente rotuladas con el número de ficha correspondiente. Se procedió a secar las láminas en estufa para evitar el desprendimiento de la muestra durante los siguientes procedimientos. Se obtuvieron láminas para realizar la coloración de Hematoxilina- Eosina para la clasificación histopatológica y también para la técnica de inmunohistoquímica, donde determinamos la expresión de HSP90.

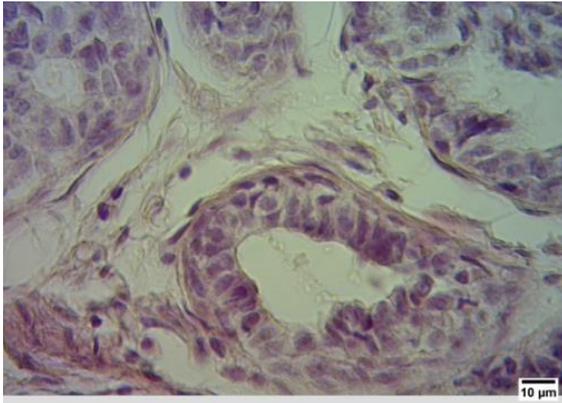
5.5 Coloración de Hematoxilina-Eosina

La técnica de hematoxilina-eosina se utilizó para la determinación de la clasificación histopatológica del tumor según las alteraciones. Las láminas portaobjeto con las muestras de tumores fueron colocadas en cestillos y sumergidas en xilol, luego en concentraciones decrecientes de etanol (100° , 95° y 70°) hasta el pasaje por agua destilada. Se realizó la coloración con Hematoxilina de Mayer por 6 minutos y el virado en agua corriente por 6 minutos. A continuación, se coloreó con Eosina por 1 minuto y se deshidrató en concentraciones crecientes de etanol (70° , 95° y 100°). Por último, se sumergieron en xilol para realizar su montaje con Entellan™ colocándole el cubreobjeto a cada una.

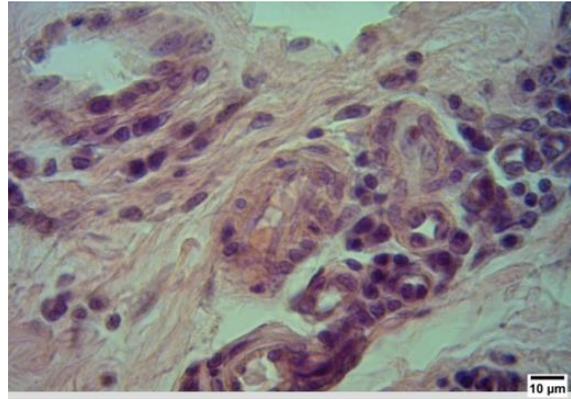
5.6 Clasificación histopatológica

Estas láminas fueron enviadas al Área Patología de la Facultad de Veterinaria, para ser diagnosticadas. A partir de los preparados obtenidos se llevó a cabo la categorización histopatológica de los mismos según la clasificación internacional de tumores de animales domésticos.

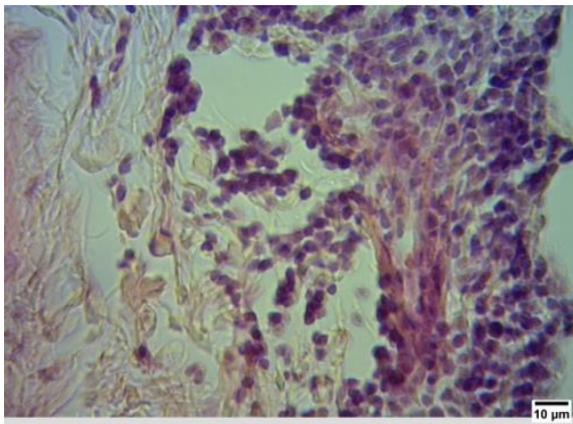
Las muestras teñidas con hematoxilina-eosina fueron observadas y analizadas bajo microscopio óptico. Se describió la morfología, ubicación, tipología celular y características de la diferenciación tumoral, caracterizando la presencia de conductos, células mioepiteliales, secreción y proliferación de células de origen mesenquimatoso o epitelial (Figura 5 y 6).



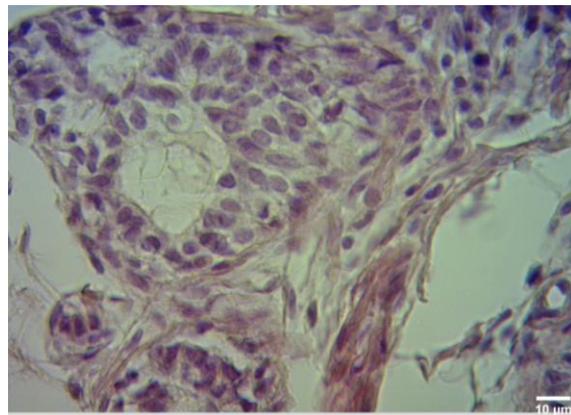
a)-Carcinoma mamario Cruza-Anciana. sin ovariectomía



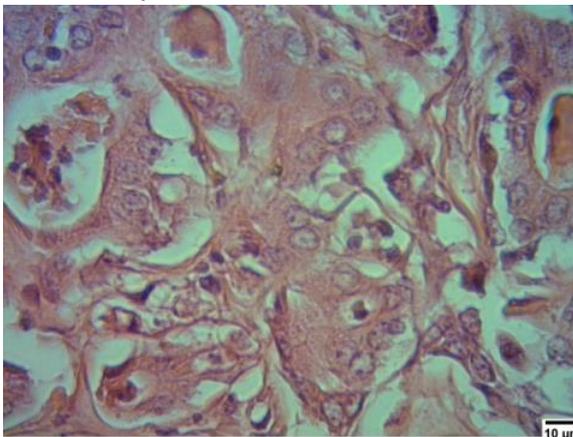
b) Adenocarcinoma Pitbull –Anciana con ovariectomía



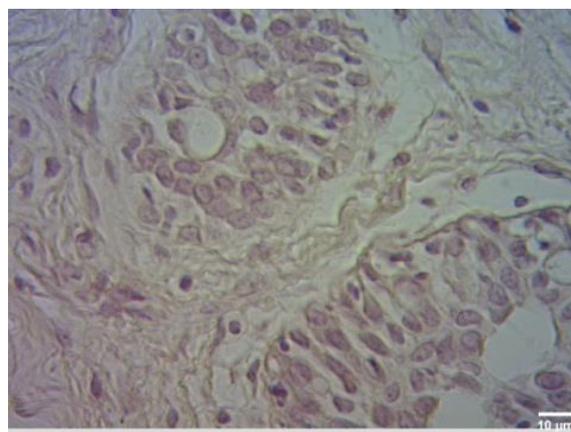
c) Carcinoma mamario sólido Rottweiler-joven -con ovariectomía



d) Carcinoma mamario Cruza- Anciana- Sin ovariectomía

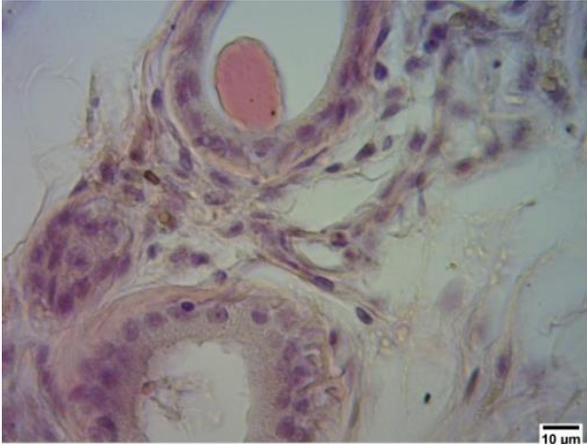


e) Carcinoma mamario túbulo acinar Pitbull- adulta -con ovariectomía

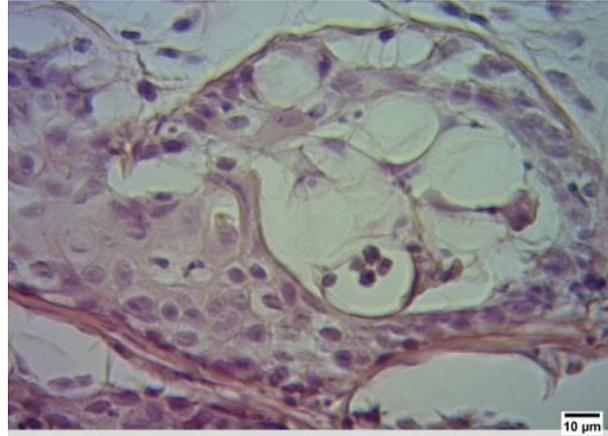


f) Carcinoma mamario túbulo papilar Cruza -adulta -sin ovariectomía

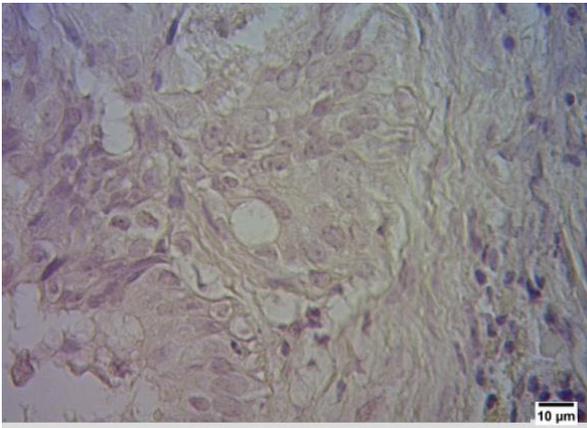
Figura 5- Imágenes histológicas con tinción de Hematoxilina- Eosina representativa de tumores de glándula mamaria en perras ingresadas al Centro Hospital de Facultad de Veterinaria durante los años 2014 a 2018. Se describe en a, b, c, d, e, f el tipo de tumor presente, la raza del animal, su edad de acuerdo a categorías adultas jóvenes (de 2 a 5 años), adultas (de 6 a 10 años) ancianas (de 11 a 16 años) y por último el estatus hormonal, si esta con ovariectomía o sin ovariectomía.



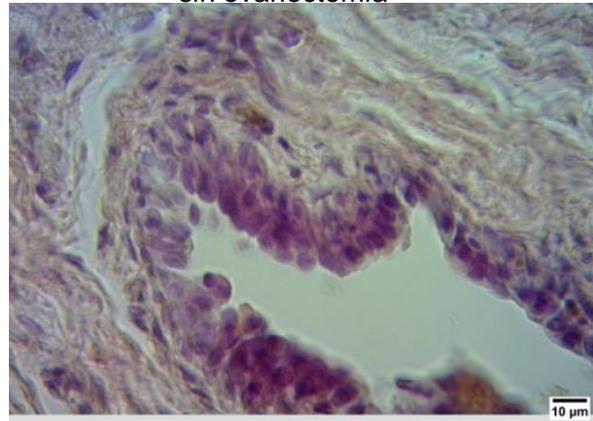
g) Hiperplasia células mioepiteliales
Caniche- adulta-sin ovariectomía



h) Tumor mixto- Caniche-adulta
sin ovariectomía



i) Sarcoma
Cruza-joven- con ovariectomía



j) Carcinoma ductal maligno Cruza-
adulta-sin ovariectomía

Figura 6- Imágenes histológicas con tinción de Hematoxilina- Eosina representativa de tumores de glándula mamaria en perras ingresadas al Centro Hospital de Facultad de Veterinaria durante los años 2014 a 2018. Se describe a cada imagen g, h, i, j, el tipo de tumor presente, la raza del animal, su edad de acuerdo a categorías adultas jóvenes (de 2 a 5 años), adultas (de 6 a 10 años) ancianas (de 11 a 16 años) y por ultimo el estatus hormonal si esta con ovariectomía (castrada) o sin ovariectomía (entera).

5.7 Técnica de inmunohistoquímica

Antes de comenzar la técnica de inmunohistoquímica se realizó la preparación de soluciones buffer a utilizar, siendo éstas, Buffer fosfato salino pH 7,4 (PBS) y Buffer citrato de sodio 0,1 M, pH 8. Se realizó además previamente la dilución del anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-HSP-90 (mouse monoclonal 37-9400 Invitrogen) con una concentración final de 1:100.

Para la realización de la técnica de inmunohistoquímica se colocaron las láminas portaobjetos con los cortes de tumor en estufa a 60°C por media hora, luego se desparafinaron en xilol por 30 minutos más. A continuación, se sumergieron en concentraciones decrecientes de etanol por 2 minutos cada uno (100°, 95°, 70°). Para la recuperación antigénica se utilizó calor en microondas sumergiendo los preparados en una solución de buffer citrato 0,01M pH 8 (200 ml) más 5 ml de Tween 20 (AppliChem, España), durante 2 minutos a potencia máxima de microondas (Hi 100%). Posteriormente se inactivaron las peroxidasas endógenas mediante solución de peróxido de hidrógeno al 3% (H₂O₂) por 20 minutos. Luego se incubó con el anticuerpo primario de ratón anti-HSP-90 (mouse monoclonal 37-9400 Invitrogen) en una dilución de uso 1:100 por 18 horas a 4°C en cámara húmeda. Al día siguiente se lavaron las muestras sumergiéndolas en solución buffer PBS, dos pasajes de 5 minutos cada uno. Luego se incubó con anticuerpo secundario biotinilado anti-mouse por 30 minutos, se repiten dos lavados en PBS por 5 minutos, y se colocó el complejo enzimático estreptavidina-peroxidasa durante 30 minutos cada uno (kit mouse HRP/DAB, ab 64259 Abcam, USA). Luego se reveló con solución de cromógeno de Diaminobenzidina (DAB + peróxido de hidrógeno) por 90 segundos (kit mouse HRP/DAB, ab 64259 Abcam, USA). La reacción de color marrón se observó a simple vista y se corroboró mediante microscopio óptico, cortando la reacción con agua corriente. Posteriormente se procedió a la contra coloración nuclear con el colorante Hematoxilina de Harris durante un minuto con virado en agua corriente. Para finalizar, se sumergieron las láminas en concentraciones crecientes de etanol (70°, 95°, 100°A, 100°B) y luego se realizaron dos pasajes por xilol de 5 minutos cada uno. El montaje se efectuó con medio de montaje Entellan™ (MERCK, Germany) para colocación de cubre objeto.

Para chequear la especificidad del anticuerpo se utilizó un control negativo en cada inmunohistoquímica realizada, utilizando un preparado de tumor mamario al que no se colocó anticuerpo primario, sino que fue sustituido por PBS.

5.8 Captura de imágenes de preparaciones de inmunohistoquímica

Las imágenes digitales se obtuvieron un software de captura (DinoCapture 2,0 software, AnMo Electronics Corporation, Taiwan) a través de una cámara digital (Dino-Eyepiece, AM-423X, AnMo Electronics Corporation, Taiwan) conectada a un microscopio (trinocular Premiere Profesional, modelo MRP-5000, Manassas, EE.UU.). Se capturaron un promedio de 30 fotos por lámina (muestra de tumor) a mayor aumento (40x) y 5 fotos por lámina (muestra de tumor) a menor aumento (4x).

5.9 Análisis descriptivo de la inmunolocalización de la proteína HSP90

Se analizó la localización de la proteína HSP90 mediante la observación de la coloración marrón en epitelios glandulares y de conductos, así como en el estroma de las muestras de tumor mamario.

5.10 Análisis de imágenes de inmunohistoquímica

Se determinó el área inmunomarcada (áreas coloreadas de marrón o positivas al DAB) de HSP90 en todas las imágenes de tumores. Se realizó mediante la realización de una macro en el programa ImageJ (ImageJ 1.52g, Wayne Rasband open Source, National Institutes of Health, EEUU, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>)

Las imágenes fueron previamente calibradas umbralizadas segmentadas, binarizadas. El archivo de la macro es un archivo que guarda el registro de cada paso realizado para lograr calcular el porcentaje de área inmunomarcada de cada foto con los mismos parámetros. Dicha macro se repite en todas las imágenes dentro de una misma carpeta mediante un proceso denominado "batch".

5.11 Análisis estadístico

Se analizó la variable continua área inmunomarcada de HSP90 (%) en los tumores mamarios. Para el análisis de la varianza se utilizó PROC MIXED de SAS para Windows (v9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, EEUU) o modelo general lineal (GLM), donde se observaron los efectos de los factores que mencionaremos a continuación y las interacciones entre ellos. Todos los resultados fueron expresados como media \pm error estándar de la media (EEM) y se estableció un nivel de significación de $p < 0,05$. Nuestro objetivo fue determinar el efecto la inmunoexpresión de la HSP90 según los factores edad, raza, estatus hormonal, ocurrencia del tumor, histopatología.

Sin embargo, dado el número de individuos (n) por grupo solo se realizó la comparación de medias teniendo en cuenta los siguientes factores: edad, estatus hormonal y ocurrencia del tumor. Se hicieron análisis *post hoc* analizando las interacciones entre los factores analizados estatus hormonal y ocurrencia del tumor. Cuando el número de unidades experimentales por grupo (n) fue entre 1 a 3 solo fue realizada la estadística descriptiva. Esto sucedió para los factores raza e histopatología.

6 RESULTADOS

6.1 Análisis de casuística de tumores mamarios en perras

Se analizó la casuística de los tumores mamarios de hembras caninas obtenidos durante el período estudiado, luego describimos los resultados correspondientes a la inmunoexpresión en dichos tumores con sus respectivas variables.

Reiteramos que si bien uno de los objetivos iniciales fue determinar la inmunoexpresión de HSP90 según las variables mencionadas anteriormente (edad, raza, estatus hormonal, ocurrencia del tumor, histopatología) en los tumores de mama en perras sometidas a cirugía, para realizar estudios estadísticos de todas las variables y evaluar el efecto de los factores analizados sobre la variable área inmunomarcada de HSP90 se requiere aumentar el n de las muestras.

Por lo tanto, fue considerado el realizar una estadística descriptiva de los datos raza e histopatología.

6.1.1. Casuística según edad

El mayor porcentaje de la población estudiada fueron perras adultas de 6 a 10 años (n= 15), le siguieron las perras ancianas de 11 a 16 años (n=8) y el menor porcentaje fueron las perras adultas jóvenes de 2 a 5 años (n=5) (Figura 7 a).

6.1.2 Casuística según raza

La mayor proporción de hembras caninas ingresadas con tumores mamarios correspondió a hembras de raza cruzada (n=9), seguido por hembras de raza Caniche (n=4) y raza Cocker Spaniel (n=4) (Figura 7 b).

6.1.3 Casuística según estatus hormonal

La mayor proporción de las hembras caninas ingresadas con diagnóstico de tumor de mama correspondió a hembras sin ovariectomía (n=18) (Figura 8 a).

6.1.4 Casuística según ocurrencia del tumor

En los tumores de mama de las hembras caninas estudiadas, vimos que se presentaron un mayor porcentaje de hembras con tumores mamarios primarios, es decir, que concurrían por primera vez presentando un tumor, con respecto a los tumores mamarios secundarios, en los cuales consideramos las recaídas o tumores en otras mamas (Figura 8 b).

6.1.5 Casuística según histopatología

El mayor porcentaje de los tumores mamarios en hembras caninas correspondió a carcinomas, según el diagnóstico tumoral realizado en Facultad de Veterinaria (por histopatología, Tabla 3) (Figura 9).

En los siguientes gráficos se representan los datos obtenidos en la casuística de los tumores, para poder luego determinar de acuerdo al n por grupo con qué grupo de factores podríamos realizar y determinar los efectos sobre la variable área inmunomarcada del factor HSP90.

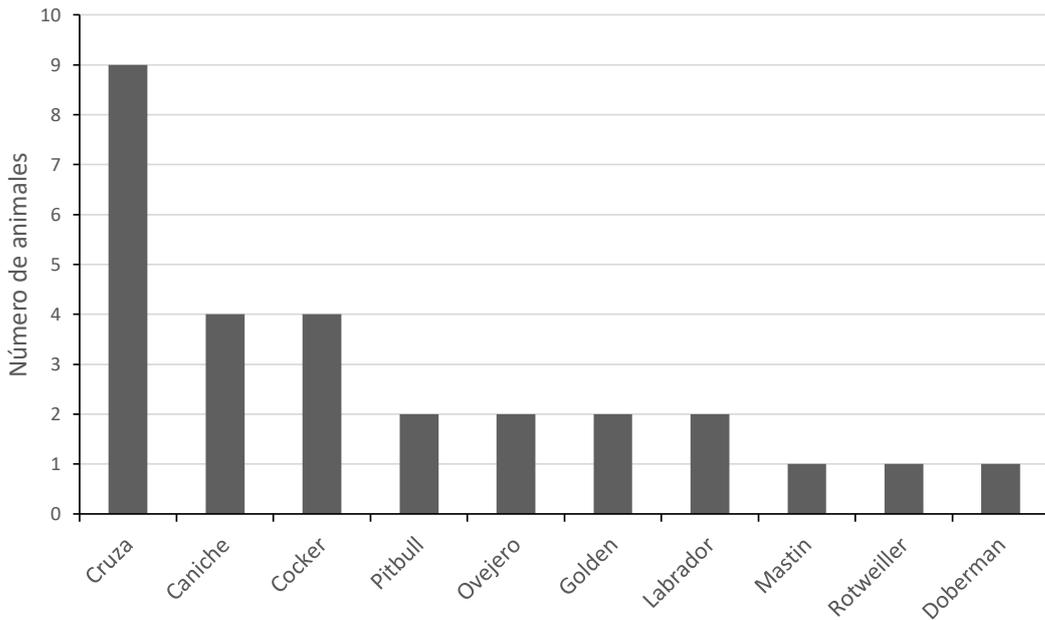
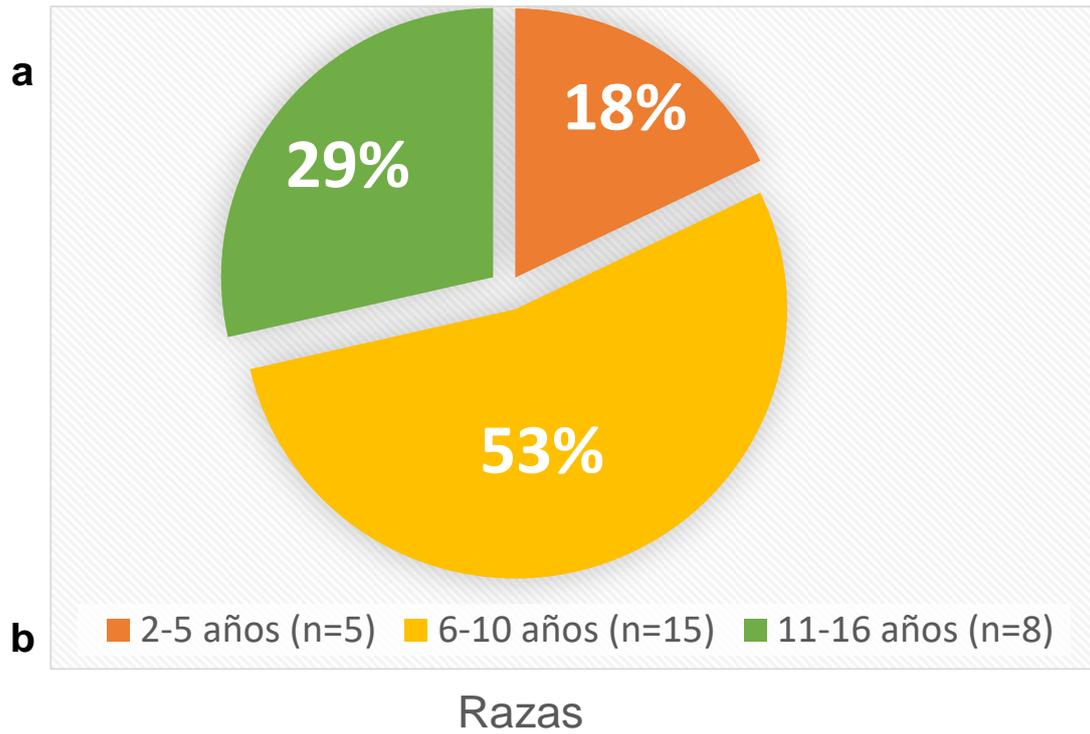
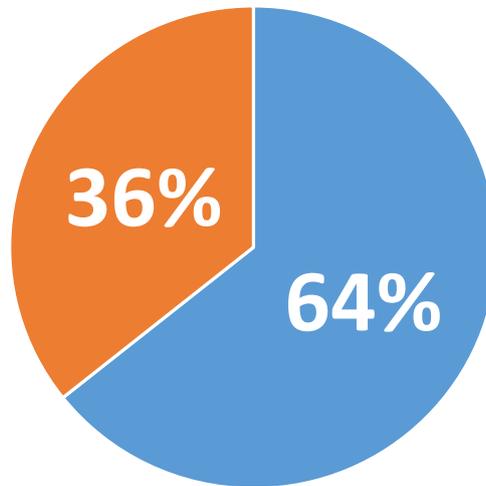


Figura 7. Casuística de tumor de glándula mamaria de hembras caninas ingresadas en Centro Hospital de Facultad de Veterinaria (2014 – 2018) según edad y raza.

a) Según edad perra adulta de 2 a 5 años (n=5), adulta de 6 a 10 años (n=15), de más de 11 años (n=8). b) Según raza.

a

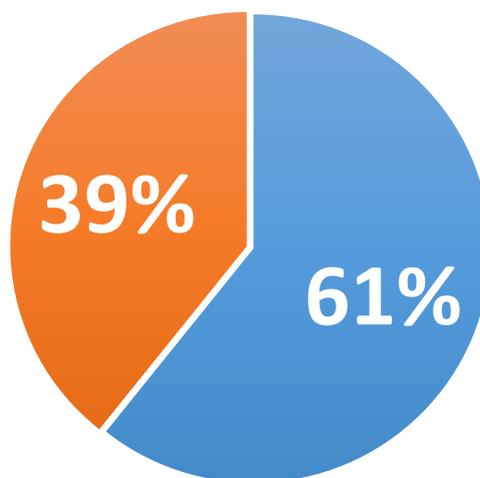
Estatus Hormonal



■ Sin ovariectomía (n=10) ■ Con ovariectomía (n=18)

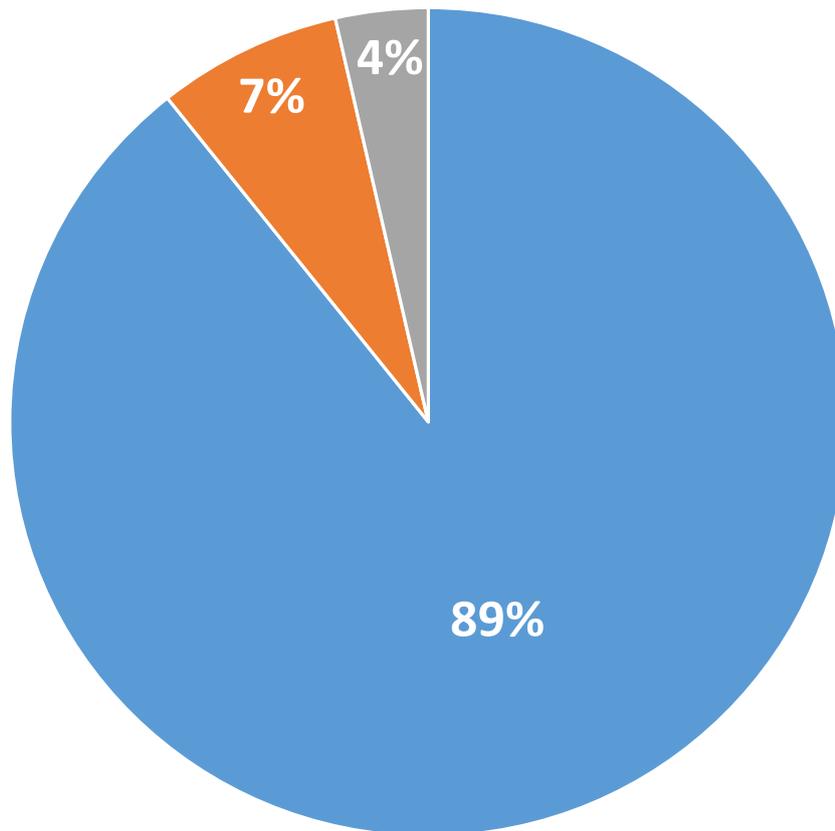
b

Ocurrencia del tumor



■ Tumor primario (n=17) ■ Tumor secundario (n=11)

Figura 8. Casuística de tumor de glándula mamaria de hembras caninas ingresadas en Centro Hospital de Facultad de Veterinaria (2014 – 2018). C) Según estatus hormonal: con ovariectomía (n=18) / sin ovariectomía (n=10). D) Según ocurrencia del tumor: primario (n=17) / secundario (n=11).



■ Carcinoma ■ Sarcoma ■ Hiperplasia células mioepiteliales

Figura 9. Casuística de tumor de glándula mamaria de hembras caninas ingresadas en Centro Hospital de Facultad de Veterinaria (2014 – 2018). Casuística según diagnóstico histopatológico: Carcinomas (n=25), Sarcoma (n=2), Hiperplasia de células mioepiteliales (n=1).

Tabla N°3. Resumen de datos histopatológicos de muestras de tumor mamario utilizadas. Detalle del número de animales por grupo de tumor (n) según clasificación histopatológica.

Tabla N° 3. Datos Histopatológicos de muestras de tumor mamario recolectadas, realizados en el área de Histopatología, con la cantidad de animales (n) correspondientes según clasificación.

Número de caso	Diagnóstico histopatológico	Histopatología	n
1	Carcinoma		
2	Carcinoma mamario tubular – acinar		
3	Carcinoma mamario tubulopapilar		
4	Comedocarcinoma mamario		
5	Adenocarcinoma		
6	Adenocarcinoma		
7	Carcinoma		
8	Carcinoma		
9	Carcinoma		
10	Carcinoma	Carcinomas	25
11	Carcinoma		
12	Carcinoma		
13	Carcinoma ductal infiltrante		
14	Carcinoma ductal infiltrante		
15	Carcinoma mamario		
16	Carcinoma mamario císticopapilar		
17	Carcinoma mamario ductal		
18	Carcinoma mamario simple		
19	Carcinoma mamario sólido		
20	Carcinoma quístico		
21	Carcinoma espino celular		
22	Tumor inflamatorio		
23	Tumor inflamatorio		
24	Tumor mixto		
25	Tumor mixto		
26	Sarcoma	Sarcomas	2
27	Fibrosarcoma		
28	Hiperplasia de células mioepiteliales	Hiperplasia	1
			Total 28

6.2 Resultado descriptivo de la inmunolocalización de la proteína HSP90 en tumores mamarios de hembras caninas

Todos los tumores evidenciaron inmunopositividad contra HSP90, mostrando la coloración marrón en el sitio de localización de la proteína (Figura 10 y 11).

6.2.1 Localización de la proteína HSP90 en células de epitelios glandulares

La proteína HSP90 se localizó en el citoplasma de células epiteliales que tapizaron conductos y estructuras túbulo-alveolares (Figura 10 b). En células epiteliales se observó en el citoplasma supranuclear cuando se detectó presencia de secreción intraalveolar (Figura 10 a).

6.2.2 Localización HSP90 en células epiteliales de conductos

La proteína HSP90 se mostró con una intensa inmunomarcación en citoplasma de células epiteliales de conductos (Figura 11 b), y se observó una leve inmunomarcación en el núcleo de algunas células (Figura 11 c).

6.2.3 Localización de la proteína HSP90 en células del estroma conjuntivo

La proteína HSP90 mostró una moderada inmunomarcación en citoplasma de células del tejido conjuntivo, como son los fibroblastos (Figura 11 d). Asimismo, la inmunoexpresión se determinó en citoplasma y núcleo de células conjuntivas mesenquimales (Figura 10 d).

6.2.4 Localización extracelular de la proteína de shock HSP90

Encontramos inmunoexpresión de la proteína de shock térmico HSP90 a nivel extra celular (Figura 10 c).

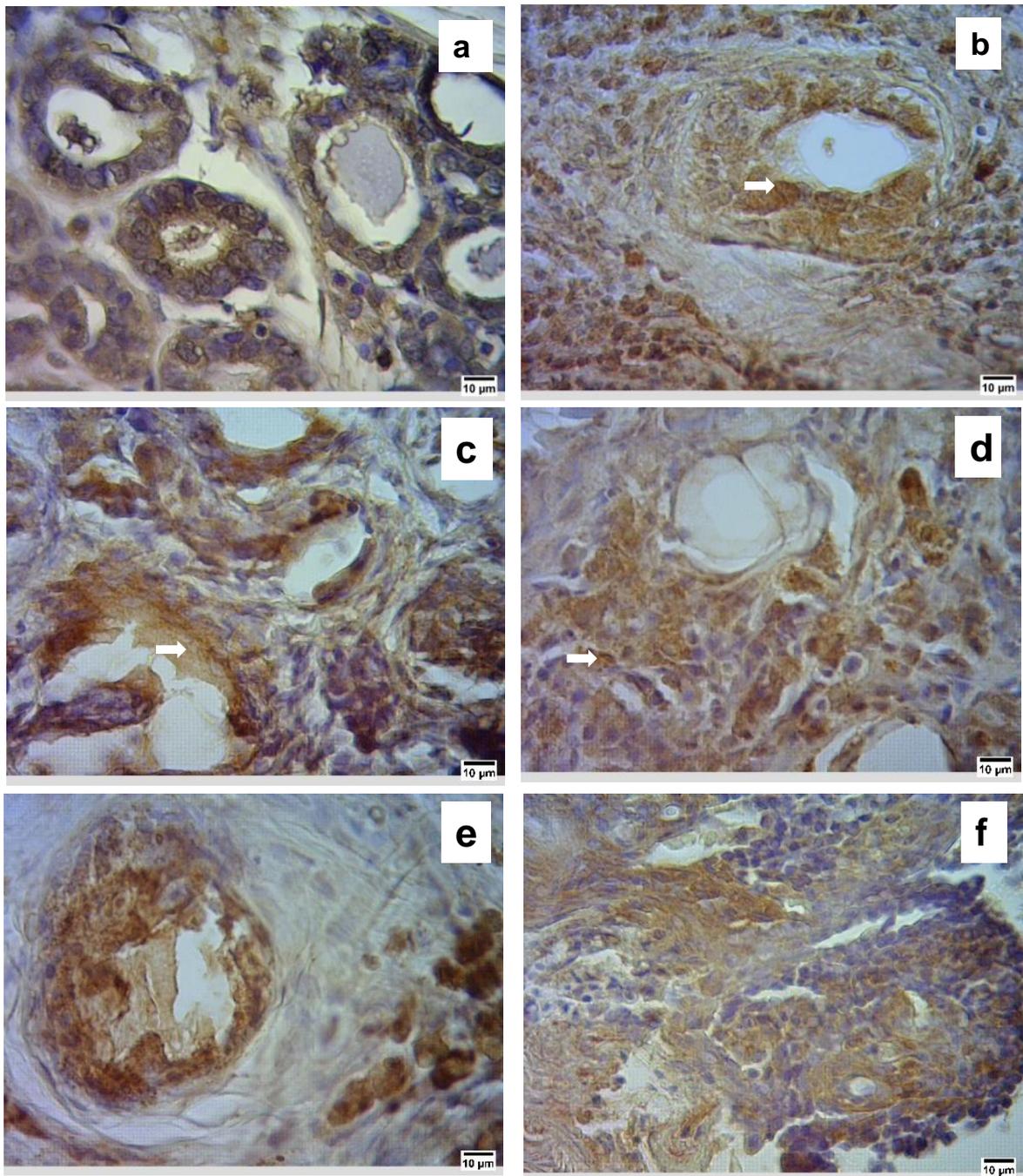


Figura 10. Inmunolocalización de la proteína de shock térmico HSP90 en tumor de glándula mamaria de hembras caninas. Imágenes de inmunohistoquímica representativas de los tumores mamarios de perras, se indican con flechas las inmunolocalizaciones de la proteína, a) Hiperplasia células mioepiteliales, b) Adenocarcinoma, c) Carcinoma mamario cístico papilar, d) Carcinoma mamario sólido, e) Sarcoma, f) Tumor mixto. Barra de escala =10µm.

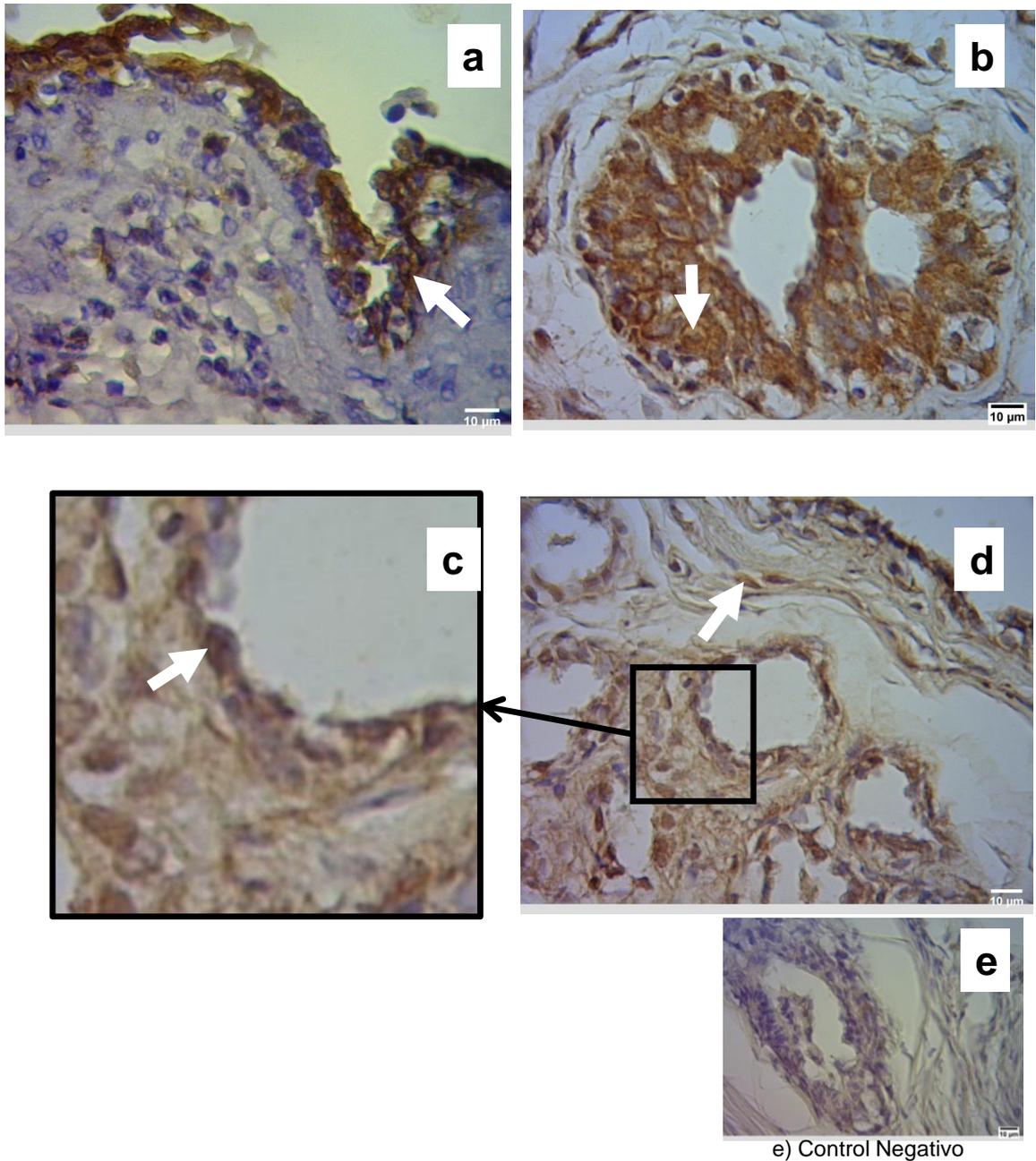


Figura 11. Imágenes de inmunohistoquímica que indican la Inmunolocalización de la proteína de shock térmico HSP90 en tumores mamarios de hembras caninas: a) observe la intensa inmunomarcación en citoplasma de células epiteliales en adenocarcinoma mamario b) inmunomarcación en citoplasma de célula del epitelio de conductos c) inmunomarcación más leve en núcleo de células epiteliales (imagen ampliada) d) Inmunomarcación en células del tejido conectivo (fibroblastos), e) Control Negativo de la técnica. Barra de escala =10µm. Magnificación final 400 aumentos.

6.3 Análisis cuantitativo de la inmunexpresión de la proteína HSP90 en tumores mamarios de hembras caninas

6.3.1 Efecto de la edad sobre la variable HSP90

La inmunexpresión de la proteína HSP90 no presentó diferencias entre perras adultas jóvenes entre 2 a 5 años (n=5), adultas de 6 a 10 años (n=15), y de 11 años a 16 años (n=8) (Figura 12).

6.3.2 Efecto del estatus hormonal sobre la variable HSP90

El área inmunomarcada de la proteína HSP90 (%) no mostró diferencia entre hembras caninas con (n=10) y sin (n=18) ovariectomía (Figura 13 a).

6.3.3 Efecto de la ocurrencia del tumor mamario sobre la variable HSP90

El área inmunomarcada de la proteína HSP90 fue mayor en tumores primarios (n=17) con respecto a tumores secundarios (n=11) ($p=0,0001$) (Figura 13 b).

6.3.4 Efecto de la interacción entre variables estatus hormonal y ocurrencia del tumor sobre la inmunexpresión de HSP90

En cuanto al análisis de la interacción entre el factor estatus hormonal y ocurrencia del tumor, encontramos que, entre los tumores primarios, la inmunexpresión de HSP90 fue mayor en tumores de hembras sin ovariectomía (n=9) en comparación con los primarios de hembras con ovariectomía (n=8) (Figura 14).

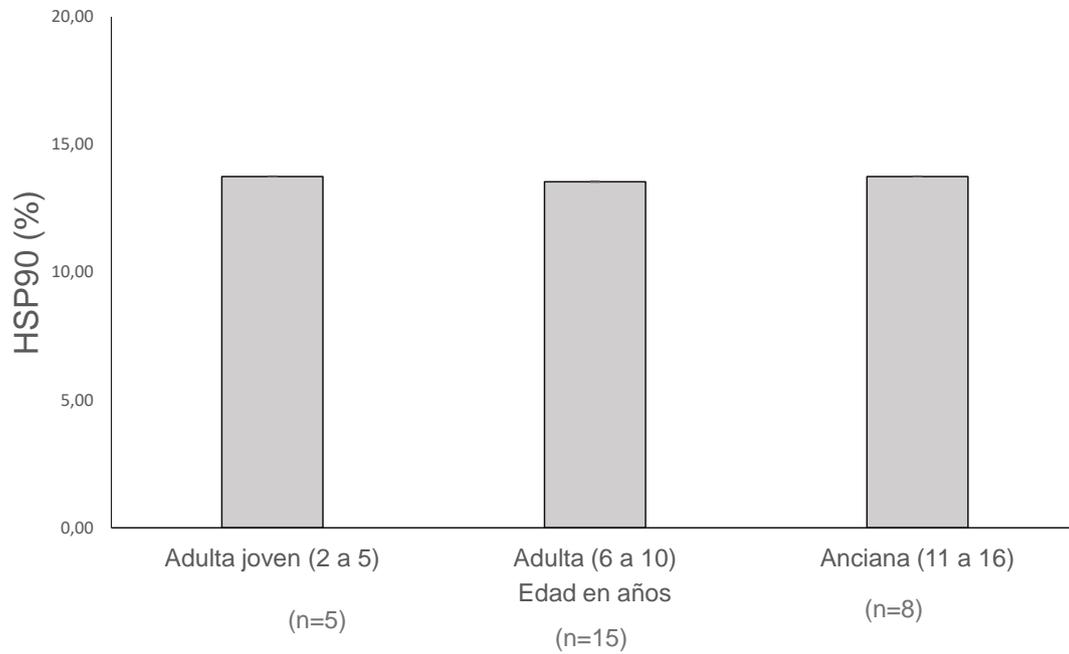


Figura 12 Inmunoexpresión de la proteína HSP90 en tumores de mama de hembras caninas de acuerdo a la edad. Adulta joven/adulta/anciana), Las barras representan los valores de media \pm eem.

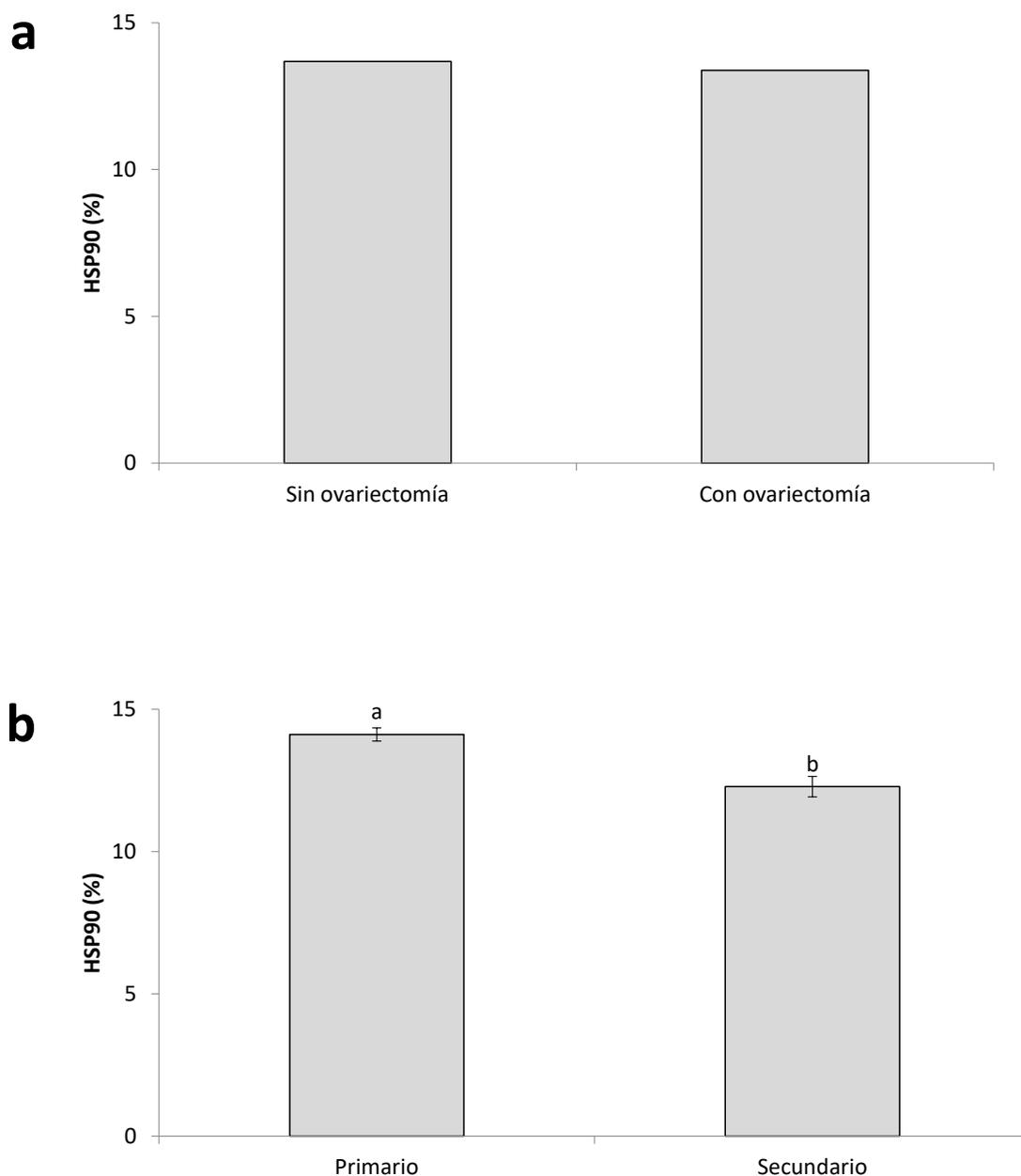


Figura 13. Inmunoexpresión de la proteína HSP90 en tumores de mama de hembras caninas de acuerdo a el estatus hormonal y ocurrencia del tumor. a) Según estatus hormonal: hembras sin ovariectomía (n=18) y hembras con ovariectomía (n=10), b) según ocurrencia del tumor: primario (n=17) o secundario (n=11). ANOVA. Diferentes literales sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Las barras representan los valores de media \pm eem.

Estatus hormonal y Ocurrencia del tumor

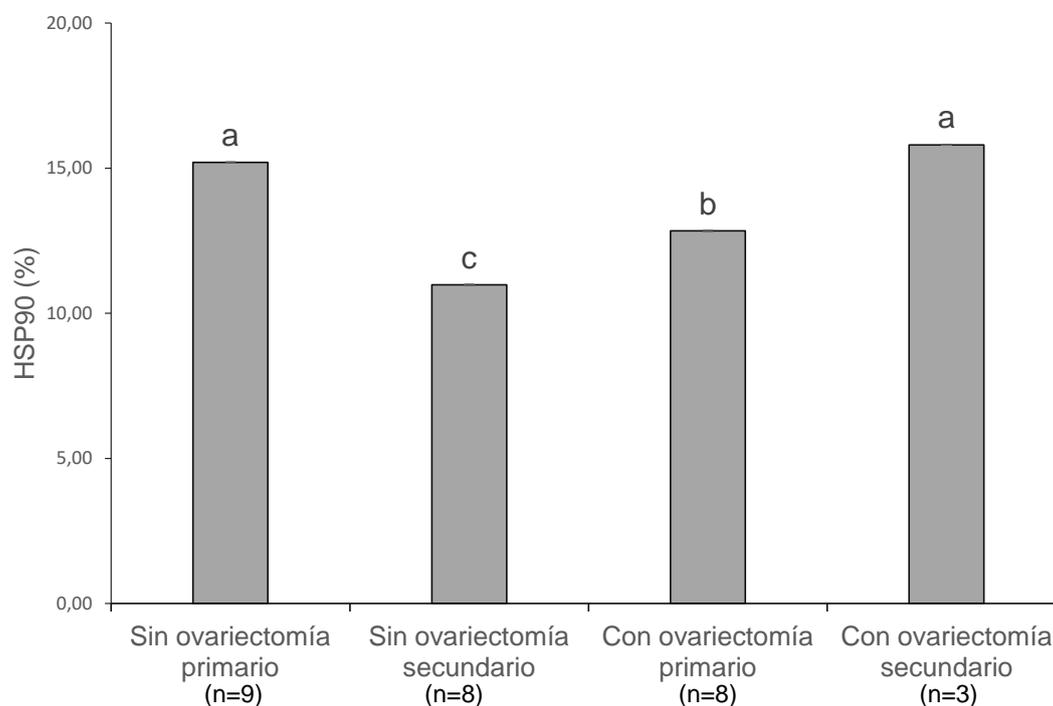


Figura 14. Inmunoexpresión de la proteína HSP90 en tumores de mama de hembras caninas de acuerdo a interacción entre estatus hormonal y ocurrencia del tumor. Hembras sin ovariectomía (n=18) y hembras con ovariectomía (n=10) versus ocurrencia del tumor: primario (n=17) o secundario (n=11). ANOVA Diferentes literales sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Las barras representan los valores de media \pm eem.

6.4 Resultados descriptivos del área inmunomarcada de HSP90 en tumores de mama en hembras caninas.

6.4.1 Histopatología

El área inmunomarcada para la proteína HSP90 fue elevado en los tumores mamarios de tipo carcinoma, mixto y sarcomas. Dentro de los carcinomas la inmunoeexpresión fue de 13,88. Por último en el caso de la hiperplasia de células mioepiteliales la inmunoeexpresión de HSP90 fue de 9,68, siendo la inmunoeexpresión más baja detectada (Figura 10a y Figura 14).

6.4.2 Raza

El área inmunomarcada de la proteína HSP90 fue elevada en hembras cruzas (16,84%) siendo menor en las hembras Caniche (12,89%) y Cocker (12,25%). En el caso de la hembra Rotweiller la inmunoeexpresión fue de 17,39% en el caso de la hembra Mastín Napolitano la inmunoeexpresión fue 8,93% (Figura 12 b).

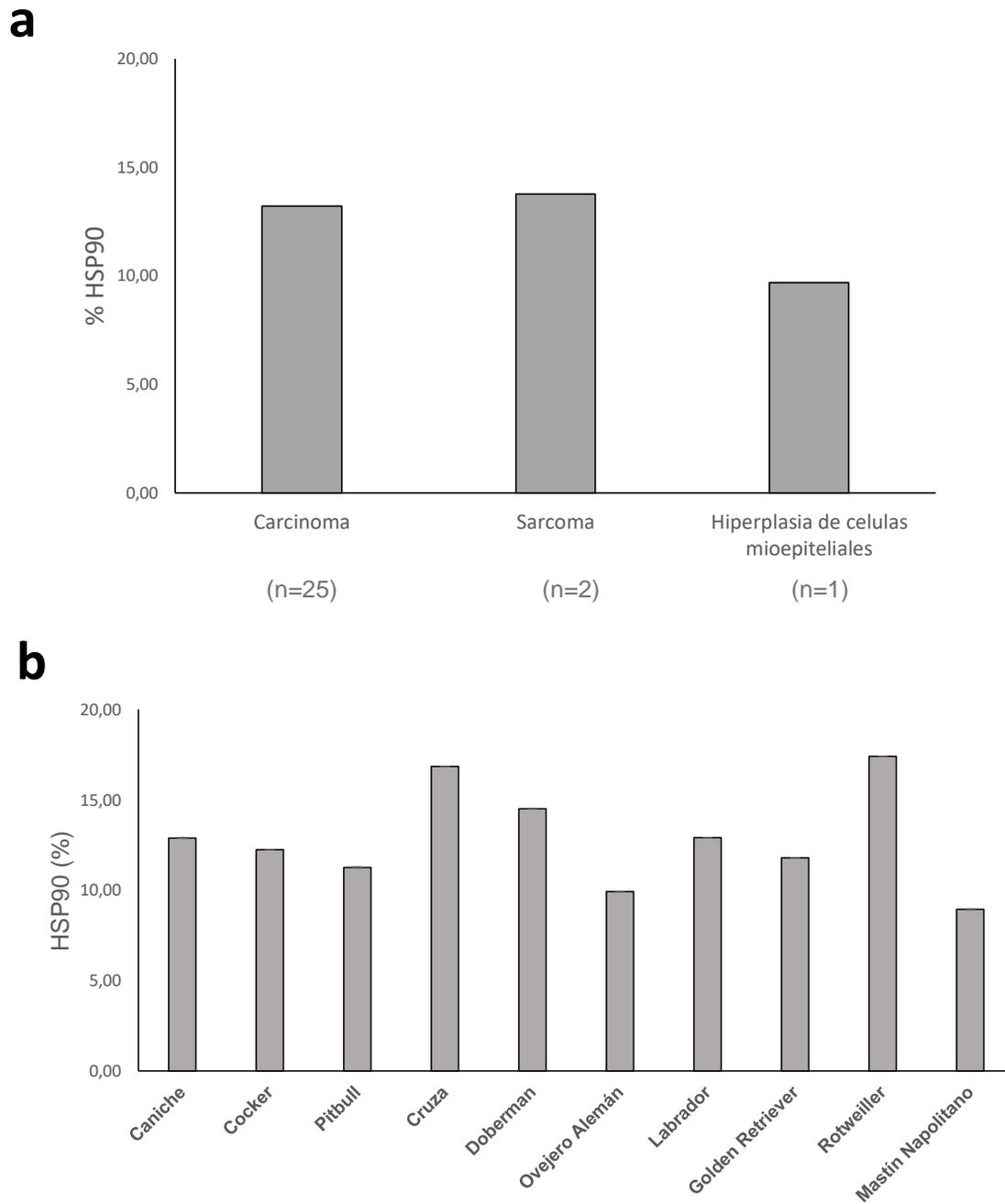


Figura 15. Inmunoposición de la proteína HSP90 en tumores de mama de hembras caninas de acuerdo a histopatología tumoral. a) HSP90 y cada tipo de tumor por Clasificación histopatológica. b) Inmunoposición de HSP90 en las razas estudiadas. Las barras representan los valores de media \pm em.

7 DISCUSIÓN

El presente estudio determinó la localización y cuantificación de la inmunexpresión de la proteína HSP90 en tumores mamarios de hembras caninas en nuestro país, junto con el análisis de la casuística de los mismos. Hasta donde sabemos, no se han realizado estudios descriptivos de la cuantificación de esta inmunexpresión de HSP90 correlacionada con la edad, la raza, el estatus hormonal y con la ocurrencia del tumor.

7.1 ¿Dónde se localiza la proteína de shock térmico HSP90 en tumores mamarios de perras?

En primer lugar, la inmunexpresión de la proteína de shock térmico HSP90 en nuestro estudio, se observó dentro del citoplasma de las células del epitelio glandular, en el citoplasma de las células que conforman el epitelio de los conductos y en citoplasma de células del tejido conjuntivo (fibroblastos), coincidiendo con lo descrito por Coronato et al., 1999.

En segundo lugar, determinamos la localización en núcleos de células epiteliales y células conjuntivas. Nuestros registros de la inmunexpresión a nivel nuclear coincide con los estudios realizados por Romanucci et al. (2006) y por Badowska-Kozakiewicz y Malicka (2012) dónde estudia la localización de las proteínas de shock térmico HSP90.

La localización a nivel nuclear en tumores sugiere que dicha proteína estaría regulando los procesos tumorales a nivel genético. El pasaje de la proteína al núcleo es indicio de regulación. De hecho, esta localización se describe en el caso de la regulación por las proteínas chaperonas como HSP90 (Calderwood y Neckers, 2016). Por otra parte, en el presente estudio se registró la inmunexpresión de la proteína HSP90 también a nivel extracelular, concordando con estudios previos Tsutsumi et al. (2009) que menciona que la expresión de HSP90 no estaría confinada al citosol. De hecho, menciona que se localiza la HSP90 a nivel de la superficie celular siendo secretada hacia el espacio extracelular. Esta localización podría ser indicativa de su rol en las metástasis.

7.2 ¿Cómo se expresa la proteína de shock térmico HSP90 en tumores de mama según el estatus hormonal de la perra?

En cuanto al estatus hormonal, en el presente estudio, la inmunexpresión de la proteína de shock térmico HSP90 no registró diferencias entre hembras ovariectomizadas y hembras no ovariectomizadas. Sin embargo, se registraron diferencias cuando se analizó la interacción entre los factores estatus hormonal y ocurrencia del tumor.

En los tumores primarios, evidenciamos una mayor inmunexpresión de HSP90 en perras sin ovariectomía en comparación con las ovariectomizadas. Esto sugiere que la HSP90 podría estar mostrando un papel en la regulación de los receptores de estrógeno. En este sentido, estudios previos en tumores mamarios de perras indican que los receptores de estrógeno están aumentados en hembras enteras en comparación con las ovariectomizadas (Mainenti et al., 2014). Sugerimos que el aumento observado en la expresión de HSP90 en tumores primarios de hembras sin ovariectomía estaría relacionado con el aumento de los receptores de estrógeno.

No obstante, entre los tumores secundarios la inmunoexpresión de HSP90 fue mayor en hembras con ovariectomía con respecto a las hembras sin ovariectomía. En primer lugar, la sobreexpresión de la proteína HSP90 en tumores secundarios de hembras ovariectomizadas podría suponer una desregulación de HSP90 por carencia de estrógenos. A pesar de que se conoce en tumores de mama el importante rol de los estrógenos en la progresión del tumor (Renoir, 2012) nuestros resultados sugieren que la carencia de estrógenos ováricos (por la ovariectomía) no evita la progresión de tumores secundarios dado que aumenta la inmunoexpresión de HSP90. Por lo tanto, una explicación al aumento de Hsp90 en esta situación, podría estar dada por la producción de estrógenos por el tejido adiposo de la mama tumoral.

Resulta interesante destacar que, en las mujeres posmenopáusicas, el tejido adiposo se convierte en el sitio principal de la biosíntesis de estrógenos y, en particular, el tejido adiposo mamario se considera una fuente importante de estrógenos que impulsan el crecimiento de los cánceres de mama dependientes de hormonas. En este sentido estudios previos mencionan que la HSP90 juega un rol importante en la regulación de estrógenos no solo a nivel del receptor sino en la regulación de la enzima aromatasas necesaria para la biosíntesis de estrógenos del tejido adiposo en tumores mamarios de mujeres en cultivo (Subbaramaiah et al., 2016).

Por otro lado, el aumento de HSP90 podría ser independiente de estrógeno y responder al alto grado de indiferenciación del tejido tumoral y autonomía para el crecimiento tumoral típico en tumores secundarios.

Esto se apoya en estudios previos realizados en ratas, que mencionan que el grado de indiferenciación que sufre el tejido tumoral cuando el tumor es secundario, es decir luego de producir metástasis o recidivas, podría indicar que el mismo se vuelve independiente de estrógenos, y puede llegar a ser muy invasivo o no, según el gen que exprese (Torres-arzayus et al., 2010).

Analizando el aspecto de la influencia hormonal sobre el desarrollo de tumores de mama en caninos hembras se ha determinado que los receptores hormonales de estrógeno principalmente tienen gran importancia en el desarrollo de estos tumores (Herms y Gobello, 2002). Asimismo, los receptores de estrógeno se mueven del citoplasma al núcleo, y en ausencia de la hormona estos se unen a complejos con la proteína de shock térmico HSP90 regulando de ésta forma la función del receptor (Bagatell et al., 2001, Herms et al., 2003). A nivel tumoral, estudios previos indican que el receptor de estrógeno beta (ER β) se expresa intensamente en células de carcinoma mamario de tipo inflamatorio altamente maligno (Illera et al., 2006).

7.3 ¿La casuística de tumores mamarios en perras en el presente estudio con respecto a estatus hormonal fue similar en los casos estudiados previamente?

En el presente estudio en tumores de mama en perra evidenció que los casos fueron mayormente en hembras sin ovariectomía donde registramos un 64% de casos de tumores mamarios. Esto se atribuye a dos principales causas.

Por un lado, puede deberse a que los propietarios no realizan de rutina la ovariectomía en sus mascotas por varias razones socio-culturales o socio-económicas. Por otra

parte, el registro mayor de los tumores en hembras no ovariectomizadas se puede atribuir a los factores hormonales que influyen en el desarrollo de los mismos.

En este sentido, en otro país latinoamericano, se realizó un estudio en donde se analizaron 295 casos de perras que asistieron a consulta con diferentes tipos de tumores mamarios y en el 62 % de los casos fueron hembras sin ovariectomía (182 de los casos) (Velandia, 2014). Este porcentaje es similar a lo observado en nuestro estudio.

Estos resultados reafirman que las hormonas sexuales como los estrógenos son factores que hacen a las hembras más propensas a desarrollar neoplasias de la glándula mamaria (Velandia, 2014).

¿Por qué realizar la ovariectomía resulta beneficiosa y cuándo debería realizarse?

Según Fonseca y Daleck (2000), realizar la ovariectomía a hembras caninas con presencia de tumores mamarios como tratamiento paliativo junto con la mastectomía no la protege de la aparición de reincidencias, recidivas o metástasis, ni prolonga la vida del animal.

En dicho estudio se menciona que el efecto protector de la ovariectomía sería positivo si la misma se realizara antes de los dos años de edad y después de ese período no tendría efecto.

De no realizar ovariectomía al animal antes de los dos años se lo expone a la influencia de las hormonas en las distintas etapas del ciclo estral. Este desafío hormonal colabora en el desarrollo de los tumores mamarios. Asimismo, se debe considerar que existen otros factores que están implicados en el desarrollo de tumores que deben ser tenidos cuenta como por ejemplo la naturaleza genética de los mismos.

7.4 ¿Existen similitudes en la edad de presentación de tumores mamarios en perras registrados en el presente estudio con respecto a otros estudios?

En este estudio se observó que un 53% de los casos de tumores mamarios se presentaron en las hembras caninas adultas comprendidas entre los 6 a 10 años. Esto podría deberse a diferentes causas, como por ejemplo a la influencia hormonal en perras de esta edad que probablemente se encuentran en un estado hormonal activo.

Por otro lado, también el uso de anticonceptivos orales es mayor en estos períodos. Estudios previos en México entre los años 2002 a 2012 se registró en mayor porcentaje de casos de tumores mamarios (70 %) entre perras adultas entre 9 a 12 y 5 a 8 años (Salas et al., 2015) . Asimismo, en Bogotá entre 182 casos de tumores el 62% se registró en hembras de más de 8 años y el 37 % correspondió a hembras adultas de 1,6 a 8 años (Velandia, 2014). En nuestro país, se ha descrito que la mayoría de los tumores mamarios en hembras caninas, durante el período 2005 al 2010 en el Centro Hospital Veterinario de la Facultad de Veterinaria, fue de 52% en perras entre 6 a 10 años (Elgue et al., 2012). Estos resultados concuerdan con los registros de edad en el presente estudio. Esto indica que se mantiene la tendencia a la mayor frecuencia de tumores mamarios en perras comprendidas en este rango etario. Por lo tanto, el registro de casos de tumores mamarios en estas edades indica un incremento constante y regular de la incidencia a medida que el animal envejece.

Cabe destacar que en los casos clínicos de tumores mamarios del presente estudio no se registraron animales menores a 2 años. Esto coincide con los registros en perras en Bogotá, donde se observó que de un total de 295 casos, solo 3 correspondieron a hembras de edades comprendidas entre 0 y 1,5 años, reafirmando que es muy poco frecuente, casi inusual el desarrollo de tumores mamarios en animales menores de 2 años (Velandia, 2014).

Por otra parte, en medicina humana se encuentra ampliamente demostrado como en veterinaria que la edad influye en el desarrollo del cáncer. En el caso de las mujeres, la edad de aparición de los tumores mamarios también aumenta con la edad, es mayor la presentación después de los 35 años, aunque pueden aparecer casos en menores de 30, pero no son comunes. Esta edad de aparición está relacionada en parte con el inicio de proceso de menopausia, si la misma es tardía conforma mayor riesgo de cáncer, entre otros factores, como por ejemplo una menarca precoz, nuliparidad, primer embarazo después de los treinta años (Gallego, 2005).

En resumen, los datos recabados en el presente estudio aportan información sobre la expresión de la proteína de shock térmico HSP90 en tumores mamarios de hembras caninas, así como datos sobre la casuística de los mismos. Cabe destacar que la información aportada sobre el efecto de la ovariectomía y la ocurrencia del tumor sobre dicha proteína sugiere nuevas hipótesis a ser planteadas. Los resultados obtenidos brindan datos para la comprensión de los mecanismos implicados en el desarrollo de los tumores de mama en caninos basados en la expresión de la proteína de shock térmico HSP90 asociada a malignidad y metástasis.

8 CONCLUSIONES

En el presente estudio podemos concluir que la proteína de shock térmico HSP90 varía su expresión de acuerdo a la interacción del estatus hormonal y a la ocurrencia del tumor.

Dada la elevada inmunoexpresión de la proteína de shock térmico HSP90 en tumores mamarios primarios de hembras caninas y el vínculo demostrado de la HSP90 con el aumento de malignidad y metástasis y pronóstico reservado, se sugiere hacer énfasis en el control y seguimiento de los mismos.

Nuestros resultados de aumento de la inmunoexpresión de HSP90 en perras con un tumor primario sin ovariectomía refuerzan la recomendación de ovariectomía temprana. Esta recomendación se sugiere en tumores dependientes de estrógeno donde la HSP90 está regulando los receptores de estrógenos.

Sin embargo, en el caso de perras con tumor secundario y ovariectomizadas la proteína HSP90 se sobreexpresa, lo que supone una desregulación por carencia de estrógenos. Esto sugiere el control del crecimiento tumoral en recidivas en hembras ovariectomizadas no dependen de estrógenos ováricos, sino que estaría regulado a expensas de las proteínas de shock térmico como HSP90 por nuevos mecanismos a dilucidar.

Los resultados obtenidos en este estudio reafirman la utilidad de estas proteínas como marcadores diagnósticos o pronósticos de la enfermedad, dado que la HSP90 evita la apoptosis, promueve la proliferación celular jugando así un rol en la carcinogénesis de la glándula mamaria.

8.1 Estudios a futuro

Continuaremos en esta línea de trabajo, buscando principalmente aumentar el número de muestras de tumores mamarios a fin de analizar y correlacionar el tiempo de supervivencia en relación con el tumor. Realizar grupos control, en glándula mamaria normal de perra.

Correlacionar HSP90 con otras proteínas de shock térmico. Determinar en las muestras inmunexpresión de Receptores de estrógeno y la enzima aromatasa. Para comprender los mecanismos y dinámica de acción tumoral a nivel celular y molecular.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Antuofermo E., Miller MA., Pirino S., Xie J., Badve S., Mohammed SI (2007). Spontaneous Mammary Intraepithelial Lesions in Dogs — A Model of Breast Cancer. *AACR publications*. 16(11): 2247–2257.
2. Arias, JI., Paredes, E. (2015). Carcinoma mamario en un canino macho: caracterización clínica e inmunohistoquímica Mammary carcinoma in a male dog : clinical and immunohistochemical characterisation. 115: 111–115.
3. Asqui A. (2017). *Clasificación histopatológica de tumores mamaros en caninos extraídos quirúrgicamente, en 6 clínicas veterinarias de la ciudad de Quito*. Tesis Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad central del Ecuador. 7p.
4. Badowska-Kozakiewicz, A., Malickal, I. (2012). Immunohistochemical evaluation of expression of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in mammary gland neoplasms in bitches. *Pol J Vet Sci*; 15: 209–214
5. Bagatell R., Khan O., Paine-murrieta G., Taylor CW., Akinaga S., Whitesell L. (2001). Destabilization of Steroid Receptors by Heat Shock Protein 90-binding Drugs : A Ligand-independent Approach to Hormonal Therapy of Breast Cancer 1. 7: 2076–2084.
6. Barone R. (1978). *Anatomie comparée des mammifères domestiques*. Beaux-Arts J. Tixier y Fils. S.A, Lyon.
7. Barone R. (2001). *Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 4 Splanchnologie II Appareil uro-génital Fœtus et ses annexes Péritoine et topographie abdominale* (Vigot, Ed.). Lyon. 896p
8. Benavente M. (2018). Estudios sobre la población de receptores hormonales en neoplasias mamaras caninas y evaluación in vitro de terapias adyuvantes. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Veterinarias U.N.C.P.B.A. 14p.
9. Caicedo JA., Iregui CA., Cabarcas ME., Acosta BJ., Animal S. (2012). Estudio comparativo de la frecuencia de tumores mamaros según sexo, edad y tipo histológico en caninos y humanos en los laboratorios de patología anatómica de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. 5: 37–46.
10. Calderwood, SK.; Gong, J. (2012) Molecular chaperones in mammary cancer growth and breast tumor therapy. *J Cell Biochem*; 113: 1096–1103
11. Calderwood, Stuart K., and Len Neckers (2016). "Hsp90 in cancer: transcriptional roles in the nucleus." *Advances in cancer research*. Vol. 129. Academic Press, 89-106.
12. Camacho A., Vasconcellos R. (2016). Análisis morfométrico y determinación de proteínas de shock térmico HSP90 en endometrio de yeguas adultas. Tesis Facultad de Veterinaria, Udelar, 59p.
13. Chang S., Chang C., Chang T., Wong M. (2005). Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998–2002). 227.
14. Chatterjee, S., Burns, T. (2017). Targeting heat shock proteins in cancer: a promising therapeutic approach. *International journal of molecular sciences*, 18(9), 1978.
15. Ciocca DR., Arrigo AP., Calderwood SK. (2013). Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update. *Arch. Toxicol*. 87: 19–48.

16. Ciocca, DR., Cayado-Gutierrez, N., Maccioni, M., Cuello-Carrion, FD. (2012). Heat shock proteins (HSPs) based anti-cancer vaccines. *Curr Mol Med*; 12: 1183–1197
17. Coronato S., Girolamo WDI., Salas M., Spinelli O., Laguens G., (1999). *Biología de las proteínas*. 59: 477–486.
18. Coronato S., Laguens GE., Spinelli OM., Girolamo WDI. (2002). Marcadores tumorales en cáncer de mama. 62: 73–82.
19. Cortés C., Ramírez V., Ariza A., Bobadilla N. (2008). Significado funcional de las proteínas de choque térmico de 90 kDa. 60(4): 311–320.
20. De Andrés Gamazo P. (2016). Aspectos comparativos entre el cáncer mamario humano y canino con especial referencia al cáncer mamario inflamatorio: grado histológico de malignidad, mecanismos endocrinos e interleucinas. Tesis facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 316p.
21. Demicheli, V., Pascal, P., Perez, M. (2011) Prevalencia de tumores de mama en perras y su determinación histopatológica según la OMS. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, UdelaR. 43p.
22. Diessler M. (2009). Carcinomas mamaros de caninos: influencia de variables histológicas e inmunohistoquímicas en el pronóstico. *Ciencias Morfológicas* 11(2): 143–415.
23. Dubey, A.; Prajapati, KS, Swamy, M.; Pachauri, V. (2015) Heat shock proteins: A therapeutic target worth to consider. *Vet World*; 8: 46–51
24. Dyce, M., Sack, W., Wensing, C. (2012) *Anatomía Veterinaria. 4ta. ed. Mexico, D.F, Ed. Manual Moderno*, 834p.
25. Ellensport, C.R. (1999). Aparato urogenital de los carnívoros. En: Sisson, S., J.D. Grossman. *Anatomía de los animales domésticos*. Vol. 2. 7ª ed. Editorial Masson. Barcelona, España.
26. Elgue, V., Piaggio, J., Amaral, C., Pessina, P. (2012) Factores asociados a la presentación del tipo de cáncer en caninos atendidos en el Hospital de la Facultad de Veterinaria de Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*; 48(187): 25–30.
27. Fernández, C. (2013) Relevamiento radiológico de tórax en perras con tumores de mama asistidas en el Hospital de Facultad de Veterinaria entre enero de 2011 y junio de 2013 inclusive. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria UdelaR. 43p.
28. Fernandes B. (2012). Estudio histológico, inmuno-histoquímico y de cultivo celular de mamas humana y canina normal y cancerosa. *Rev. MVZ Córdoba* 17: 2964–2973.
29. Gallego G. (2005). Nódulo palpable de mama. *Rev. Colomb. Obstet. Ginecol.* 56: 82–91.
30. Gene: HSP90B1 (ENSCAFG00000007427) - Ensembl protein families - *Canis lupus familiaris* - Ensembl genome browser 96
31. Goldschmidt, M., Peña, L., Rasotto, R., Zappulli, V. (2011) Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. *Vet Pathol*; 48: 117–131
32. Hermo, G., García, M., Torres, P., Gobello, C. (2005) Tumores de Mama en la Perra. *Cienc Vet*; 7: 1–25.
33. Hermo G., Gobello C. (2002). Tumores mamaros caninos: Un enfoque Hormonal. disponible en <https://docplayer.es/14652803-Tumores-mamaros-caninos-un-enfoque-hormonal.html>. Fecha de consulta 11 febrero de 2019.

34. Hermo G., Gómez D.E., Alonso D.F., Gobello C. (2003). Receptores hormonales en tumores de mama caninos. *Rev. del Col. Vet. la Prov. Buenos Aires* 35: 36–41.
35. Illera, J. C., Pérez-Alenza, M. D., Nieto, A., Jiménez, M. A., Silvan, G., Dunner, S., Peña, L. (2006). Steroids and receptors in canine mammary cancer. *Steroids*, 71(7), 541-548.
36. Jing L., Soroka J., Buchner J. (2012). Biochimica et Biophysica Acta The Hsp90 chaperone machinery: Conformational dynamics and regulation by co-chaperones. *BBA - Mol. Cell Res.* 1823(3): 624–635.
37. König, H.E., Liebich, H-G. (2015) Anatomía de los animales domésticos. 2da. ed. Madrid, Ed. Médica Panamericana, 400p.
38. Li J., Buchner J. (2012). Structure , Function and Regulation of the Hsp90 Machinery. *Biomedical Journal* 36(3): 106–117.
39. Martín de Civetta M., Civetta J. (2011). Carcinogénesis. *Encycl. Toxicol. Third Ed.* 53(3): 713–729.
40. Modiano J., Breen M., (2009), Biología y patogénesis del cáncer, Withrow S., Vail D., cuarta edición, Barcelona- España, Multimédica ediciones Veterinarias, pp 1-9.
41. Mosser D.D., Morimoto R.I. (2004). Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene* 23: 2907–2918.
42. Munson L., Moresco A. (2007). Comparative pathology of mammary gland cancers in domestic and wild animals. *Breast Dis.* 28: 7–21.
43. Oliveira L.O., Oliveira R.T., Loretto A.P., Rodrigues R., Driemeier D. (2003). Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. *Acta Scientiae Veterinariae* 31(2): 105–110.
44. Pawlina, W. (2016) Ross *Histología Texto y Atlas. 7ª. ed. Barcelona*, Ed. Wolter Kluwer, 1052p.
45. Prodromou C. (2016). Mechanisms of Hsp90 regulation. *Biochem. J.* 473: 2439–2452.
46. Raduly, L., Cojocneanu-petric, R., Sarpataki, O., Berindan-neagoe, I., Marcus, I. (2018) Canis lupus familiaris as relevant animal model for breast cancer a comparative oncology review. *Anim Sci Pap Reports*; 36: 119–148
47. Rasotto, R., Berlato, D., Goldschmidt, M.H.; Zappulli, V. (2017) Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes: An Observational Cohort Study of 229 Cases. *Vet Pathol*; 54: 571–578
48. Rehm S., Stanislaus A.D.J., Williams A.M. (2007). Estrous Cycle-Dependent Histology and Review of Sex Steroid Receptor Expression in Dog Reproductive Tissues and Mammary Gland and Associated Hormone Levels. 80(3): 233–245.
49. Renoir J. (2012). Estradiol receptors in breast cancer cells: Associated co-factors as targets for new therapeutic approaches. *Steroids* 77: 1249–1261.
50. Rodríguez C., Santillán G., Perales R., Chavera A. (2013). Evaluación de una técnica inmunohistoquímica para el diagnóstico de neoplasias mamarias mixtas en caninos. *Revista de investigaciones Veterinarias del Perú* 24(2): 176–181.
51. Rodríguez J., Ortiz L., Vasquez, Y., Garzón A. G.L. (2009). Valoración de la citología para el diagnóstico de tumores en caninos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 22(1): 42–53.

52. Romanucci M., Marinelli A., Sarli G., Salda L. Della (2006). Heat shock protein expression in canine malignant mammary tumours. *BMC Cancer* 6: 171.
53. Rosciani A., Merlo W.A., Guaimás Moya L., Báez A., Lockett M., López J., Piuze M., Macció O., Lizárraga F. (2004). Consideración de Variables Clínicas en Hembras Caninas con tumores mamarios. *Comunicaciones científicas y tecnológicas*. 45: 34-42.
54. Röhl A., Rohrberg J., Buchner J. (2013). The chaperone Hsp90: Changing partners for demanding clients. *Trends Biochem. Sci.* 38: 253–262.
55. Saibil H. (2013). Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat. Publ. Group*, 14(10): 630–642.
56. Salas, Y., Márquez, A., Diaz, D., Romero, L. (2015). Epidemiological study of mammary tumors in female dogs diagnosed during the period 2002-2012: A growing animal health problem. *PLoS One*; 10: 1–15
57. Sampaio, C., Daleck, C. (2000) Canine Mammary Tumors: Hormonal Influence and Effects of Ovariohysterectomy As an Adjuvant Therapy. *Ciencia Rural*; 30: 731–735
58. Sorenmo, K.U., Rasotto, R., Zappulli, V., Goldschmidt, MH. (2011) Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Vet Pathol*; 48: 85-97
59. Suarez Bonnet, A. (2011). “Expresión de la proteína 14-3-3 σ en tejidos normales y neoplasias mamarias de la especie canina”. Tesis Facultad de Veterinaria, Universidad de las Palmas de Gran Canaria, 250p.
60. Subbaramaiah K., Brown K.A., Zahid H., Balmus G., Weiss R.S., Herbert B., Dannenberg A.J. (2016). Hsp90 and PKM2 Drive the Expression of Aromatase in Li-Fraumeni Syndrome Breast Adipose Stromal Cells. *Journal of biological chemistry* 291: 16011–16023.
61. Sunil Kumar B.V., Bhardwaj R., Mahajan K., Kashyap N., Kumar A., Verma R. (2018). The overexpression of Hsp90B1 is associated with tumorigenesis of canine mammary glands. *Mol. Cell. Biochem.* 440 (1-2): 23–31.
62. Torres-Arzayus, M. I., Zhao, J., Bronson, R., & Brown, M. (2010). Estrogen-dependent and estrogen-independent mechanisms contribute to AIB1-mediated tumor formation. *Cancer research*, 70(10), 4102-4111.
63. Tsutsumi S., Beebe K., Neckers L. (2009). Impact of heat-shock protein 90 on cancer metastasis. *Future Oncol.* 5(5), 679–688.
64. Vallespi, M., García I. (2008). Las proteínas de estrés térmico en la inflamación y el cáncer. *Biotechnología Aplicada* 25: 199-207.
65. Velandia V. H.D. (2014). Análisis retrospectivo sobre la presentación de neoplasias en la glándula mamaria en caninos en la clínica de pequeños animales de la Universidad de la Salle en ciudad de Bogotá. Tesis Universidad de la Salle, 43p.
66. Withrow, S.J., Vail, D.M. (2009) *Oncología clínica de pequeños animales Withrow & MacEwen's*. 4ta. ed. Barcelona, Ed. Multimedia Ediciones Veterinarias, 832p.
67. Zagouri F., Bournakis E., Koutsoukos K., Papadimitriou C. (2012). Heat shock protein 90 (Hsp90) expression and breast cancer. *Pharmaceuticals*, 5(9): 1008–1020.

68. Zatloukal J., Lorenzová J., Tichý F., Nečas A., Kecová H., Kohout P. (2005). Breed and age as risk factors for canine mammary tumours. *Acta Veterinaria Brno*, 74(1): 103–109.