

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**DETERMINACIÓN DE LA INMUNOEXPRESIÓN DEL FACTOR HSF1 EN
TUMORES MAMARIOS DE PERRAS EN EL CENTRO HOSPITAL
VETERINARIO**

“Por”

Mariana JASSID HERNÁNDEZ

Noelia MISEVICIUS ORTÍZ

TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias.

Orientación: Higiene, Inspección-Control y Tecnología de los Alimentos.

MODALIDAD: ENSAYO EXPERIMENTAL

MONTEVIDEO

URUGUAY

2019

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de Mesa:

Dr. José M. Verdes

Segundo Miembro (Tutor):

Dra. Graciela Pedrana

Tercer Miembro:

Dr. Uruguaisito Benavides

Cuarto Miembro:

Lic. Paula Lombide

Quinto Miembro:

Dra. Ana Camacho

Fecha:

04/07/2019

Autores:

Br. Mariana Jassid

Br. Noelia Misevicius

AGRADECIMIENTOS

Gracias a nuestra tutora Graciela Pedrana y nuestras cotutoras, Paula Lombide y Ana Camacho.

A Laura Alsina gran compañera que desinteresadamente supo apoyarnos y entendernos más que nadie con este trabajo.

A toda el Área de Histología en especial a Helen Viotti, Fernanda Alcaide, Mónica Viqueira y Alicia Soria.

A los funcionarios de la sección de Biblioteca de la FVET- UdelaR.

A la Facultad de Veterinaria por hacernos sentir a gusto, por darnos la oportunidad de estudiar lo que quisimos, privilegio que no todos tienen.

De Mariana:

Al mayor pilar de mi vida, mi madre sin ella nunca hubiera llegado a ser lo que soy.

A mi pequeña familia y a la gran familia que construí con mis amigas, la fuerza de todos los días.

A Adriana Azaretto y Florencia Sollier mis veterinarias referentes que supieron apoyarme en los momentos más difíciles de la carrera.

A la Facultad porque además de formarme como profesional, me formó como persona, un título sin valores no sirve de nada.

Y a mis abuelas que ojalá dónde estén, se sientan tan orgullosas como lo estoy yo ahora.

De Noelia:

A mi familia, principalmente a mis padres por darme la oportunidad y el apoyo para poder realizar esta carrera, que soñé desde los 6 años.

A mis amigas las de siempre, que me dieron siempre la fuerza para seguir adelante.

A Diego por comprenderme y ayudarme en esta etapa de tanto estrés.

A la Facultad por las amigas que me regaló, además de un título me llevo amigas incondicionales.

A todos los compañeros de estudio y de trabajo que en todos estos años también me ayudaron a formarme como profesional.

A mis animales y en especial a Jordy.

Todavía queda mucho camino por recorrer.

“Piensa más alto, siente más profundo” Elie Wiesel.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	¡Error! Marcador no definido.
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	7
RESUMEN	10
SUMMARY	11
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. IMPORTANCIA DE TUMORES DE MAMA EN PERRAS	12
1.2. LA HEMBRA CANINA COMO MODELO ANIMAL	12
1.3. PROTEÍNAS DE SHOCK TÉRMICO	12
1.4. EL FACTOR DE SHOCK TÉRMICO HSF1 EN EL DIAGNÓSTICO DE TUMORES MAMARIOS	13
2. REVISION BIBLIOGRAFICA	14
2.1. IMPORTANCIA DE LOS TUMORES DE LA GLÁNDULA MAMARIA EN PERRAS Y MUJERES	14
2.2. VINCULACIÓN DE LOS TUMORES DE GLÁNDULA MAMARIA EN HUMANOS Y EN ANIMALES	14
2.3. TUMOR DE LA GLÁNDULA MAMARIA EN HEMBRA CANINA	14
2.3.1. <i>¿Qué es una neoplasia?</i>	14
2.3.2. <i>Predisponentes y factores de riesgo para padecer tumor de glándula mamaria</i>	15
Estatus hormonal	15
Edad	15
Nutrición	15
Raza	16
2.3.3. <i>El pronóstico de los tumores de glándula mamaria</i>	16
2.3.4. <i>Clasificación histopatológica de tumor de glándula mamaria</i>	17
2.3.5. <i>Descripción de los principales tipos tumorales de glándula mamaria en perra</i>	19
Neoplasias epiteliales malignas	19
<i>Carcinoma simple</i>	19
Neoplasia epitelial maligna tipo especial	20
<i>Carcinoma inflamatorio</i>	20
Neoplasia mesenquimal maligna	20
Neoplasia mixta maligna	21
Neoplasias benignas	21
2.4. GLÁNDULA MAMARIA	22
2.4.1. <i>Anatomía de la glándula mamaria</i>	22
2.4.2. <i>Sistema linfático de la glándula mamaria</i>	24
2.4.3. <i>Histología y desarrollo de la glándula mamaria</i>	26
2.5. MARCADORES TUMORALES	30
2.5.1. <i>Proteínas de shock térmico HSP</i>	30
2.5.2. <i>Factor de transcripción de shock térmico o heat shock factor 1 (HSF1)</i>	31
2.5.2.1. Gen de Hsf1 en perras	31
2.5.2.2. Estructura molecular del factor de transcripción HSF1	31
3. OBJETIVOS	33
OBJETIVO GENERAL	33
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4. HIPÓTESIS	33
5. MATERIALES Y MÉTODOS	34

5.1. ANIMALES Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	34
5.2. ANÁLISIS DE FICHAS CLÍNICAS.....	34
5.3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO	34
5.4. MICROTOMÍA.....	34
5.5. COLORACIÓN DE HEMATOXILINA-EOSINA	35
5.6. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES BUFFER, ALICUOTADO Y DILUCIÓN DE ANTICUERPO	35
5.7. TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA	36
5.8. CAPTURA DE IMÁGENES DE PREPARACIONES DE INMUNOHISTOQUÍMICA	36
5.9. ANÁLISIS DE IMÁGENES DE INMUNOHISTOQUÍMICA.....	36
5.10. ANÁLISIS DE DATOS	37
5.10.1. Casuística	37
5.10.2. Inmunolocalización de factor de transcripción HSF1	37
5.10.3. Análisis estadístico	37
5.10.4. Análisis descriptivo de la inmunoexpresión de la proteína HSF1	38
6. RESULTADOS.....	39
6.1 RESULTADO DEL ANÁLISIS DE CASUÍSTICA DE TUMORES MAMARIOS EN PERRAS	39
6.1.1. Resultados de casuística según edad	39
6.1.2. Resultados de casuística según raza	39
6.1.3. Resultado de casuística según estatus hormonal	39
6.1.4. Resultados de casuística según ocurrencia del tumor.....	39
6.1.5. Resultados de casuística según histopatología	39
.....	41
6.2 RESULTADO DESCRIPTIVO DE LA INMUNOLocalIZACIÓN DEL FACTOR DE SHOCK TÉRMICO HSF1 EN TUMORES MAMARIOS.....	44
Localización del factor HSF1 en células de epitelios de adenómeros glandulares	44
Localización del factor HSF1 en células epiteliales de conductos.....	44
Localización del factor HSF1 en células del estroma conjuntivo	44
6.3. RESULTADOS CUANTITATIVOS DEL ÁREA INMUNOMARCADA DEL FACTOR DE SHOCK TÉRMICO HSF1 EN TUMOR DE MAMA EN HEMBRAS CANINAS.	46
6.3.1. Inmunoexpresión del factor HSF1 según la edad	46
6.3.2. Inmunoexpresión del factor HSF1 según estatus hormonal: ovariectomizadas versus no ovariectomizadas.....	46
6.3.3. Inmunoexpresión del factor HSF1 según la ocurrencia del tumor mamario	46
6.3.4. Inmunoexpresión del factor HSF1 según la interacción de estatus hormonal y edad.....	46
6.3.5. Inmunoexpresión del factor HSF1 según la interacción de estatus hormonal y ocurrencia del tumor	46
6.3.6. Inmunoexpresión del factor HSF1 según la interacción de edad y ocurrencia del tumor	46
6.4. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DEL ÁREA INMUNOMARCADA DEL FACTOR DE SHOCK TÉRMICO HSF1 (%) EN TUMOR DE MAMA EN HEMBRA CANINA.	50
6.4.1. Raza	¡Error! Marcador no definido.
6.4.2. Histopatología.....	50
7. DISCUSIÓN	53
7.1. ¿DÓNDE SE INMUNOLocalizó EL FACTOR HSF1 EN LOS TUMORES MAMARIOS DE PERRAS?	53
7.2. ¿VARÍA LA EXPRESIÓN DEL FACTOR HSF1 EN TUMOR DE MAMA EN PERRA SEGÚN EDAD DEL ANIMAL?	54
7.3. ¿CÓMO VARÍA LA INMUNOEXPRESIÓN DEL FACTOR HSF1 EN TUMORES DE MAMA EN PERRAS SEGÚN EL ESTATUS HORMONAL?	56
7.4. ¿EXISTEN CAMBIOS EN EL FACTOR HSF1 EN TUMOR DE MAMA EN PERRA SEGÚN OCURRENCIA DEL TUMOR POR 1ª VEZ O REINCIDENCIA?.....	57
7.5. ¿CÓMO SE VINCULA AL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN HSF1 EN TUMORES DE MAMA EN PERRA CON LA HISTOPATOLOGÍA DEL TUMOR?	57

7.6. ¿CÓMO SE VINCULA AL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN HSF1 EN TUMORES DE MAMA EN PERRA CON LA RAZA DEL ANIMAL?.....	58
7.7. INHIBICIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN HSF1 COMO BLANCO DE ESTRATEGIAS ANTITUMORALES	59
8. CONCLUSIONES	60
8.1 PERSPECTIVAS	60
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla N° 1. Clasificación histopatológica de tumores de mama en perras según datos obtenidos de Goldshmidt y col., 2011; Romairone y Cartagena, 2014; Withrow y Vail, 2009.

Tabla N° 2. Tabla de casos clínicos: datos de edad, raza, estatus hormonal (ovariectomía si/ovariectomía no), ocurrencia del tumor (primario/reincidencia), diagnóstico histopatológico y % de área inmunomarcada de HSF1 en tumores mamarios de perras derivadas a mastectomía 2014-2018 en Facultad de Veterinaria, Universidad de la República.

Figura 1. Irrigación de la glándula mamaria canina. a) Irrigación sanguínea, b) Irrigación linfática. Adaptado de (Evans y Lahunta, 2013).

Figura 2. Anatomía de la glándula mamaria: a) Unidad lobulillar del conducto terminal (Adaptado de Pawlina, 2016), b) Esquema representativo de las unidades funcionales de la glándula mamaria (Adaptado de Copola, 2005).

Figura 3. Esquema desarrollo glándula mamaria. Adaptado según Claver y col., 1984.

Figura 4. Mecanismo de acción de HSF1. En condiciones normales la HSF1 se encuentra como un monómero latente en el citosol. Al exponerse a condiciones citotóxicas como choque térmico o estrés oxidativo HSF1 se trimeriza y migra al núcleo. En el estado trimérico HSF1 se une al HSE (elementos de choque térmico) formando un complejo para activar la transcripción de los genes HSP (adaptado de Gafni y Steel Laboratory 2019).

Figura 5. Casuística de tumor de glándula mamaria de hembras caninas ingresadas en Centro Hospital de Facultad de Veterinaria (2014 – 2018). a) Según edad (joven adulta/adulta/anciana), b) Según razas muestreadas.

Figura 6. Casuística de tumor de glándula mamaria de hembras caninas ingresadas en Centro Hospital de Facultad de Veterinaria (2014 – 2018). a) Según estatus hormonal (con ovariectomía / sin ovariectomía). b) Según ocurrencia del tumor (primario / reincidencia).

Figura 7. Casuística de tumor de glándula mamaria de hembras caninas ingresadas en Centro Hospital de Facultad de Veterinaria (2014 – 2018) según el diagnóstico histopatológico.

Figura 8. Imágenes histológicas con tinción de Hematoxilina- Eosina de neoplasias de glándula mamaria de hembras caninas ingresadas en Centro Hospital de Facultad de Veterinaria durante los años 2014 a 2018: a) Caso N° 040/15 Pitbull, 8 años, ovariectomizada, carcinoma (primario). b) Caso N° 409/ 17 Golden Retriever, 7 años, no ovariectomizada, tumor inflamatorio (primario). c) Caso N°089/17 Cocker Spaniel, 15 años, ovariectomizada, sarcoma (primario). d) Caso N° 288/18 Cocker Spaniel, 10 años, no

ovariectomizada, tumor mixto (primario). e) Caso N° 277/14, Caniche, 9 años, no ovariectomizada, hiperplasia de células mioepiteliales (primario). Barra de escala =10 μ m. Aumento 40X.

Figura 9. Inmunolocalización del factor HSF1 en tumor de glándula mamaria de hembras caninas. Imágenes de inmunohistoquímica de tumores mamarios para indicar la inmunolocalización de la proteína: a) intensa inmunomarcación en citoplasma de células epiteliales de adenómeros glandulares (flecha negra), b) inmunomarcación intensa en epitelio glandular hiperplásico (flecha blanca), c) inmunomarcación más leve en citoplasma de células conjuntivas (flecha blanca), d) inmunomarcación perinuclear en células conjuntivas (cabeza de flecha), e) intensa inmunomarcación perinuclear en células conjuntiva (recuadro), e') detalle de imagen de célula conjuntiva con intensa inmunomarcación perinuclear. Barra de escala =10 μ m. Magnificación 40X.

Figura 10. Inmunoexpresión del factor de shock térmico HSF1 en tumores de mama de hembras caninas de acuerdo a edad (2 a 5 años/ 6 a 10 años/ 11 a 16 años). Las barras representan los valores de media \pm e.e.m. Diferentes literales sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 11. Inmunoexpresión del factor de shock térmico HSF1 en tumores de mama de hembras caninas de acuerdo a estatus hormonal ocurrencia del tumor. a) Según estatus hormonal (sin ovariectomía / con ovariectomía) b) Según ocurrencia del tumor (primario / recurrente). Las barras representan los valores de media \pm e.e.m. Diferentes literales sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 12. Inmunoexpresión del factor de shock térmico HSF1 en tumores de mama de hembras caninas de acuerdo a interacciones entre factores: a) estatus hormonal y edad, b) estatus hormonal y ocurrencia del tumor, c) edad y ocurrencia del tumor. Las barras representan los valores de media \pm e.e.m. Diferentes literales sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 13. Inmunoexpresión del factor de shock térmico HSF1 en tumores de mama de hembras caninas de acuerdo a razas muestreadas. Las barras representan los valores de media \pm e.e.m.

Figura 14. Inmunoexpresión del factor de shock térmico HSF1 en tumores de mama de hembras caninas de acuerdo con la histopatología tumoral por diagnóstico cito o histopatológico. Las barras representan los valores de media \pm e.e.m.

Figura 15. Imágenes de microscopía óptica con técnica de inmunohistoquímica para la detección de la proteína factor de shock térmico HSF1 en tumores de mama de hembras caninas. Imágenes representativas de tumores de tipo a) carcinoma, note la intensa inmunomarcación en células epiteliales de carcinoma (flecha blanca, b) tumor inflamatorio, c) sarcoma, intensa inmunomarcación en células epiteliales (asterisco), d) tumor mixto, intensidad de marrón menor (flecha negra), e)

hiperplasia de células mioepiteliales (muy baja inmunexpresión a negativa inmunexpresión en células epiteliales de conductos y túbulos (flecha negra). Barra de escala: 10 μ m.

RESUMEN

Los tumores de mama en perras son las patologías más frecuentes en la clínica veterinaria, así como en la clínica en mujeres. Dada sus semejanzas en el desarrollo tumoral la perra ha sido propuesta como modelo para comprender los mecanismos involucrados en el desarrollo de la carcinogénesis tumoral en mujeres. Uno de los factores que se vinculan con un mal pronóstico en mujeres es la sobreexpresión del factor de transcripción de shock térmico HSF1. Sin embargo, aún no se ha dilucidado la inmunoeexpresión de dicha proteína en hembras caninas. Por lo tanto, el presente estudio analizó la inmunoeexpresión de HSF1 en tumores de mama en perras. Se utilizaron muestras de tumores mamarios de perras ingresadas al Centro Hospital de la Facultad de Veterinaria (n=28). Las muestras fueron fijadas en formaldehído, incluidas en parafina para realizar la técnica de inmunohistoquímica. A partir de las fichas clínicas se analizó el estatus hormonal (con o sin ovariectomía) edad y raza de las perras, el diagnóstico histopatológico y ocurrencia del tumor (tumor primario o recurrente). El 59 % de los tumores de mama se registró en hembras de 6 a 10 años. Para la técnica de inmunohistoquímica se utilizó anticuerpo primario policlonal de ratón anti-HSF1. Luego se cuantificó el área inmunomarcada de HSF1 (%) mediante programa ImageJ. El mayor porcentaje de tumores de mama fue en perras cruzas (31 %) seguidos por Caniche (7%) y Cocker Spaniel (7%). El 59% de los tumores se presentó en hembras no ovariectomizadas. El 66 % de los tumores analizados fueron neoplasias primarias. Los carcinomas malignos epiteliales fueron la mayoría de los tumores mamarios (77%). En cuanto a la inmunoeexpresión de la proteína HSF1 se localizó en el citoplasma y región perinuclear de células epiteliales y conjuntivas tumorales. La inmunoeexpresión de HSF1 fue mayor en perras de 6 a 10 años, con respecto a perras de 11 a 16 años ($p < 0,05$). Las perras ovariectomizadas presentaron mayor inmunoeexpresión de HSF1 que las no ovariectomizadas ($p < 0,0001$). El factor HSF1 se inmunoeexpresó más en tumores primarios que en recurrentes ($p < 0,0001$). En perras con tumores primarios la inmunoeexpresión de HSF1 fue mayor en ovariectomizadas *versus* no ovariectomizadas ($p < 0,0001$). Esta diferencia también se registró en hembras con tumor recurrente ($p = 0,0005$). Las perras ovariectomizadas de todos los rangos etarios analizados presentaron mayor inmunoeexpresión de HSF1. En conclusión, se determinó que el factor HSF1 se inmunoeexpresó en tumores mamarios de hembras caninas. Dicha inmunoeexpresión aumentó en hembras ovariectomizadas, con tumor primario y de 6 a 10 años. Dado el papel del factor HSF1 en el pronóstico de malignidad, inhibición de apoptosis, senescencia y metástasis el análisis inmunohistoquímico de HSF-1 realizado a tiempo podría determinar un pronóstico temprano de malignidad en tumores mamarios en perras.

Palabras claves: caninos, tumores, glándula-mamaria, HSF1, ovariectomía.

SUMMARY

Mammary gland tumors in female dogs are the most frequent pathologies in veterinary small animal practice as well as in women. Given the similarities in tumor development the bitch has been proposed as a model to better understand the underlying mechanisms in mammary gland tumors in women. One of the main factors involved in poor prognosis in women is the heat shock transcription factor HSF1. However, the expression of this protein in canine females has not yet been elucidated. Therefore, the present study analyzed the immunoreexpression of HSF1 in mammary gland tumors from Veterinary Hospital Center. Tumor samples (n=28) were formalin fixed, paraffin embedded and performed immunohistochemistry technique using mouse polyclonal anti-HSF1 primary antibody. ImageJ quantified the HSF1 immunostained area. The data of clinical record was analyzed including hormonal status (with or without ovariectomy), occurrence of the tumor (primary or secondary tumor), and age of appearance, breed. The main casuistic of mammary tumors were found in 6 to 10 years old adult female's dogs (59 %). Most tumors belong to cross breeds (31%), followed by Poodle (7%) and Cocker spaniel (7%). Mainly tumors belong to ovariectomized female dogs (59%). The primary neoplasia was 66 % of bitches. The epithelial malignant carcinomas were the most frequently type of tumor (77%). The HSF1 factor was localized in the cytoplasm and perinuclear region of epithelial and mesenchymal cells. The immunoreexpression of HSF1 was higher in female dogs of 6 to 10 years, with respect to animals of 11 to 16 years of age ($p < 0.05$). Ovariectomized dogs had higher immunoreexpression of HSF1 than non-ovariectomized ($p < 0.0001$). The HSF1 factor was immunoreexpressed more in primary tumors than in recidivist tumors ($p < 0.0001$). In female dogs with primary tumors the immunoreexpression of HSF1 was higher in ovariectomized *versus* non-ovariectomized ($p < 0.0001$). This difference was also recorded in females with a recurrent tumor ($p = 0.0005$). The ovariectomized dogs of all age ranges analyzed showed higher immunoreexpression of HSF1. In conclusion, HSF1 factor was immunoreexpressed in mammary gland tumors in female dogs. These immunoreexpression rise in ovariectomized bitches, with primary tumor and 6 to 10 years old. Given the role of HSF1 factor in the prognosis of malignancy associated with a inhibition of apoptosis, senescence and metastasis, HSF-1 immunohistochemical analysis performed on time could determine an early prognosis of malignancy in female dogs.

Key words: canines, tumors, mammary-gland, HSF1, ovariectomy

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia de tumores de mama en perras

La importancia de estudiar los tumores de mama en perras, radica en que tienen una alta casuística, siendo los tumores mamarios las neoplasias más frecuentes diagnosticadas en perras en medicina veterinaria (Elgue y col., 2012) y en mujeres a nivel mundial (De Andrés Gamazo 2016). En el Centro Hospital Veterinario de la Facultad de Veterinaria de Montevideo, los tumores de mama representan el 43,8% del total de las neoplasias (Elgue y col., 2012), con registros similares en países europeos (Zatloukal y col., 2005). Aproximadamente el 80% de los tumores de mama en perras se diagnostican en perras mayores de 7 años. Alrededor del 30% de los casos son carcinomas mamarios malignos (Badowska-Kozakiewicz y Malicka 2012). Los principales factores de riesgo asociados con los tumores de mama caninos son la edad del animal, la afectación de los ganglios linfáticos centinela, el tipo histológico del tumor, y el grado de diferenciación de la malignidad histológica (Sorenmo y col., 2011).

1.2. La hembra canina como modelo animal

Estudios recientes proponen al modelo canino como forma de comprender los mecanismos de desarrollo del cáncer en la glándula mamaria de la mujer (Caicedo 2017). En mujeres más del 90% de las muertes por tumor de mama, son atribuibles a las metástasis, por lo que es sumamente importante identificar los pacientes con riesgo de metástasis (Carpenter y col., 2017). En perras como en mujeres la mayoría de los tumores mamarios son epiteliales, comparten similitud morfológica, su incidencia se ve aumentada con la edad, el patrón de metástasis más común comprende los ganglios linfáticos regionales y pulmones.

1.3. Proteínas de shock térmico

Las proteínas de shock térmico (HSP) forman parte de las chaperonas moleculares, son proteínas que tienen en común la capacidad de modificar la estructura y las interacciones de otras proteínas (Badowska-Kozakiewicz y Malicka 2012). La identificación de nuevos marcadores tumorales permite identificar a pacientes con riesgo de tumores mamarios, predecir su pronóstico, evaluar posibles respuestas a nuevas terapias y, por lo tanto, reducir la mortalidad. Las HSP desempeñan un papel esencial en las células, ya que se expresan tanto en condiciones fisiológicas como en condiciones patológicas. Las HSP están altamente expresadas en tumores mamarios, siendo el tema de nuevas terapias en la actualidad (Ciocca y col., 2012).

1.4. El factor de shock térmico HSF1 en el diagnóstico de tumores mamarios

La expresión de las proteínas de shock térmico está regulada por otras proteínas como el factor de transcripción de shock térmico (HSF1) (Ciocca y col., 2013). La sobreexpresión de este factor HSF1 es indicativo de un mal pronóstico y mala respuesta en la terapia al cáncer en humanos (Ciocca y col., 2012).

El conocimiento del factor de shock térmico HSF1 brinda información que ayuda en la comprensión de los mecanismos moleculares que se dan en los tumores de glándula mamaria. Se ha determinado que la HSF1 facilita la supervivencia y la metástasis de las células cancerosas al permitirles adaptarse a las condiciones hostiles (Vihervaara y Sistonen 2014). En este sentido, la activación de HSF1 estimula la evasión de la apoptosis, la senescencia y el fenotipo metastásico (Calderwood y Gong 2012). Se sabe que las células tumorales son propensas a la mutación y muestran una alta actividad de HSF1 según los estudios de (Solimini y col., 2007). Por lo tanto, la activación de HSF1 tiene un rol fundamental en la aparición del fenotipo del cáncer de mama, conocer su mecanismo provee información diagnóstica, y un pronóstico en las hembras con tumores de mama.

Sin embargo, el papel del factor HSF1 en la génesis de los tumores mamarios en perras todavía no se ha dilucidado. Se desconoce el papel de este factor en los tumores de mama en perras con y sin la influencia de las hormonas ováricas. Tampoco hay datos sobre el factor HSF1 en tumores mamarios que ocurren por primera vez o son reincidentes en dicha especie animal.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. Importancia de los tumores de la glándula mamaria en perras y mujeres

La incidencia de los tumores de mama es alta, siendo estas las neoplasias más frecuentes en mujeres, como en perras, viéndose aumentada la incidencia en los últimos años, a nivel mundial (Raduly y col., 2018). Los tumores mamarios tanto en humanos como en animales específicamente en caninos son muy frecuentes en la clínica y de hecho se los considera los tumores en caninos como un buen modelo de análisis para estudios comparativos (Shafiee y col., 2013). En nuestro país la casuística de tumores mamarios en el Centro Hospital Veterinario de nuestra Facultad fue descrita en estudios previos (Elgue y col., 2012). En cuanto a las mujeres, se cree que se diagnostican más de 1.2 millones de casos de tumores de mama a nivel mundial, produciendo unas 500.000 muertes anuales en todo el mundo, siendo la primera o segunda causa de muerte, dependiendo del país (Martín y col., 2015).

2.2. Vinculación de los tumores de glándula mamaria en humanos y en animales

Las hembras caninas y las mujeres comparten ciertas características en lo que refiere a tumores en la glándula mamaria. Se han mencionado como similitudes que la mayoría de los tumores son de origen epitelial, su incidencia se ve aumentada con la edad, el patrón de metástasis más común comprende los ganglios linfáticos y pulmones (Caicedo 2017). Asimismo, se ha mencionado que comparten similitudes a nivel molecular y a nivel histológico, incluyendo la etiología hormonal, la aparición de tumores espontáneos y la relación con el curso de la enfermedad (Raduly y col., 2018). Se considera que los estudios en animales domésticos son muy valiosos como centinelas para estudiar el medio ambiente humano y los riesgos de padecer cáncer de mama según el estilo de vida. A diferencia de los carnívoros, raramente ocurren tumores mamarios en la yegua, oveja, cabras y cerdas (Munson y Moresco 2007).

Existe una homología genética entre caninos y humanos mayor, que entre ambas especies y roedores (Switonski y col., 2004). Además los caninos viven en el mismo entorno que los humanos, por lo tanto también comparten factores de riesgo similares (Mueller y col., 1981). Por lo tanto, las neoplasias mamarias de mujeres y perras tienen similitudes que permiten hacer evaluaciones más significativas, en relación al modelo clásico de roedores (Manohar y col., 2005).

2.3. Tumor de la glándula mamaria en perras

2.3.1. ¿Qué es una neoplasia?

El término neoplasia se define como una masa o tejido anormal de crecimiento excesivo comparado con los tejidos normales y su crecimiento persiste aun

cuando termine el estímulo que lo provocó (Cullen y col., 2002). Este nuevo crecimiento celular determina la formación de un aumento de volumen, clínicamente conocido como tumor o masa, con velocidad de crecimiento variable dentro y entre las neoplasias, de la que depende el comportamiento benigno y maligno del tumor (Baba y col., 2007).

2.3.2. Predisponentes y factores de riesgo para padecer tumor de glándula mamaria en perras

Estatus hormonal

Dentro de los factores predisponentes para la aparición del tumor en la glándula mamaria se destacan la no ovariectomía temprana, la ovariectomía antes del primer estro, asegura de 0 a 5% de riesgo de padecer tumor de mama. Cuando la ovariectomía se hace pasado el primer estro, el riesgo es de 8%, después de 2 o más estros, el riesgo es de 26% (Nunez Ochoa y de Oca Acosta 2012).

Por otra parte, los tratamientos con estrógenos para interrumpir la preñez aumentan el riesgo de aparición de tumores de mama, así como el uso de progestágenos para evitar el estro. Mientras que la pseudopreñez podría incrementar la aparición de lesiones pre-neoplásicas (Hermo y col., 2005).

Edad

La edad es otro factor importante, estudios registran que el mayor porcentaje de tumores se da en perras entre los 6 y 10 años de edad según las muestras recibidas en esos trabajos (Elgue y col., 2012).

Por otra parte, otros autores indican que la edad de inicio puede variar dependiendo de la vida natural. Siendo que la mayoría de los autores refieren a un rango de edad entre los 8 y 11 años, sugiriendo que se trata de una enfermedad maligna del perro de mediana edad o mayor. En lo que respecta a los perros jóvenes, se encontró que tienen más probabilidad de padecer tumores benignos que los perros de edad avanzada. Siendo poco frecuente la presentación de tumores de mama en perras de menos de 5 años, a excepción de aquellas perras tratadas con hormonas exógenas (Sorenmo y col.; 2011).

Nutrición

Otro factor de riesgo puede ser la alimentación ya que la obesidad en los primeros años de vida y un año antes de la aparición de las neoplasias favorece su desencadenamiento, por alteración en el equilibrio y funcionamiento hormonal. También se ha reportado que el consumo de una dieta casera rica en carne de bovino, porcino y escasa en vegetales favorece a la presentación del cáncer (Rostami y col., 1994). Dentro del factor nutrición (Munson y Moresco 2007) también afirman que la dieta sería otro factor a considerar, en herbívoros hay evidencia de que dietas bajas en grasa y altas en fibras vegetales serían

beneficiosas, mientras que en los perros y gatos las dietas son mayormente carne. Estas dietas altas en grasas y bajas en fibras podrían contribuir al desarrollo de cáncer de glándula mamaria en estas especies. Además, algunas mascotas domésticas y de zoológico están sobrealimentadas, lo cual favorecería la obesidad. También, estas especies pueden tener dietas expuestas a carcinógenos ambientales y que contienen altos niveles de hormonas nocivas (Munson y Moresco 2007).

Raza

Las razas pequeñas han sido las mayormente reportadas por diferentes autores como las más predispuestas a sufrir tumores de mama, como son el Cocker Spaniel y Caniche (Salas y col., 2015). Otros autores también sugieren que las razas puras son las más afectadas, dentro de ellas el Caniche, el Teckel y el Pastor Alemán, entre otras (Fernandez, 2013), sin embargo otros estudios refieren que no existe predisposición racial (Ortega, 2013). Por otra parte, estudios han señalado que la incidencia en perras sin raza definida supera a las de razas puras (Mangieri, 1994).

2.3.3. El pronóstico de los tumores de glándula mamaria

El pronóstico de los tumores depende de varios factores involucrados. Por ejemplo, si al momento del diagnóstico el tumor mide menos de 3 cm de diámetro, tiene mejor pronóstico. Por otra parte, según el tipo histológico podemos inferir la agresividad y consecuencias. Dentro de los tumores más comunes encontramos a los carcinomas. Además, de acuerdo con la afectación de los linfonodos o ganglios linfáticos, si las células tumorales colonizan los ganglios regionales se lo asocia a una mayor tasa de recidiva y una baja expectativa de vida. Por último, si presenta metástasis de pulmón, cerebro, hueso u otras regiones, se considera un mal pronóstico para la supervivencia del paciente (Romairone y Cartagena, 2014).

2.3.4. Clasificación histopatológica de tumor de glándula mamaria

La clasificación histológica de los tumores de mama en perras propuesta por (Goldshmidt y col., 2011), fue validada en el año 2017 por Rasotto y colaboradores. En dicho estudio durante dos años se analizó una población de 229 hembras caninas, los tiempos de supervivencia específicos de cada subtipo, la tasa de recurrencia local y metástasis a distancia. El tratamiento principal que se menciona es la extirpación quirúrgica (Rasotto y col., 2017).

Según (Goldschmidt y col., 2011) las neoplasias desde el punto de vista histopatológico se pueden clasificar en los siguientes tipos: neoplasia epitelial maligna, neoplasia epitelial maligna tipo especial, neoplasia mesenquimal maligna (sarcomas), neoplasia mixta maligna (carcinosarcoma), neoplasias benignas, hiperplasia/ displasia, neoplasia de pezón, hiperplasia/displasia del pezón (Tabla 1).

Según otros autores las neoplasias en perras se pueden diferenciar de la inflamación o la hiperplasia. Los tumores benignos y malignos son difíciles de diferenciar, excepto cuando las características celulares de malignidad son muy claras. Las características de malignidad, por ejemplo, en los carcinomas son el acúmulo de células, variación en el tamaño y la forma celular, el tamaño nuclear y un nucléolo grande y evidente (Withrow y Vail, 2009).

Estudios previos determinaron que los tumores mamarios en perras son variados, ya que no solamente tienen carcinomas simples como la mayoría de los mamíferos sino también carcinomas complejos. Los más comunes en caninos son el adenocarcinoma complejo y tumor benigno mixto (tumores de origen epitelial y mioepitelial con diferenciación hacia el cartílago o hueso), son comunes también carcinomas complejos malignos, y carcinomas o sarcomas (Munson y Moresco, 2007).

Tabla Nº 1. Clasificación histopatológica de tumores de mama en perras según Goldshmidt y col., 2011; Romairone y Cartagena, 2014; Withrow y Vail, 2009

Neoplasia	Tipo	Subtipo
1-Neoplasia epitelial maligna	Carcinoma in situ	
	Carcinoma simple	Tubular
		Tubulopapilar
		Cisticopapilar
		Cribiforme
	Carcinoma micropapilar invasivo	
	Carcinoma solido	
	Comedocarcinoma	
	Carcinoma anaplásico	
	Carcinoma complejo adenoma/tumor mixto	
	Carcinoma tipo completo	
	Carcinoma y epiteloma maligno	
	Carcinoma tipo mixto	
Carcinoma ductal		
Carcinoma papilar intraductal		
2-Neoplasia epitelial maligna tipo especial	Carcinoma de celulas escamosas	
	Carcinoma adenoescamoso	
	Carcinoma mucinoso	
	Carcinoma rico en lípidos	
	Carcinoma de células espinosas	Mioepitelioma maligno
		Carcinoma de células escamosas-variedad celular espinosas
	Carcinoma-células espinosas	
	Carcinoma inflamatorio	
3-Neoplasia mesenquimal maligna (sarcomas)	Osteosarcoma	
	Condrosarcoma	
	Fibrosarcoma	
	Hemangiosarcoma	
	Otros sarcomas	
4-Tumor mixto maligno (Carcinosarcoma)	Mezcla de tipos carcinomatoso y sarcomatoso	
5-Neoplasias benignas	Adenoma simple	
	Adenoma intraductal papilar	
	Adenoma ductal	
	Fibroadenoma	
	Mioepitelioma	
	Adenoma complejo	
	Tumor mixto benigno	
6-Hiperplasia/displasia	Ectasia ductal	Dilatación del sistema ductal
	Hiperplasia lobular	Proliferaciones epiteliales benignas con cambios hiperplásicos
	Epiteliosis	
	Papilomatosis	Fibrosis focal
	Fibroadenomatosis	
7-Neoplasia de pezón	Ginecomastia	
	Adenoma	
	Carcinoma	
	Carcinoma con infiltración epidermal	
8-Hiperplasia/displasia de pezón	Melanosis en la piel del pezón	

2.3.5. Descripción de los principales tipos tumorales de glándula mamaria en perra.

A continuación, describiremos algunas de las neoplasias más frecuentes en hembras caninas.

Neoplasias epiteliales malignas

La mayor parte de los tumores mamarios malignos en hembras caninas son clasificados como tumores epiteliales o carcinomas (Goldschmidt y col., 2011).

Carcinoma *in situ*

El carcinoma *in situ* es una neoplasia que consiste en nódulos bien delimitados los cuales no sobrepasan la lámina basal hasta el tejido mamario circundante. Poseen muchas células muy compactas, y están dispuestas en túbulos irregulares. Las células varían de forma, desde poligonal a redondas, cuboides y pueden tener poca cantidad de citoplasma eosinofílico y una alta relación nuclear/citoplasmática. Los núcleos pueden ser hipercromáticos, centrales, redondos u ovalados con cromatina aglomerada y un único nucléolo basófilo central, o pueden ser vesiculares con un pequeño nucléolo. Como sucede comúnmente con el carcinoma *in situ* en otros órganos, hay pérdida de polaridad celular, nuclear y pérdida de la arquitectura normal, con capas de células dentro de los conductos (Goldschmidt y col., 2011).

Carcinoma *simple*

Está compuesto de un solo tipo de célula. Es similar a las células epiteliales lumbinales o mioepiteliales (Goldschmidt y col., 2011).

Carcinoma – Tubular

En el carcinoma tubular las células se disponen mayormente de forma tubular. Estos carcinomas tubulares son carcinomas mamarios comunes en las hembras caninas. El revestimiento de los túbulos suele ser de 1 a 2 células de espesor, y las células son variables. Con respecto a la morfología los núcleos pueden ser hipocrómicos, normocrómicos o hiperocrómicos. Los nucléolos pueden encontrarse solos, muy grandes o múltiples y pequeños. Las células a menudo tienen un citoplasma eosinofílico, y los márgenes celulares son relativamente distintos. La actividad mitótica es también variable, así como también la formación de túbulos, la morfología celular y la tasa mitótica. Estas características son las que forman la base para la clasificación de tipo de carcinoma. El estroma intertubular consiste en vasos y fibroblastos, y puede haber un infiltrado de células plasmáticas, linfocitos y macrófagos. Cuando en la neoplasia las células se infiltran en el tejido mamario circundante, pueden

provocar una respuesta estromal, incluido una proliferación extensa de fibroblastos. La naturaleza infiltrativa de la neoplasia en conjunción con anisocariosis y el aumento de la actividad mitótica es una característica que diferencia a los carcinomas *in situ* de los adenomas y otros carcinomas (Goldschmidt y col., 2011).

Carcinoma ductal

El carcinoma ductal es una neoplasia en la cual se modifican los conductos interlobulares y es la contraparte maligna del adenoma ductal. La población de células neoplásicas está dispuesta en los túbulos, a menudo están recubiertas por una doble capa de células epiteliales que exhiben significativa anisocariosis y anisocitosis; existen también numerosas figuras mitóticas. Áreas focales o multifocales de diferenciación escamosa y queratinización están presentes, con gránulos de queratohialina intracitoplasmáticos dentro de algunas células. La morfología de esta neoplasia es idéntica al carcinoma ductal apócrino de la piel (Goldschmidt y col., 2011).

Neoplasia epitelial maligna tipo especial

Carcinoma inflamatorio

El carcinoma inflamatorio está caracterizado por un curso clínico fulminante, presentación súbita, edema, eritema, firmeza y calor en la mama, con o sin nódulos mamarios. Histológicamente existen varios tipos de carcinomas mamarios que son altamente malignos. Los puntos claves del carcinoma inflamatorio son la invasión de los vasos linfáticos en la dermis por embolia neoplásica. El edema encontrado en la región es causado por el bloqueo los vasos linfáticos superficiales por células tumorales (Goldschmidt y col., 2011). Estas neoplasias tienden a hacer metástasis rápidamente, e invaden estructuras linfáticas de la piel (Lana y col., 2009).

Neoplasia mesenquimal maligna

Los sarcomas (fibrosarcoma, osteosarcoma, sarcoma de otro tipo) son la minoría. Se sugiere que los sarcomas proceden de tejido mioepitelial que ha tenido cambios neoplásicos o de tejido conectivo intralobular. Tampoco hay evidencia de que provenga de un tumor benigno de células mixtas (Lana y col., 2009).

Fibrosarcoma

El fibrosarcoma es una neoplasia poco frecuente, puede surgir de otra neoplasia mamaria ya instalada anteriormente. Presenta una proliferación de células fusiformes, las cuales se disponen de forma entrelazada. Las células neoplásicas presentan los bordes celulares poco marcados, escaso citoplasma fibrilar eosinófilo, núcleos ovalados y nucléolo evidente (Goldschmidt y col., 2011). El origen de este tipo de sarcoma se menciona que puede ser originado de las células mioepiteliales o del tejido conjuntivo (Lana y col., 2009).

Neoplasia mixta maligna

Carcinosarcoma

El carcinosarcoma o tumor mamario mixto maligno este compuesto por dos tipos de células distintas. Por una parte, presenta células morfológicamente similares a los epitelios. Por otra parte, presenta células que se parecen morfológicamente a células del tejido conjuntivo. Este tipo de neoplasia no se presenta comúnmente, pero cuando lo hace por lo general, lo hace como carcinoma u osteosarcoma. Las células de tipo epitelial que lo conforman generan metástasis a través de los vasos linfáticos hacia los ganglios regionales, y pulmones, y las células de tipo mesenquimatosas generan la metástasis vía hematógena a los pulmones (Goldschmidt y col., 2011).

Neoplasias benignas

Los tumores benignos son el adenoma simple y complejo, fibroadenoma y el más común que es el tumor mixto benigno, que tiene un componente epitelial y otro componente mesenquimal de cartílago y/o hueso y/o grasa, componentes originados a partir de una célula madre pluripotencial (Withrow y Vail 2009).

Adenoma simple

Los adenomas simples son tumores mamarios bien demarcados. Las células se encuentran dispuestas en túbulos que a veces presentan una secreción amorfa. El estroma fibrovascular es escaso o moderado, es el que le da soporte. Los túbulos están recubiertos por una sola capa de células cuboides a columnares con moderada cantidad de citoplasma eosinófilo. Los núcleos son centrales, redondos u ovals, con cromatina punteada y un nucléolo central pequeño. La anisocariosis y anisocitosis son mínimas, con pocas mitosis (Goldschmidt y col., 2011).

Tumor mixto benigno

El tumor mixto benigno tiene proliferación de células epiteliales (tubular) y de células mioepiteliales con focos de cartílago y / o hueso. Esta neoplasia presenta más de dos poblaciones celulares y cantidades variables de estroma fibroso. La primera población de células (epiteliales) está compuesta de túbulos y cordones revestidos por células que son de forma cuboidea a columnar y tienen una cantidad moderada de citoplasma eosinófilo. Dichas células presentan núcleos redondos u ovalados con cromatina finamente punteada o marginada y con un solo nucléolo basófilo ubicado en el centro. Anisocariosis y anisocitosis son mínimos. La segunda población de células (mioepiteliales) está compuesta por un huso de células estrelladas con bordes celulares poco demarcados y una cantidad moderada de citoplasma. Los núcleos son redondos a fusiformes con cromatina finamente punteada y un solo nucléolo. Se asocia con estas células una abundante matriz mixoide fibrilar basófila. Hay varios focos en los cuales presenta cartílago y/ o hueso. La presencia de tejido óseo en tumores también se ha registrado en estudios previos en carcinomas donde se determinó la presencia de osteopontina en dichos tumores (Wang et al. 2010). Se sabe que el hueso en tumores mixtos se produce por osificación endocondral del cartílago formado por las células mioepiteliales o por osificación intramembranosa del tejido conectivo del estroma (Goldschmidt y col., 2011).

2.4. Glándula mamaria

2.4.1. Anatomía de la glándula mamaria

La glándula mamaria está formada por complejos mamarios, estos se hayan ubicados bilateralmente de forma simétrica y paralela a la línea media, en la pared ventral del tronco. Las glándulas de los carnívoros se denominan mamas (Konig y Liebich, 2015). Los complejos mamarios derecho e izquierdos, también llamados líneas mamarias, se encuentran divididos por el surco intermamario (Konig y Liebich, 2015). En las perras existen 5 pares de glándulas mamarias que se clasifican según su ubicación de craneal a caudal en: torácica craneal y caudal, abdominal craneal y caudal, e inguinales (Gaona y col., 1999). Esta glándula se encuentra fijada por una extensión variable a la pared ventral del cuerpo, en la pared torácica y la pared abdominal (Konig y Liebich, 2015). Como se mencionó anteriormente la glándula mamaria está formada por distintos complejos mamarios individuales, estos complejos constan de un cuerpo glandular o cuerpo de la mama y un pezón, el tamaño del cuerpo glandular y el largo del pezón van a variar según el animal y también del estado funcional en que se encuentre esa glándula, ya sea en lactación o seca (Konig y Liebich, 2015). Los pezones se encuentran, perforados en sus vértices por 10 a 20 aberturas finas, por las que se succiona la leche (Dyce y col., 2012). La irrigación sanguínea nace principalmente de las arterias torácicas lateral e interna la pudenda externa, algunas arterias menores de otro origen, también pueden

aportar sangre (Dyce y col., 2012). Según (Konig y Liebich, 2015) las principales arterias y venas que irrigan las glándulas mamarias son la torácica interna en donde nace la arteria epigástrica craneal superficial y de la pudenda externa la epigástrica caudal superficial (Figura 1a).

2.4.2. Sistema linfático de la glándula mamaria

Linfonodos axilares

En cuanto al sistema linfático, la linfa de la glándula es llevada hacia los linfonodos regionales. Desde los complejos mamarios torácicos y abdominales craneales la linfa fluye hacia los nódulos linfáticos axilares (Konig y Liebich, 2015).

Linfonodos inguinales

Por otra parte, los complejos mamarios abdominales caudales e inguinales la linfa se vuelca en los nódulos linfáticos inguinales superficiales, los cuales son accesibles a la palpación (Konig y Liebich, 2015).

Mastectomía y remoción de linfonodos regionales

Los linfonodos axilares e inguinales por su ubicación son eliminados frecuentemente cuando se realiza la mastectomía, debido a que las células tumorales migran por los vasos linfáticos y pueden ser detenidas en los linfonodos regionales (Konig y Liebich, 2015) (Figura 1b).

De hecho, la importancia de la extirpación de linfonodos regionales y su vinculación con el diagnóstico de metástasis queda demostrado en numerosos estudios (De Araújo y col., 2015).

Arteria y vena epigástrica craneal superficial

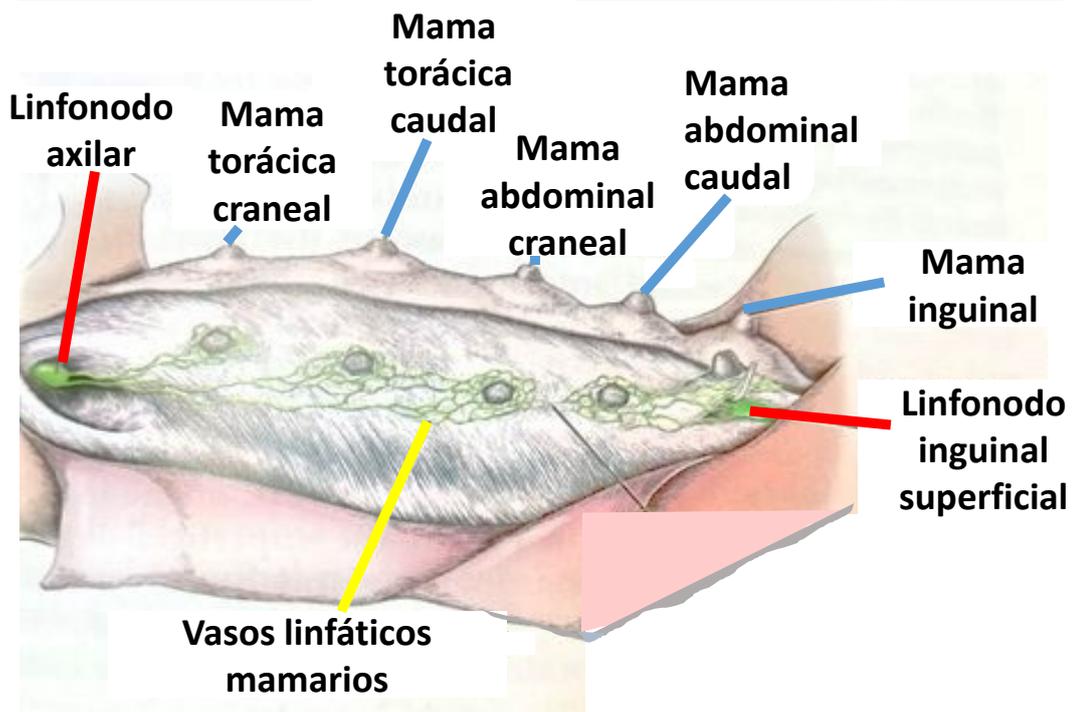
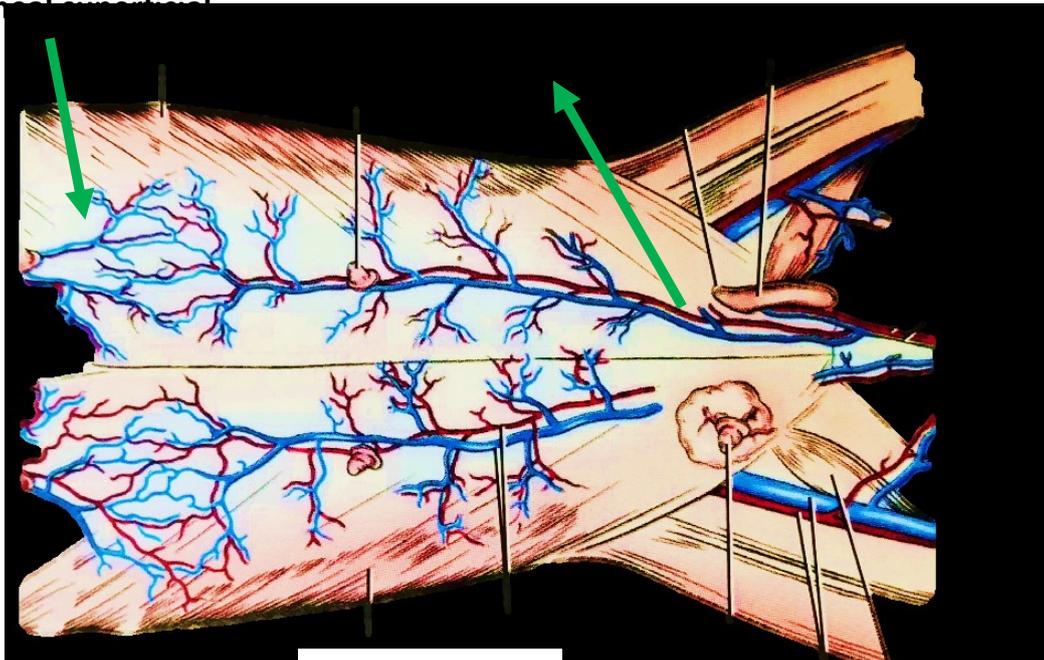


Figura 1. Irrigación de la glándula mamaria canina. a) Irrigación sanguínea, b) Irrigación linfática. Adaptado de (Evans y Lahunta, 2013).

2.4.3. Histología y desarrollo de la glándula mamaria

Las glándulas mamarias son glándulas sudoríparas apócrinas túbulo-alveolares modificadas (Pawlina, 2016), cuya función es la de nutrir a los neonatos y brindarles inmunidad pasiva (Torres y Eslava 2007). Estas glándulas se desarrollan a lo largo de las líneas mamarias embrionarias, ubicándose desde la axila a la ingle extendiéndose lateralmente (Claver y col., 1984).

El desarrollo de la glándula mamaria comienza en la vida fetal bajo el control genético y endocrino, durante la vida posnatal el desarrollo de la glándula suele arrancar junto con la pubertad, pero permanece relativamente sin desarrollarse hasta la preñez. Debido a la actividad ovárica se da lugar a la formación de estrógenos y progesterona (Klein, 2014). Este desarrollo se produce tanto en la hembra como en el macho, pero solo en la hembra llegan a ser funcionales, mientras que en el macho se mantienen en estado infantil, cuando las condiciones son normales (Claver, 1984).

El parénquima de la glándula mamaria está formado por una parte secretora y otra parte conductora/excretora, que varía según la especie. La porción secretora está formada por los alvéolos y la parte inicial de los túbulos (túbulo-alvéolos secretores) que se continúan luego con los conductos intralobulillares, constituidos por revestimiento epitelial (Banks, 1986). Varias unidades túbulo-alveolares secretoras forman lóbulos separados por septos de tejido conjuntivo (Dellmann y col., 1993), (Figura 2a).

Los encargados de la proliferación del sistema tubular son los estrógenos junto con la hormona del crecimiento y los esteroides (Klein, 2014), (Figura 3).

Mientras el animal no está gestando la glándula se encuentra constituida principalmente por un sistema de conductos rodeados por estroma (tejido conjuntivo), al finalizar la gestación esa estructura pasa a estar formada por células alveolares (lactocitos) que sintetizan y secretan calostro y leche (Klein, 2014).

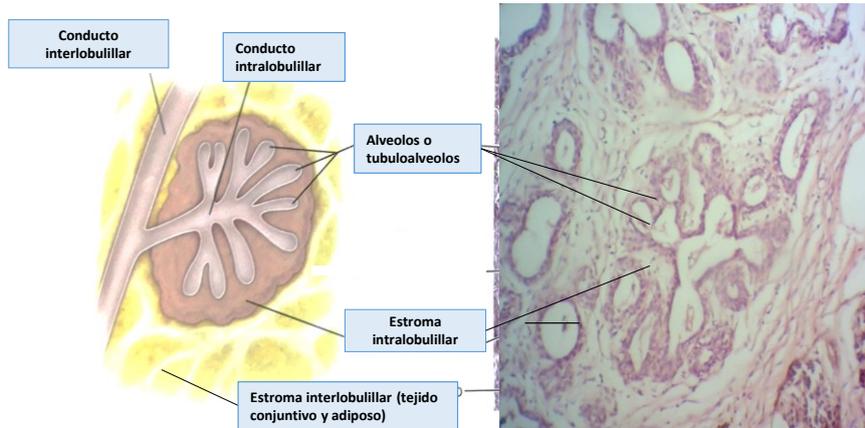
El tejido conectivo que forma el estroma, está constituido por la variedad laxa, que es el que rodea a los conductillos y a los alveolos dentro de cada lobulillo, por otra parte está el tejido conectivo denso y fibroso, que es el que rodea a los conductos, lóbulos y vasos sanguíneos mayores (Claver y col., 1984), (Figura 2a).

En el momento de la lactación los lactocitos adquieren una forma cilíndrica con los bordes apicales dirigiéndose hacia la luz. Los bordes laterales celulares no suelen distinguirse, en cuanto al núcleo se puede encontrar en la zona basal o en el ápice durante la secreción. Es probable encontrar varias células en la luz de la glándula, como por ejemplo células de descamación, macrófagos y leucocitos, formando parte del producto de secreción. Durante la lactación temprana es común encontrar aumentados el número de macrófagos y leucocitos debido a que forman parte del calostro, el cual se encargará de proporcionar inmunidad pasiva al lactante. Por otra parte, cuando finaliza la

lactación disminuye el número de células, no encontrándose en todos los sectores de la glándula la misma actividad celular (Banks, 1986).

En cuanto a la parte secretora de la glándula, el desarrollo alveolar es debido a la progesterona y a la prolactina (Klein, 2014). Varios grupos de túbulo-alvéolos se unen para formar un lobulillo, estos a su vez forman estructuras más grandes llamadas lóbulos, ambos recubiertos por tejido conjuntivo (Klein, 2014). Estos lóbulos se encuentran ubicados en la hipodermis y están formados por glándulas túbulo-alveolares y sus conductos interlobulillares (Bacha y Wood, 2001). Los alvéolos drenan el producto de su secreción hacia un túbulo secretor simple, este túbulo o conducto intralobular está revestido por un epitelio cúbico, a excepción de la primera parte que corresponde a la porción secretora inicial, que está revestida de epitelio cilíndrico. Estos conductos intralobulares drenan hacia el conducto lobular, constituido por un epitelio cilíndrico o cuboideo no secretor (Banks, 1986). Debido a la proliferación del tejido adiposo interlobulillar la glándula mamaria aumenta su tamaño (Pawlina, 2016) (Figura 2b).

a



b

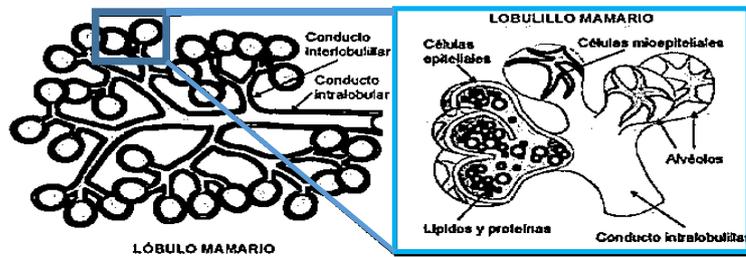


Figura 2. Anatomía de la glándula mamaria: a) Unidad lobulillar del conducto terminal (Adaptado de Pawlina, 2016), b) Esquema representativo de las unidades funcionales de la glándula mamaria (Adaptado de Copola, 2005).

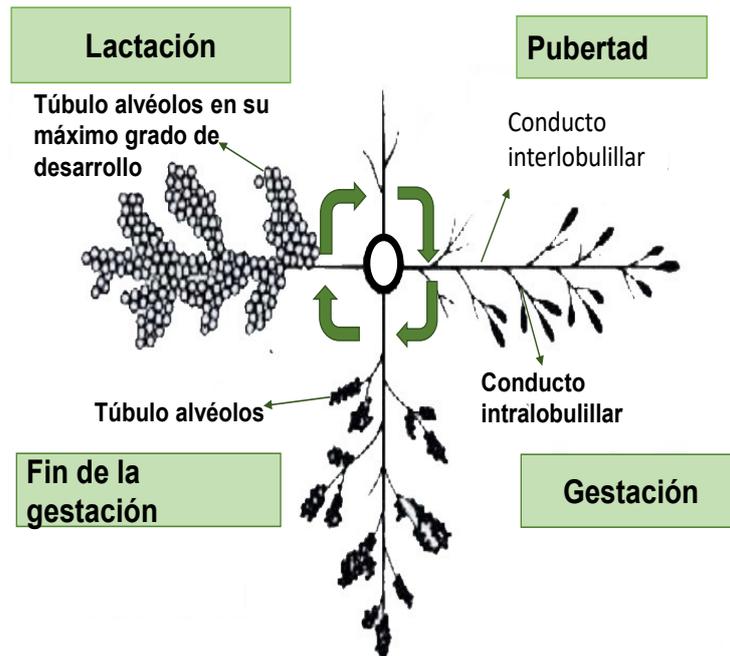


Figura 3. Esquema desarrollo glándula mamaria. Adaptado según Claver y col., 1984.

2.5. Marcadores tumorales

Los marcadores tumorales son sustancias producidas por células cancerígenas, o mismo por otras células en respuesta a algún proceso tumoral o en ciertas situaciones y patologías benignas. Por lo tanto, la mayoría de estos marcadores son producidos por células normales como por células tumorales, viéndose aumentada mucho más su producción en el cáncer. Estas sustancias se pueden encontrar en sangre, orina u otros líquidos biológicos. La importancia de poder conocer estos marcadores, es que tienen la función de evaluar la evolución y respuesta terapéutica del tumor (Lazcano y col., 2016), así como también determinar el pronóstico, poder hacer un seguimiento, y establecer la recidiva. Por lo que en aquellos pacientes con tumores, los niveles de marcadores van a estar elevados en relación a lo normal (Sánchez y col., 2008).

Mientras se desarrolla el tumor y se da la transformación celular, la mayor parte de los marcadores de diferenciación específicos se conservan. Esto hace posible que estas proteínas sean usadas como marcadores tumorales, tanto para tumores mamarios de carnívoros domésticos, como para humanos (Ortega y col., 2013). Esta respuesta al estrés, esta mediada por una multitud de proteínas de shock térmico (Georgopoulos y Welch 1993).

2.5.1. Proteínas de shock térmico HSP

Las HSP forman parte de las chaperonas moleculares, son proteínas que tienen en común la capacidad de modificar la estructura y las interacciones de otras proteínas por lo que podemos decir que gobiernan la integridad del proteoma (Badowska-Kozakiewicz y Malicka, 2012). Condiciones de estrés generan el despliegue de proteínas, el plegamiento incorrecto o agregación, que desencadena una respuesta que conduce a la inducción de la transcripción génica de proteínas. La transcripción del gen HSP esta mediada por la interacción del factor de transcripción de shock térmico HSF1 (Dubey y col., 2015).

De acuerdo al peso molecular, las HSP se pueden clasificar en HSP15-30, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 y HSP100 (Badowska-Kozakiewicz y Malicka, 2012). Las proteínas de la familia HSP70 participan en las decisiones desde plegamiento, degradación y agregación (Liu y col., 2013). Cuando la capacidad de las chaperonas se ve superada porque muchas proteínas están dañadas, se da la muerte celular o apoptosis, por ejemplo, cuando solo el 5% del total de proteínas celulares han experimentado agregación (Mosser y Morimoto, 2004).

En condiciones fisiopatológicas las HSP tienen funciones claves, como la carcinogénesis y forman parte de un grupo de marcadores moleculares en el tratamiento del cáncer. Las HSP participan en el plegamiento de proteínas y su metabolismo en condiciones normales. La inducción de un subgrupo de HSP en condiciones de estrés, permite amplificar los niveles de reparación y replegamiento del polipéptido dañado. La sobreexpresión de estas proteínas es

un mal pronóstico y mala respuesta en la terapia al cáncer. La existencia de una elevación en la expresión en las células malignas, tiene una función clave en cuanto a la protección contra la apoptosis (Ciocca y col., 2012).

La expresión de las HSP frente al carcinoma mamario es debida en gran medida a la proliferación de proteínas mutantes mal plegadas y oncoproteínas sobre expresadas, que desencadenan la transcripción de los genes de HSP (Calderwood y Gong 2012).

2.5.2. Factor de transcripción de shock térmico o heat shock factor 1 (HSF1)

Un aumento de la expresión de HSP en carcinomas de mama considerados malignos depende del factor de transcripción de shock térmico HSF1, al promover la proliferación de proteínas mutantes mal formadas y oncoproteínas (Wang y col., 2015).

2.5.2.1. Gen de Hsf1 en perras

La proteína HSF1 es codificada por el gen *HSF1* que se encuentra en el cromosoma 13: 37, 724, 540-37, 745, 486 de cadena frontal, este gen tiene dos transcritos. En primer lugar, el transcrita primario *HSF1-201* que tiene un ID de transcripción de ENSCAFT0000002448.4, con 2493 pares de bases presenta 14 exones y 13 intrones y que codifica para una proteína de 554 aminoácidos. En segundo lugar, el transcrita primario *HSF1-202* que tiene un ID de transcripción de ENSCAFT00000045342.1, con 1584 pares de bases con 13 exones y 12 intrones que codifica para una proteína de 527 aminoácidos, (Ensemble).

Se identificaron sitios blanco de *HSF1* en el genoma completo en líneas celulares de cáncer de mama humano con diferentes capacidades metastásicas, y también se demostró que la transcripción dirigida por HSF1 es profundamente diferente en células malignas en comparación con las células que están expuestas al estrés por calor (Mendillo y col., 2012).

2.5.2.2. Estructura molecular del factor de transcripción HSF1

El HSF1 tiene un papel central en la mediación de la respuesta protectora a las tensiones conformacionales de proteínas en los eucariotas. HSF1 consiste en un dominio de unión al ADN N-terminal (DBD), un dominio de oligomerización de bobina enrollada, un dominio regulador y un dominio de transactivación. En caso de estrés, HSF1 se trimeriza a través de su dominio de bobina enrollada y se une a los promotores de los genes que codifican proteínas de shock térmico (Neudegger y col., 2016).

En condiciones normales el factor de transcripción HSF1 se encuentra en el citoplasma como molécula monomérica latente (Dubey y col., 2015). Cuando se producen situaciones que desequilibran la homeostasis del plegamiento de las

proteínas citosólicas, las chaperonas se dirigen a otro lugar. El HSF1 se trimeriza y entra al núcleo, con el fin de impulsar la transcripción de genes implicados en el plegamiento de proteínas, la degradación de las proteínas mal plegadas así, como otras proteínas que regulan la tolerancia al estrés (Steele y col., 2008). La HSF1 regula dos conjuntos de genes, uno relacionado al estrés como son las HSP y el otro está involucrado en procesos celulares, como el ciclo celular, la señalización, el metabolismo, la adhesión y la traducción de proteínas (Wang y col., 2015), (Figura 4).

En las células estresadas el HSF1 está hiperfosforilado, lo cual es esencial en la transcripción. HSF1, se desfosforila en serina 303, cuando las células son sometidas a estrés, se fosforila en serina 326. Por otra parte, antes de esto HSF1 se fosforila en serina 320 como paso de activación adicional, a través de la proteína quinasa A (Ciocca y col., 2013). Como factor de transcripción HSF1 está activo solo en el núcleo (Santagata y Hu 2011). La disminución de HSF1 en varias líneas celulares cancerígenas produjo una inhibición importante del crecimiento tumoral (Meng y col., 2011).

Por lo tanto, las funciones oncogénicas del HSF1 se basan en que promueven la supervivencia celular protegiendo el proteoma, promueve la glucólisis de las células cancerosas, regula la traducción y promueve un microambiente tumoral maligno (Carpenter y col., 2017).

HSF1 colabora en la supervivencia del organismo frente a desafíos ambientales, considerándose como efectos benéficos al permitir a la célula resistir y sobrevivir en condiciones de estrés (Lindquist, 1986).

Diversos estudios han demostrado en humanos que la disminución de HSF1 en líneas celulares cancerosas, perjudican su crecimiento y supervivencia, teniendo poco efecto en las células normales. La oncogénesis se puede potenciar en una variedad de formas, a través de la inducción de HSP por HSF1. Por lo tanto la capacidad de HSF1 tiene importancia en el momento de permitir a los tumores malignos, la supervivencia (Dai y col., 2007).

Estudios recientes han determinado que HSF1 es necesario para regular las señales anormales de las células tumorales, inhibir la apoptosis de las células tumorales y promover la metástasis y el metabolismo de las células tumorales. También se encarga de aumentar la tasa de proliferación y crecimiento del tumor, evidenciado por células HSF1-knockdown donde dicho crecimiento disminuyó significativamente, lo que indica que HSF1 puede estar involucrado en la proliferación de células del tumor mamario (Wang et al. 2018).

La manera en que aumentan los niveles de HSF1, favorece la supervivencia de las células cancerosas al estrés, debido a que coordina varios procesos celulares fundamentales como son, el metabolismo de la glucosa, el control del ciclo celular, la traducción de proteínas y la biogénesis de ribosomas (Santagata y Hu 2011).

Por lo que la activación de HSF1 tiene un rol fundamental en la aparición del fenotipo del cáncer de mama, que incluye la señalización de células activadas,

la capacidad mediada por HSP para evitar la apoptosis, la senescencia y una dirección dependiente de HSF1 en la actividad de transcripción hacia un fenotipo metastásico. (Calderwood y Gong, 2012).

Asimismo, se ha demostrado que HSF1 se encuentra activo en células metastásicas y células madre cancerosas, y puede promover la progresión tumoral a un fenotipo agresivo (Carpenter y col., 2017).

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar la inmunoexpresión del factor de transcripción HSF1 en tumores de mama extirpados de perras que ingresan al Centro Hospital Veterinario de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República.

Objetivos específicos

- Localizar y cuantificar la inmunoexpresión del factor de transcripción HSF1 en tumores mamarios de perras.
- Correlacionar la inmunoexpresión del factor de transcripción HSF1 con edad, raza y estatus hormonal del animal, ocurrencia e histopatología tumoral.

4. HIPÓTESIS

La factor de shock térmico HSF1 (factor de transcripción HSF1) se expresa en tumores de mama de perras, y puede variar de acuerdo con distintos factores.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Animales y diseño experimental

Los muestreos contaron con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay presentado en el año 2015, número de expediente: 111130-000855-14. Se utilizaron 28 hembras caninas (n=28), que ingresaron a la consulta del Centro Hospital Veterinario de la Facultad de Veterinaria UdelaR, desde el año 2014 al 2018, y que fueron derivadas a cirugía, por presentar tumor de mama al examen clínico. El rango etario de los animales fue de 2 a 16 años con una media de 9,2 años, presentando 11 perras ovariectomía.

5.2. Análisis de fichas clínicas

Se analizaron las fichas clínicas de cada animal, extrayéndose los siguientes datos: número de caso clínico, edad al momento de la cirugía, raza, ovariectomía (si/no), aparición del tumor por primera vez (tumor primario) o por segunda vez (tumor reincidente), diagnóstico histopatológico (Tabla 2).

5.3. Obtención de muestras y procesamiento histológico

El procesamiento histológico se realizó en el Área Histología y Embriología, Facultad de Veterinaria, Montevideo, a partir de las muestras de tumor de mama obtenidas en la cirugía. Las muestras obtenidas de tumores mamarios (de 0,5 a 1 cm³) fueron fijadas por inmersión en formaldehído bufferado (pH 7,4) durante 24 horas. Luego se realizó el procesamiento histológico, que incluyó la deshidratación sumergiendo las muestras en concentraciones crecientes de etanol (70°, 95° y 100°), seguido de inmersión en cloroformo por 24 hs y posterior impregnación e inclusión en 3 baños sucesivos de parafina líquida por 1:30 horas (30 minutos cada una) (Tissue-Tek VIP Processing Embedding Medium, Sakura Finetek U.S.A., INC) hasta la confección de los bloques.

5.4. Microtomía

Se realizaron cortes a 5 µm de espesor con un micrótopo (Leica Reichert Jung Biocut 2030, Wetzlar, Germany). Se colocaron en un baño de flotación de agua corriente a 37°C. Luego se levantaron los cortes en portaobjetos. Se procedió al secado de las láminas en estufa para evitar el desprendimiento. Se obtuvieron 20 cortes histológicos por muestra de tumor de glándula mamaria.

5.5. Coloración de Hematoxilina-Eosina

Las secciones de tumores mamarios fueron desparafinados en xilol, sumergidos en concentraciones decrecientes de etanol (100°, 95° y 70°) hasta el pasaje por agua destilada. Luego se realizó la coloración con la Hematoxilina de Mayer por 6 minutos y el virado en agua corriente por 6 minutos. Posteriormente, se coloreó con la Eosina por 1 minuto y luego se deshidrató en concentraciones crecientes de etanol (70°, 95° y 100°). Finalmente se sumergieron en xilol para su posterior montaje (Entellan™) y colocación de cubreobjetos.

5.6. Preparación de soluciones buffer, alicuotado y dilución de anticuerpo

Previo a los ensayos de inmunohistoquímica se realizó la preparación de soluciones buffer: Buffer fosfato salino PH 7,4 (PBS) y Buffer citrato de sodio 0,1 M, pH 8. Posteriormente se realizó el alicuotado del anticuerpo primario policlonal de ratón anti-HSF1 (ab52813 Abcam, USA) en tubos Eppendorf en freezer a -20°C para ser utilizados posteriormente. Luego se llevó a cabo la dilución del anticuerpo, con una concentración final de 1:100 µl previo a la realización de la técnica de inmunohistoquímica.

5.7. Técnica de inmunohistoquímica

Los cortes de tumores mamarios fueron colocados en estufa a 60°C y desparafinados en xilol por 30 minutos respectivamente. Luego se sumergieron en concentraciones decrecientes de etanol por 2 minutos cada uno (100°, 95°, 70°). La recuperación antigénica se realizó por calor en microondas inmersos en una solución de buffer citrato 0,01M pH 6 (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 anti-HSF1 (policlonal de ratón, ab52813, Abcam, USA) dilución de uso 1:100 µl. La incubación se realizó por 18 horas a 4°C en cámara húmeda.

Al día siguiente se incubó con anticuerpo secundario biotilado anti-ratón y luego con el complejo enzimático streptavidina-peroxidasa durante 30 minutos cada uno (kit ratón HRP/DAB, ab 64259 Abcam, USA). Luego se realizó el revelado con solución de cromógeno de Diaminobenzidina 1 minuto (kit ratón HRP/DAB, ab 64259 Abcam, USA). La reacción de DAB se observó a simple vista y se corroboró mediante microscopio óptico, cortando la reacción con agua corriente. Posteriormente se procedió a la contracoloración nuclear con el colorante Hematoxilina de Harris durante 20 segundos. Luego se realizó el virado en agua corriente, hasta azuleamiento. Posteriormente, se sumergieron las láminas en concentraciones crecientes de etanol (70°, 95°, 100°) y luego se sumergieron en xilol. El montaje se efectuó con medio de montaje Entellan™ (MERCCK, Germany) para colocación de cubreobjetos. Entre cada paso se realizaron 2 lavados de solución de PBS durante 5 minutos. Para verificar la especificidad de la técnica de inmunohistoquímica se realizaron controles negativos se sustituyó el anticuerpo primario por buffer fosfato en una lámina.

5.8. Captura de imágenes de preparaciones de inmunohistoquímica

Las imágenes digitales se obtuvieron con 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 870 fotos a 400 aumentos, del total de las muestras de tumor de mama.

5.9. Análisis de imágenes de inmunohistoquímica

Se realizó el análisis descriptivo de la localización del factor HSF1 a partir de las imágenes de los tumores mamarios observadas, determinando la localización intracelular y el tipo celular en cual se observó la inmunomarcación.

Por otra parte, se realizó el análisis cuantitativo de la inmunoexpresión del factor HSF1 a partir de las imágenes capturadas previamente, determinando el

porcentaje de área inmunomarcada para dicho factor en el parénquima tumoral mamario. Para ello se utilizó el software de análisis de imágenes ImageJ (ImageJ 1.52g, Wayne Rasband open Source, National Institutes of Health, EEUU, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) que incluyó la creación de una macro automatizando la detección de coloración marrón (DAB positivos). El proceso incluye umbralizar, segmentar, binarizar y medir el área inmunomarcada. Posteriormente se aplicó dicha macro mediante un proceso denominado “batch” a cada carpeta de imágenes para cada muestra de tumor mamario.

5.10. Análisis de datos

5.10.1. Casuística

En primer lugar, se analizó la casuística presentada en las perras con tumores mamarios, previamente al análisis de la inmunoexpresión de HSF1. Se incluyeron datos de edad y estatus hormonal al momento de la mastectomía, raza, ocurrencia del tumor (por 1ª vez o recidiva o reincidencia) y tipo tumoral.

5.10.2. Inmunolocalización de factor de transcripción HSF1

Se analizó la localización de HSF1 mediante la observación de la coloración marrón (regiones de inmunomarcación). En la observación de las láminas de los preparados con inmunohistoquímica, analizamos las zonas inmunomarcadas, identificamos estructuras que forman parte de la glándula.

5.10.3. Análisis estadístico

Se analizó la variable continua área inmunomarcada de HSF1 (%) en los tumores mamarios analizados. Si bien uno de los objetivos iniciales fue determinar los efectos de los factores edad, raza, estatus hormonal, ocurrencia del tumor, histopatología sobre la inmunoexpresión de la HSF1, el número de animales por grupo (n), no fue suficiente como para realizar estudios estadísticos. Por lo tanto se evaluaron las siguientes variables categóricas o factores.

1)	Edad (años)	n
	2 a 5	5
	6 a 10	15
	11 a 16	8
2)	Estatus hormonal	
	Sin ovariectomía	18
	Con ovariectomía	10
3)	Ocurrencia del tumor	
	Tumor primario	17
	Tumor recurrente	11

Se hicieron análisis *post hoc* analizando las interacciones entre los distintos factores analizados edad, estatus hormonal y ocurrencia del tumor.

- Estatus hormonal y ocurrencia
- Edad y ocurrencia
- Edad y estatus hormonal

Se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) mediante el programa estadístico SAS para Windows (v9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, EEUU) donde se observaron los efectos de los factores antes mencionados y las interacciones entre ellos. Se realizaron los análisis *post hoc* mediante LSMEANS. Todos los resultados fueron expresados como medias \pm error estándar de la media (eem) y se estableció un nivel de significación de $P < 0,05$.

5.10.4. Análisis descriptivo de la inmunexpresión de la proteína HSF1

Se realizó la estadística descriptiva de la variable área inmunomarcada para HSF1 cuando el número de animales fue menor o igual a 2 por grupo por factor raza e histopatología. Los datos fueron descriptos como media \pm error estándar de la media (eem).

1) Raza	n
Cruza	9
Caniche	4
Cocker spaniel	4
Pitbull	2
Ovejero alemán	2
Golden Retriever	2
Labrador	2
Mastín Napolitano	1
Rotweiler	1
Dóberman	1

2) Histopatología

Adenocarcinoma	25
Sarcoma	2
Hiperplasia de Células mioepiteliales (control)	1

6. RESULTADOS

6.1 Resultado del análisis de casuística de tumores mamarios en perras

6.1.1. Resultados de casuística según edad

El 53% de los tumores mamarios se registró en hembras de 6 a 10 años, seguido por un 29 % de hembras de 11 a 16 años y por último el 18 % se observó en hembras de 2 a 5 años (Figura 5a).

6.1.2. Resultados de casuística según raza

El mayor número de casos de tumores mamarios se registró en animales cruza (32%), seguidos por Caniche y Cocker Spaniel (14% en ambos). Si consideramos la suma de los casos clínicos a pertenecientes a perras de razas definidas corresponde al 68%(Figura 5b).

6.1.3. Resultado de casuística según estatus hormonal

Las hembras sin ovariectomía representaron el 64% de los casos clínicos de tumores mamarios (Figura 6a).

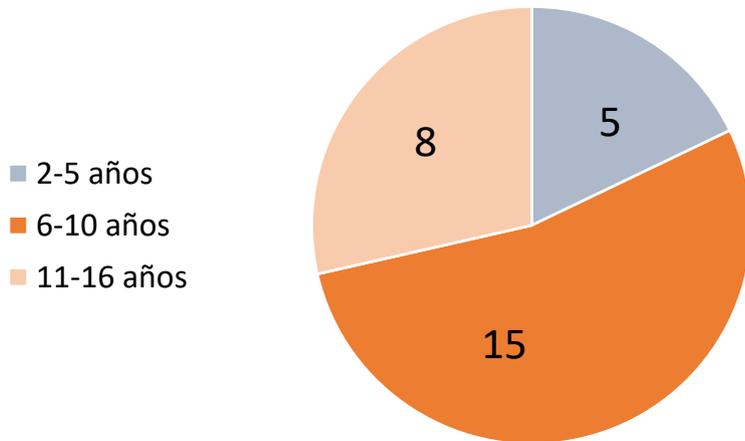
6.1.4. Resultados de casuística según ocurrencia del tumor

Los tumores primarios representaron el 61 % de los casos estudiados con respecto a los tumores reincidentes (Figura 6b).

6.1.5. Resultados de casuística según histopatología

De acuerdo al diagnóstico histopatológico el 93 % de los tumores correspondió a adenocarcinomas, seguido por un 7 % de sarcomas (Figuras 7 y 8).

a **Edad**



b **Raza**

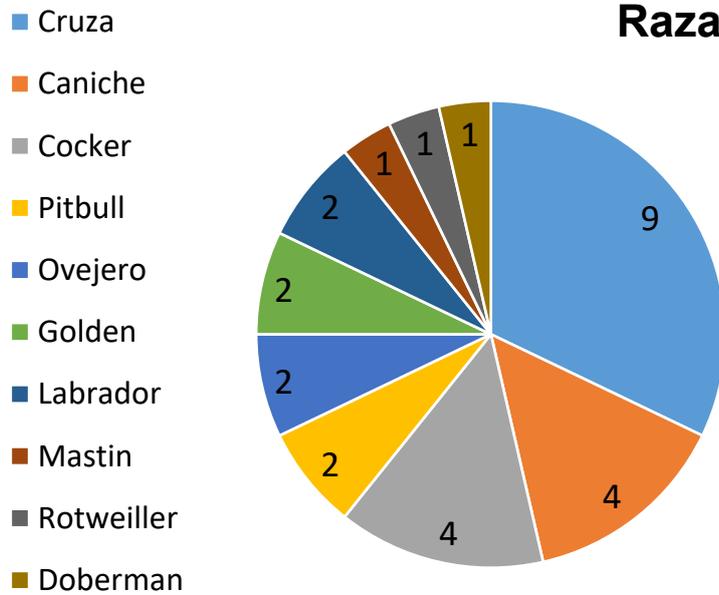
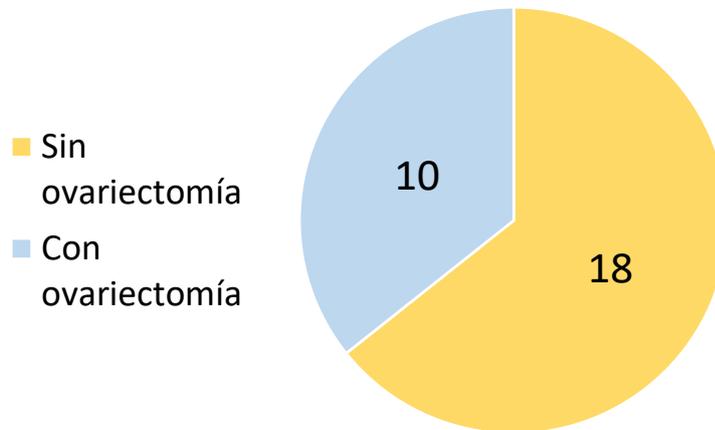


Figura 5. Casuística de tumor de glándula mamaria de hembras caninas ingresadas en Centro Hospital de Facultad de Veterinaria (2014 – 2018)
a) Según edad (joven adulta/adulta/anciana), b) Según razas muestreadas.

a

Estatus Hormonal



b

Ocurrencia del tumor

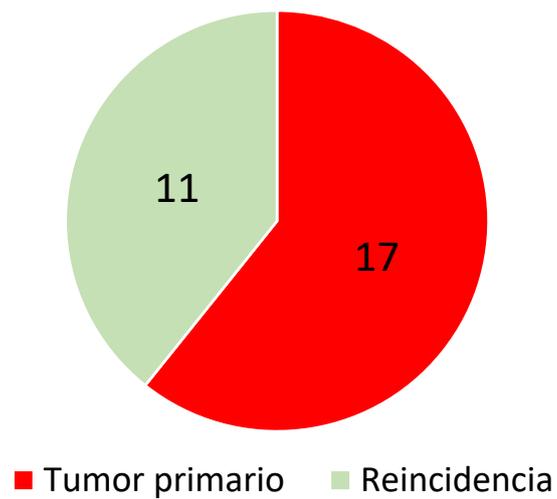


Figura 6. Casuística de tumor de glándula mamaria de hembras caninas ingresadas en Centro Hospital de Facultad de Veterinaria (2014 – 2018). a) Según estatus hormonal (con ovariectomía / sin ovariectomía). b) Según ocurrencia del tumor (primario / reincidencia).

Histopatología

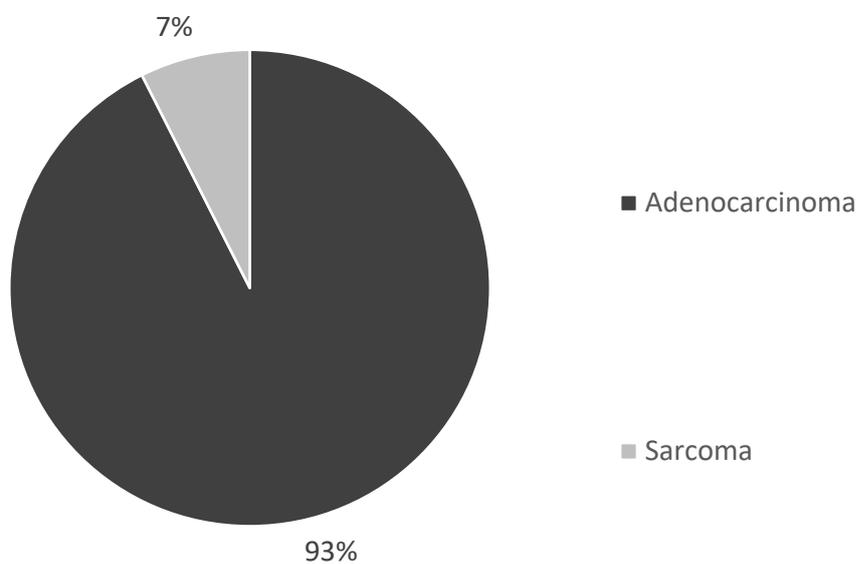


Figura 7. Casuística de tumor de glándula mamaria de hembras caninas ingresadas en Centro Hospital de Facultad de Veterinaria (2014 – 2018) según el diagnóstico histopatológico.

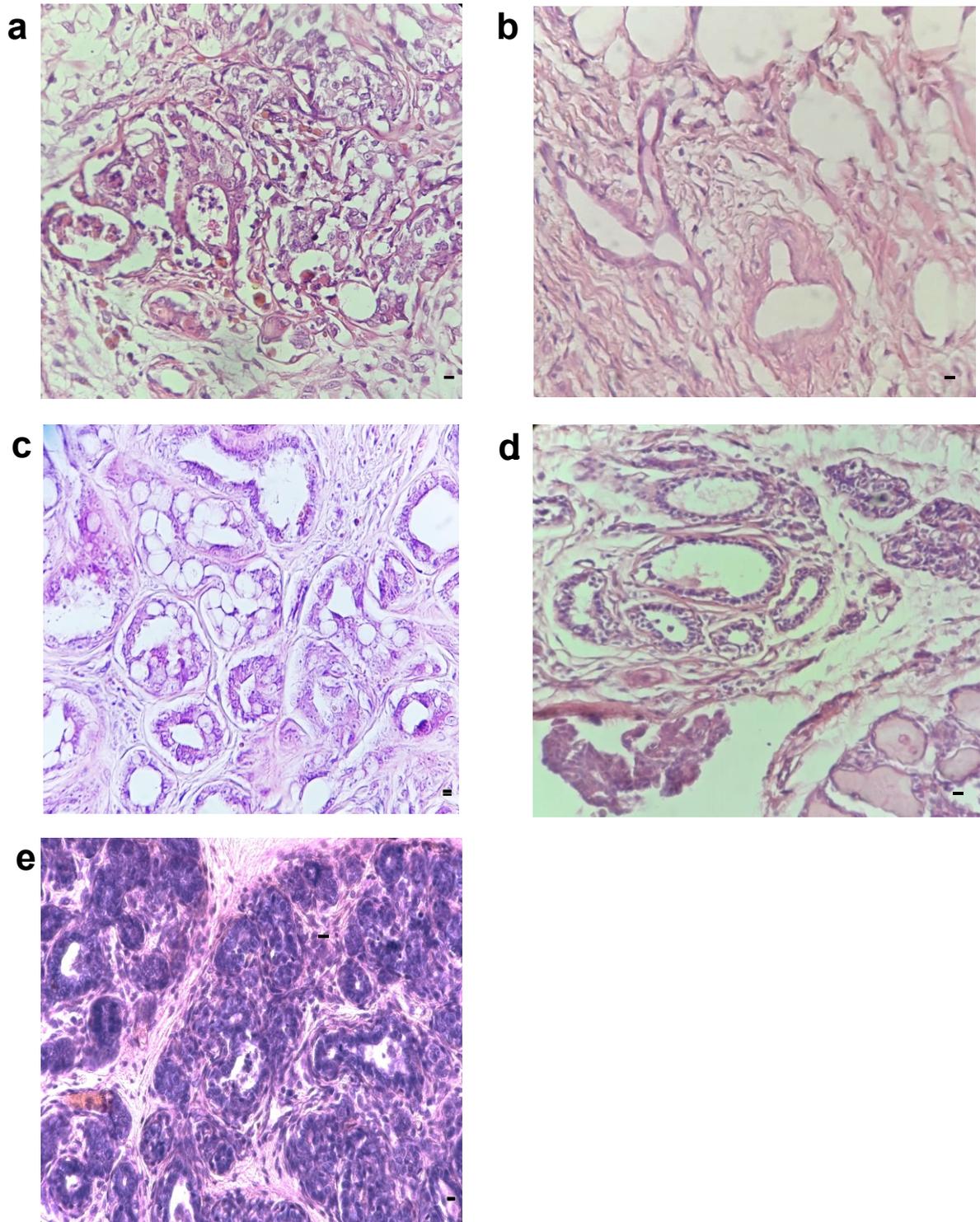


Figura 8. Imágenes histológicas con tinción de Hematoxilina- Eosina de neoplasias de glándula mamaria de hembras caninas ingresadas en Centro Hospital de Facultad de Veterinaria durante los años 2014 a 2018: a) Caso N° 040/15 Pitbull, 8 años, ovariectomizada, carcinoma (primario). b) Caso N° 409/ 17 Golden Retriever, 7 años, no ovariectomizada, tumor inflamatorio (primario). c) Caso N°089/17 Cocker Spaniel, 15 años, ovariectomizada, sarcoma (primario). d) Caso N° 288/18 Cocker Spaniel, 10 años, no ovariectomizada, tumor mixto (primario). e) Caso N° 277/14, Caniche, 9 años, no ovariectomizada, hiperplasia de células mioepiteliales (primario). Barra de escala =10 μ m. Aumento 40X.

6.2 Resultado descriptivo de la inmunolocalización del factor de shock térmico HSF1 en tumores mamarios

Localización del factor HSF1 en células de epitelios de adenómeros glandulares

La inmunolocalización del factor HSF1 se observó de manera intensa en el citoplasma de las células epiteliales de los adenómeros glandulares (Figura 9a). Además, se observó inmunomarcación intensa en epitelio glandular hiperplásico (Figura 9b).

Localización del factor HSF1 en células epiteliales de conductos

Se observó intensa inmunomarcación perinuclear en células epiteliales de conductos (Figura 9a, d).

Localización del factor HSF1 en células del estroma conjuntivo

Se observó inmunomarcación más leve en citoplasma de células del tejido conjuntivo (Figura 9c). Asimismo, se observó también intensa inmunomarcación perinuclear en células conjuntivas (Figura 9e, e').

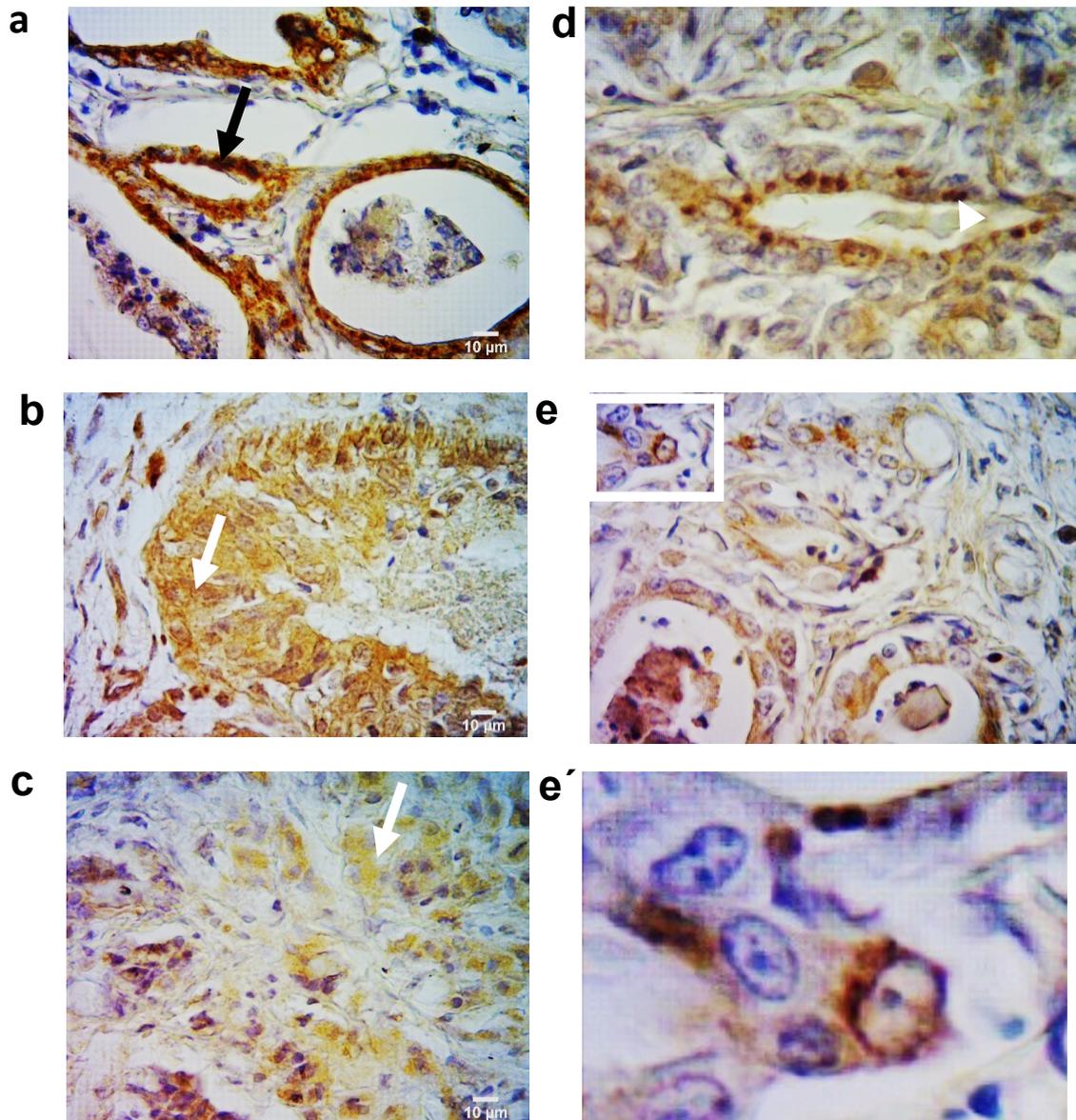


Figura 9. Inmunolocalización del factor HSF1 en tumor de glándula mamaria de hembras caninas. Imágenes de inmunohistoquímica de tumores mamarios para indicar la inmunolocalización de la proteína: a) intensa inmunomarcación en citoplasma de células epiteliales de adenómeros glandulares (flecha negra), b) inmunomarcación intensa en epitelio glandular hiperplásico (flecha blanca), c) inmunomarcación más leve en citoplasma de células conjuntivas (flecha blanca), d) inmunomarcación perinuclear en células conjuntivas (cabeza de flecha), e) intensa inmunomarcación perinuclear en células conjuntiva (recuadro), e') detalle de imagen de célula conjuntiva con intensa inmunomarcación perinuclear. Barra de escala =10µm. Magnificación 40X.

6.3. Resultados cuantitativos del área inmunomarcada del factor de shock térmico HSF1 en tumor de mama en hembras caninas.

6.3.1. Inmunoexpresión del factor HSF1 según la edad

La mayor inmunoexpresión del factor HSF1 se registró en perras adultas de 6 a 10 años, seguido por perras de 2 a 5 años ($p=0,0002$), siendo menor la inmunoexpresión en perras de 11 a 16 años ($p<0,0001$) (Figura 10).

6.3.2. Inmunoexpresión del factor HSF1 según estatus hormonal: ovariectomizadas versus no ovariectomizadas

El área inmunomarcada del factor HSF1 (%) fue mayor en hembras con ovariectomía con respecto a hembras sin ovariectomía ($p <0,0001$) (Figura. 11a).

6.3.3. Inmunoexpresión del factor HSF1 según la ocurrencia del tumor mamario

El área inmunomarcada del factor HSF1 (%) fue mayor en tumores primarios con respecto a tumores reincidentes ($p <0,0001$) (Figura. 11b).

6.3.4. Inmunoexpresión del factor HSF1 según la interacción de estatus hormonal y edad

El área inmunomarcada del factor HSF1 (%) fue mayor en hembras para los 3 rangos etarios. En primer lugar, el HSF1 (%) fue mayor entre las hembras de 6 a 10 años con ovariectomía en comparación con hembras no ovariectomizadas ($p=0,0002$). Esta diferencia entre hembras sin ovariectomía y con ovariectomía fue similar a lo registrado entre las perras de 2 a 5 años y de 11 a 16 años siendo mayor el área de HSF1 en ambos casos en las perras con ovariectomía ($p<0,0001$) (Figura 12a).

6.3.5. Inmunoexpresión del factor HSF1 según la interacción de estatus hormonal y ocurrencia del tumor

El área inmunomarcada del factor HSF1 (%) en perras con tumores primarios fue mayor en ovariectomizadas *versus* no ovariectomizadas ($p<0,0001$). Esta diferencia entre hembras sin ovariectomía y con ovariectomía también se registró en hembras con tumor reincidente ($p=0,0005$) (Figura 12b).

6.3.6. Inmunoexpresión del factor HSF1 según la interacción de edad y ocurrencia del tumor

En primer lugar, el área inmunomarcada del factor HSF1 (%) fue mayor en hembras de 6 a 10 años con tumor primario con respecto a hembras con tumor reincidente ($p<0,0001$). Esta diferencia entre perras con tumor primario y reincidente fue similar en el rango etario de 2 a 5 años ($p<0,0001$). Sin embargo, no se registró dicha diferencia entre hembras de 11 a 16 años (Figura 12c).

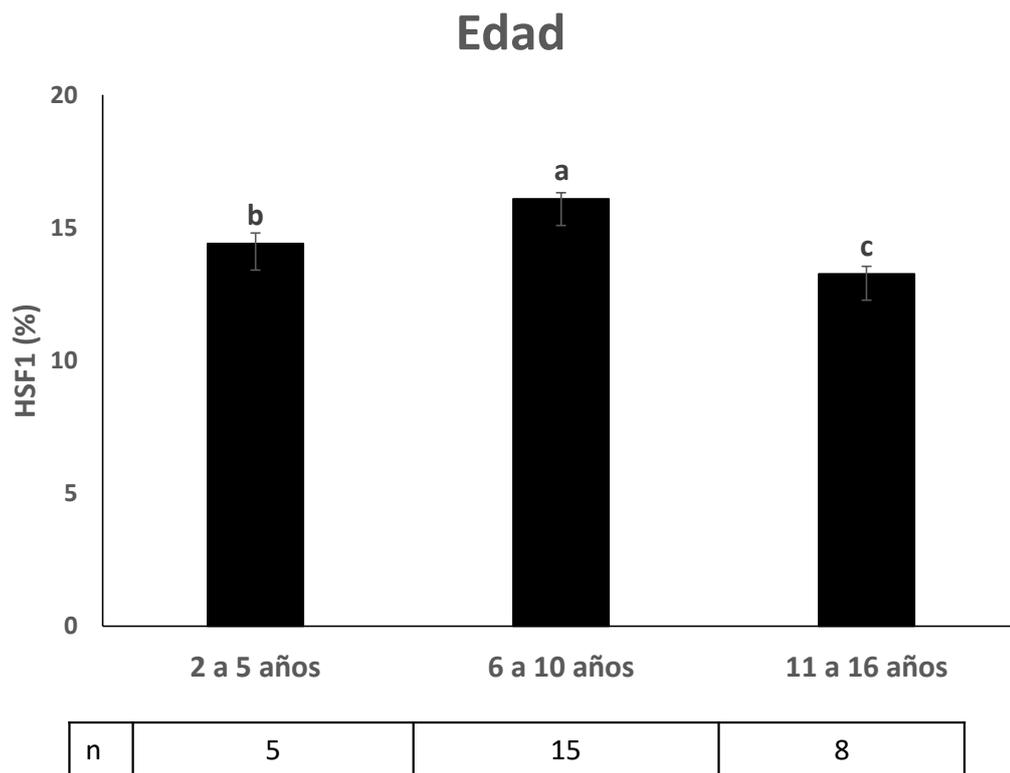
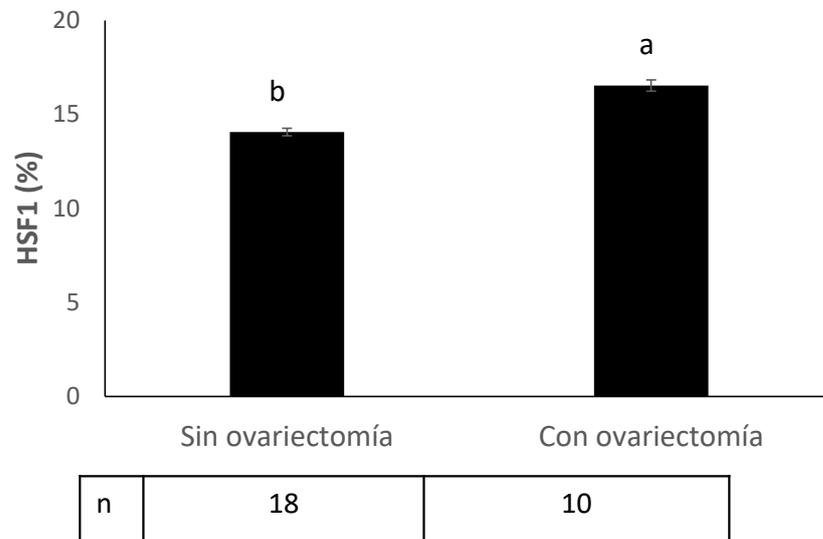


Figura 10. Inmunoexpresión del factor de shock térmico HSF1 en tumores de mama de hembras caninas de acuerdo a edad (2 a 5 años/ 6 a 10 años/ 11 a 16 años). Las barras representan los valores de media \pm e.e.m. Diferentes literales sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

a

Estatus hormonal



b

Ocurrencia del tumor

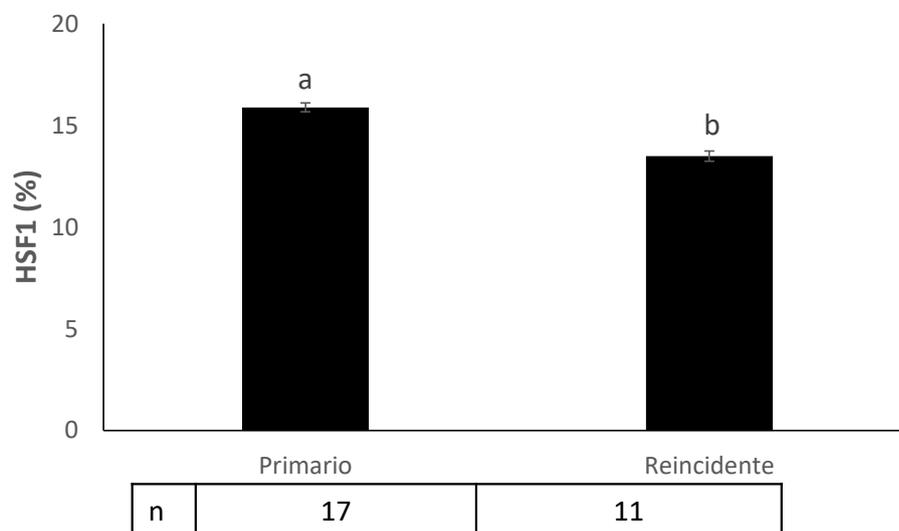


Figura 11. Inmunoexpresión del factor de shock térmico HSF1 en tumores de mama de hembras caninas de acuerdo a estatus hormonal ocurrencia del tumor. a) Según estatus hormonal (sin ovariectomía / con ovariectomía) b) Según ocurrencia del tumor (primario / reincidente). Las barras representan los valores de media \pm eem. Diferentes literales sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

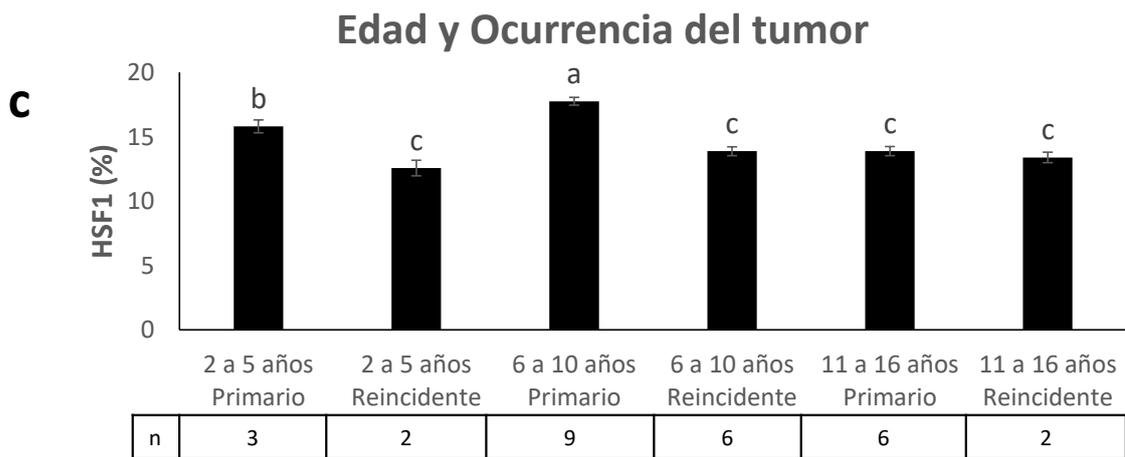
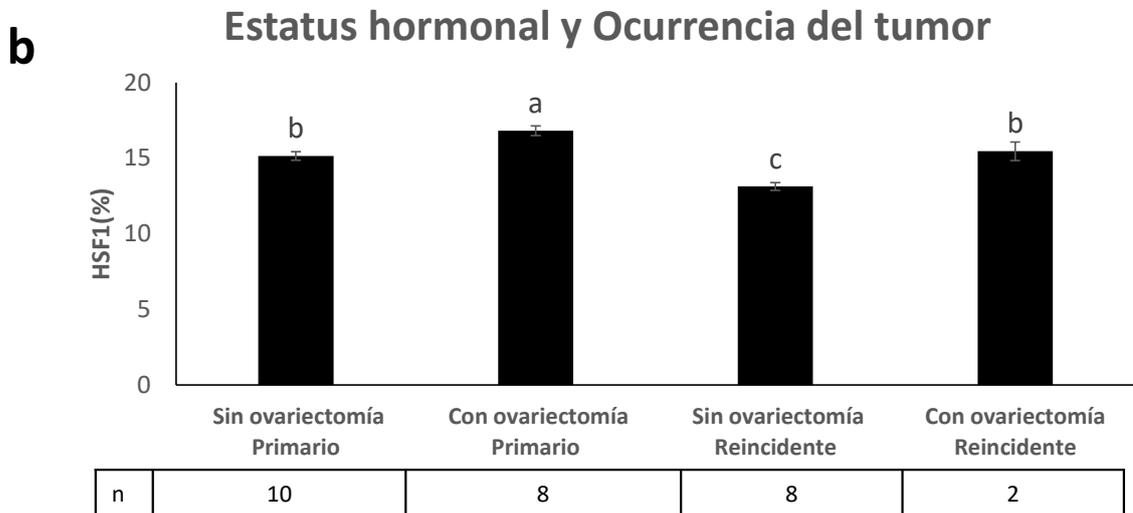
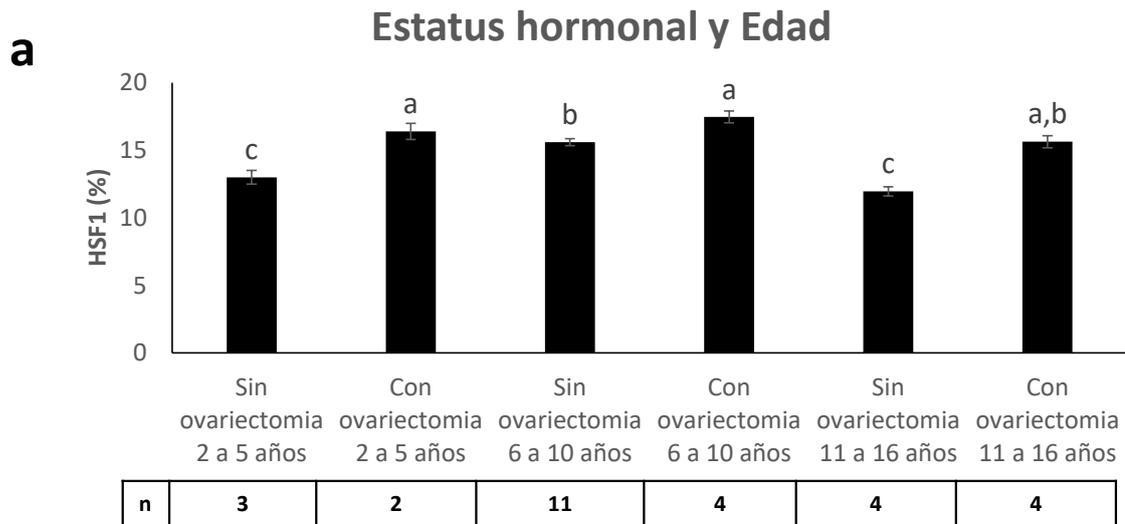


Figura 12. Inmunoexpresión del factor de shock térmico HSF1 en tumores de mama de hembras caninas de acuerdo a interacciones entre factores: a) estatus hormonal y edad, b) estatus hormonal y ocurrencia del tumor, c) edad y ocurrencia del tumor. Las barras representan los valores de media \pm em. Diferentes literales sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

6.4. Resultados descriptivos del área inmunomarcada del factor de shock térmico HSF1 (%) en tumor de mama en hembra canina.

6.4.2. Histopatología

En cuanto a la histopatología, los resultados de este estudio mostraron que los sarcomas (n=2) presentaron la mayor inmunoexpresión de HSF1, en lo que respecta al carcinoma inflamatorio (n=2) también obtuvo un alta inmunoexpresión de HSF1. Si bien el carcinoma inflamatorio forma parte de los carcinomas, dada la agresividad de este tipo de tumores, pareció pertinente separarlo.

En cuanto al resto de los carcinomas (incluyendo el tumor mixto), se encontró que la inmunoexpresión de HSF1 fue mayor que en el grupo control (hiperplasia de células mioepiteliales) (Figura.14). (Figura.15, Tabla N° 3).

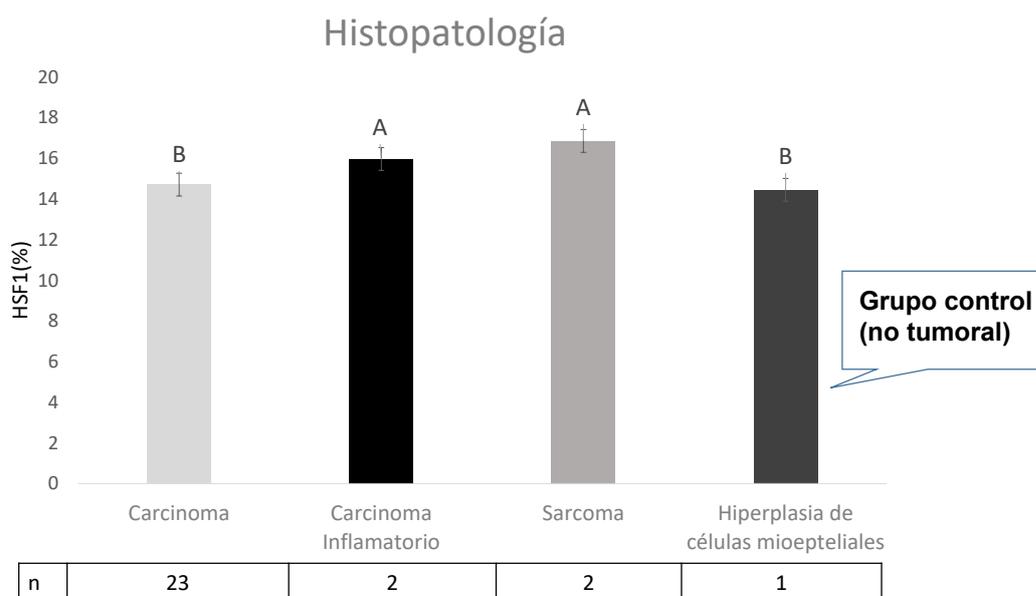


Figura 14. Inmunexpresión del factor de shock térmico HSF1 en tumores de mama de hembras caninas de acuerdo a la histopatología tumoral. por diagnóstico cito o histopatológico. Las barras representan los valores de media \pm eem.

Tabla Nº 2 Inmunoexpresión del factor de transcripción HSF1 en tumores de mama en perras según histopatología por caso clínico.

ID	Edad (Años)	Raza	Ovarioctomía (SI/NO)	Ocurrencia del tumor	Diagnóstico histopatológico	HSF1 (%) ± e.m.
1952/13	10	Cruza	NO	Primario	Adenocarcinoma	21,37 ± 0,68
0805/17	5	Cruza	SI	Primario	Sarcoma	20,96 ± 0,68
0481/17	9	Labrador Retriever	SI	Primario	Adenocarcinoma	19,77 ± 0,67
0288/18	10	Cocker Spaniel	NO	Primario	Tumor mixto	19,52 ± 0,66
1582/17	7	Cruza	NO	Primario	Adenocarcinoma	19,27 ± 0,67
1017/17	4	Caniche	NO	Primario	Adenocarcinoma	19 ± 0,67
0155/18	9	Doberman	SI	Reincidencia	Adenocarcinoma	18,79 ± 0,68
1533/16	6	Golden Retriever	SI	Primario	Adenocarcinoma	18,21 ± 0,68
0194/18	6	Cocker Spaniel	NO	Primario	Adenocarcinoma	18 ± 0,67
1926/08	11	Pitbull	SI	Primario	Adenocarcinoma	16,75 ± 0,58
0730/17	8	Labrador Retriever	NO	Reincidencia	Adenocarcinoma	16,73 ± 0,67
0703/16	16	Cruza	NO	Reincidencia	Tumor inflamatorio	16,63 ± 0,54
0409/17	7	Golden Retriever	NO	Primario	Tumor inflamatorio	15,97 ± 0,69
1702/16	14	Cruza	SI	Primario	Adenocarcinoma	15,7 ± 0,67
1196/15	7	Cruza	NO	Reincidencia	Adenocarcinoma	14,46 ± 0,59
0277/14	9	Caniche	NO	Primario	Hiperplasia de células mioepiteliales	14,45 ± 0,68
0040/15	8	Pitbull	SI	Primario	Adenocarcinoma	13,73 ± 0,63
0089/17	15	Cocker Spaniel	SI	Primario	Sarcoma	13,13 ± 0,65
0732/16	12	Caniche	NO	Reincidencia	Adenocarcinoma	13,03 ± 0,42
1746/12	9	Ovejero Alemán	NO	Reincidencia	Adenocarcinoma	12,91 ± 0,62
0745/16	5	Rottweiler	SI	Reincidencia	Adenocarcinoma	12,84 ± 0,61
1646/14	2	Ovejero Alemán	NO	Reincidencia	Adenocarcinoma	12,27 ± 0,64
0671/14	12	Cocker Spaniel	SI	Primario	Adenocarcinoma	12,06 ± 0,66
1852/12	10	Cruza	NO	Reincidencia	Adenocarcinoma	11,32 ± 0,60
1584/13	9	Caniche	NO	Reincidencia	Tumor mixto	10,24 ± 0,64
1524/13	12	Cruza	NO	Primario	Adenocarcinoma	9,77 ± 0,61
0945/15	12	Cruza	NO	Primario	Adenocarcinoma	7,94 ± 0,66
0595/14	5	Mastin Napolitano	NO	Primario	Adenocarcinoma	7,59 ± 0,65

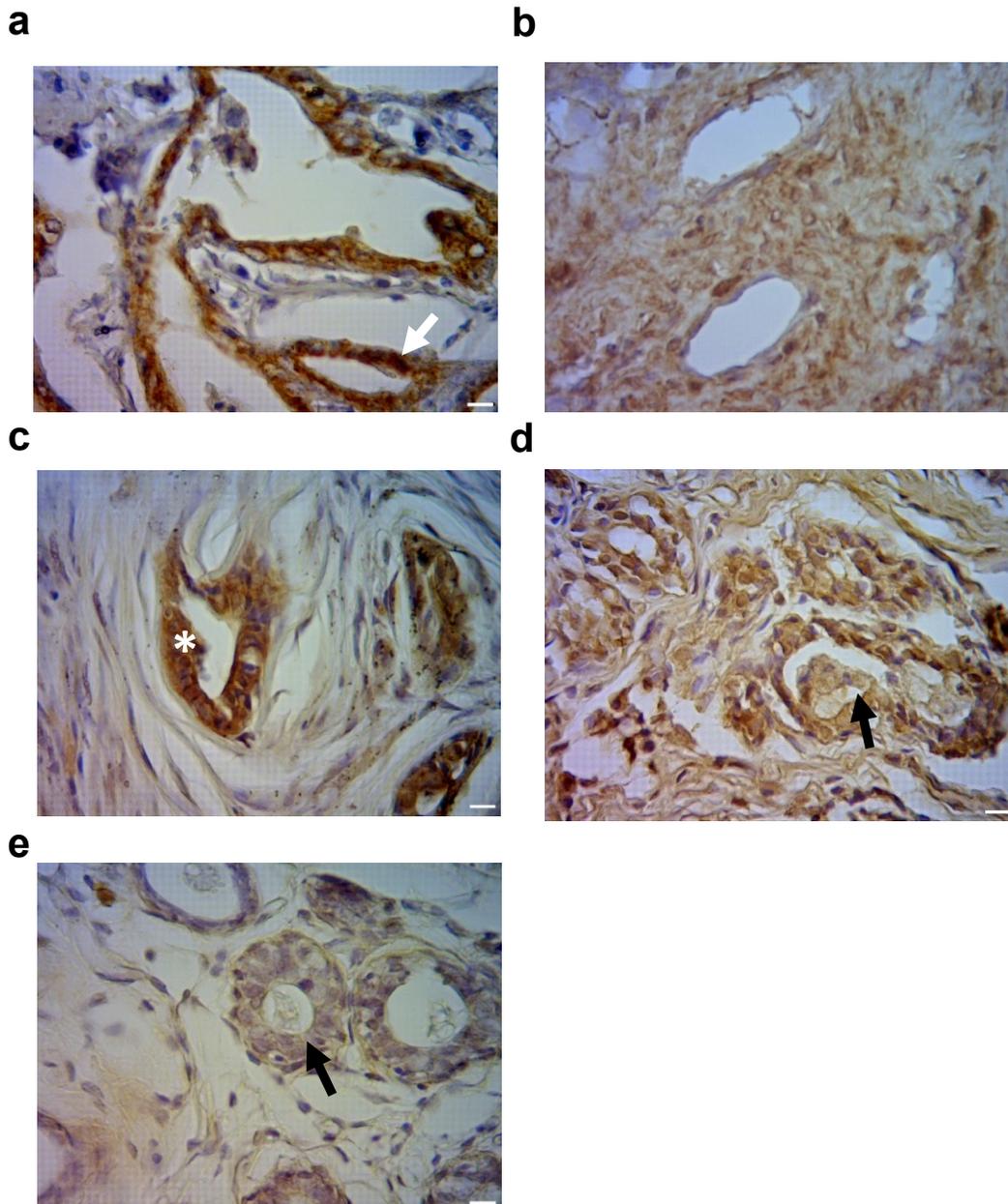


Figura 15. Imágenes de microscopía óptica con técnica de inmunohistoquímica para la detección de la proteína factor de shock térmico HSF1 en tumores de mama de hembras caninas. Imágenes representativas de tumores de tipo a) carcinoma, note la intensa inmunomarcación en células epiteliales de carcinoma (flecha blanca, b) tumor inflamatorio, c) sarcoma, intensa inmunomarcación en células epiteliales (asterisco), d) tumor mixto, intensidad de marrón menor (flecha negra), e) hiperplasia de células mioepiteliales (negativa a muy baja inmunoexpresión en epitelios de conductos y túbulos (flecha negra). Barra de escala: 10 µm.

7. DISCUSIÓN

El presente estudio es hasta donde sabemos el primero que describe la localización y cuantificación de la inmunoexpresión del factor de transcripción HSF-1 en la glándula mamaria en perras.

Así mismo, se determinó la expresión del factor HSF-1 en tumores de glándula mamaria de acuerdo con edad, estatus hormonal del animal (con ovariectomía/sin ovariectomía), ocurrencia (tumores primarios o reincidente). Asimismo, se caracterizó en cada caso clínico la inmunoexpresión del factor HSF1 en los distintos tipos de tumor según las características histopatológicas y raza de animal.

7.1. ¿Dónde se inmunolocalizó el factor HSF1 en los tumores mamarios de perras?

En primer lugar, en el presente estudio, se evidenció una intensa inmunomarcación del factor HSF1 en **citoplasma** de células epiteliales de adenómeros glandulares. Asimismo, se observó inmunomarcación más leve en citoplasma de células conjuntivas. Este resultado sugiere que las células epiteliales y conjuntivas tumorales expresan dicho factor con el fin de promover y mantener el proceso tumoral. Esto se basa en estudios recientes, que determinan que en condiciones normales el factor HSF1 se encuentra en el citoplasma como molécula monomérica latente inactiva, en un complejo con las HSP (Dai y Sampson 2016, Dai 2018). Después de sufrir un estrés, como puede ser una elevada temperatura, HSF1 detecta dicho estrés, se activa y se libera del complejo chaperona, se trimeriza y es transportado al interior del núcleo donde es hiperfosforilada y se une al ADN. Esta unión es con el fin de impulsar la transcripción de genes implicados en el plegamiento de proteínas, la degradación de proteínas mal plegadas, así como otras proteínas que regulan la tolerancia al estrés (Dubey y col., 2015).

En cuanto a la **localización nuclear**, nuestros datos indican que el factor HSF1 se expresa intensamente a nivel nuclear en tumores, así como también a nivel perinuclear en células epiteliales de conductos. Asimismo, observamos una inmunomarcación perinuclear en células conjuntivas. Sugerimos que la ubicación nuclear implica que estaría jugando un rol regulando la transcripción de genes que promueven el proceso tumoral.

Estudios previos demostraron que la presencia de la HSF1 a nivel nuclear, se asocia a resultados con mal pronóstico en tumor de la glándula mamaria en mujeres (Carpenter y col., 2017). Por lo tanto, la presencia de HSF1 nuclear observada en nuestro resultado sugeriría un posible mal pronóstico.

7.2. ¿Varía la expresión del factor HSF1 en tumor de mama en perra según edad del animal?

En cuanto a los resultados de inmunexpresión de HSF1 se determinó que el mayor porcentaje se registró en perras entre 6 y 10 años. Sin embargo, no hemos encontrado estudios en perras que vinculen la edad con la inmunexpresión de dicho factor. Con referencia a la edad de presentación de tumores mamarios se ha reportado que las glándulas mamarias de las perras adultas tendrían una mayor influencia hormonal a lo largo de los años. Estos sucesivos impactos hormonales a lo largo de los años, hacen a la glándula mamaria más susceptible a disturbios endocrinos que actuarán como factores predisponentes o desencadenantes para las neoplasias (Demicheli y col., 2011).

En lo que refiere a la casuística de tumor de mama en cuanto a la edad, en el presente estudio el 59% de las hembras entre 6 a 10 años presentaron tumor de mama. Esta casuística coincide con datos previos del Centro Hospital Veterinario entre el 2005 al 2010, donde el mayor porcentaje de tumores de mama fue en perras de edad adulta entre 6 a 11 años (Elgue y col., 2012). Por otra parte, si comparamos estudios similares en tumores mamarios en perras, a nivel de Latinoamérica, en México entre los años 2002 a 2013 registró un mayor porcentaje de casos de tumores mamarios (70 %) entre perras adultas entre 9 a 12 y 5 a 8 años (Salas y col., 2015, 2016). 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 Ríos y Hartmann Aguilera, 2014). Sin embargo, en Perú la mayor frecuencia de aparición de tumores mamarios en perra fue a partir de los 10 años (Chau y col., 2013).

Estos resultados concuerdan con los registros de edad en el presente estudio. Se mantiene la tendencia a la mayor frecuencia de tumores mamarios en perras comprendidas en este rango etario de 6 a 10 años. 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.

A pesar de la implicancia de HSF1 en tumor de mama en humanos, el factor HSF1 en tumores de mama en perras no había sido aún analizado hasta la realización de este estudio.

Debemos destacar que existen datos en humanos que demuestran la relación entre la malignidad, grado de metástasis tumoral cuanto mayor sea la expresión de HSF1. De hecho se describe al HSF1 como el regulador maestro de la respuesta al shock térmico facilitando la transformación maligna, la supervivencia de las células cancerosas y la proliferación en celular (Mendillo y col., 2012, Dai y Sampson 2016, Kijima y col., 2019). Por lo tanto, la expresión detectada en los casos de tumores en las perras podría ser indicativa de malignidad. En nuestro estudio no tenemos registro de metástasis, muertes y/o tiempo de sobrevivencia de todos los animales, datos que serían muy importantes para en análisis de malignidad tumoral.

7.3. ¿Cómo varía la inmunoexpresión del factor HSF1 en tumores de mama en perras según el estatus hormonal?

Nuestros resultados indican que las perras con ovariectomía presentaron una mayor expresión de HSF1. Esto sugiere que el crecimiento del tumor no estaría dado por los estrógenos ováricos sino por el HSF1 en dichos casos. Según estudios previos, las perras con ovariectomía presentan menos estrógenos circulantes (De Andres, 2016). Por lo tanto, las perras ovariectomizadas del presente estudio podemos asumir que presentaban bajos niveles de estrógenos circulantes.

Sin embargo, el estrógeno como hormona esteroidea, tiene un rol clave en el desarrollo de los tumores de glándula mamaria en mamíferos por medio de sus receptores en el citoplasma de células tumorales lo que indica la dependencia hormonal de neoplasias (Sampaio y Daleck 2000). En el presente estudio no se realizó la evaluación de receptores de estrógenos por lo que no es posible vincular la expresión de HSF1 con los receptores de estrógeno.

Por otra parte, es sabido que cuando se realiza la ovariectomía temprana, el riesgo de padecer tumor de mama se reduce, lo que confirma el papel de los esteroides sexuales en el desarrollo de la enfermedad (Gracanin y col., 2012). Se ha comprobado que existe evidencia en cuanto a la etiología hormonal para el desarrollo del tumor de mama en perras, siendo que el riesgo varía según se encuentren con ovariectomía o sin ovariectomía y a la vez del momento en que se realice la ovariectomía. Cuando se realiza antes del primer estro, el riesgo de desarrollar tumor es de 0,5 %, aumentando a medida que pasan los estros y no registrándose protección de la ovariectomía luego de los 2 años y medio de edad (Sampaio y Daleck 2000).

¿Qué vínculo existe entre la HSF1 y los estrógenos y sus receptores?

Asimismo, también se sabe que existe una vinculación entre la expresión de HSF1 y el aumento de receptor de estrógeno, en humanos, aumentando el factor HSF1 en tumores mamarios RE positivos (Gökmen-Polar y Badve 2016). Dicho análisis mostró que el aumento de HSF1 se asocia con menor sobrevida en tumores RE positivos pero no ocurre lo mismo en tumores RE negativos.

Sin embargo, en perras ovariectomizadas de nuestro estudio se registró un aumento de HSF1, nos surge la interrogante de cuál es la causa que genera el aumento de HSF1 si no hay presencia de estrógeno de origen ovárico. Sugerimos que el aumento de HSF1 podría estar dado por una producción local en el microambiente tumoral de estrógenos. Esta teoría se apoya en estudios realizados en ratones y humanos donde se observó que la enzima aromatasa (requerida para la biosíntesis de estrógeno) también se expresa en las células del estroma tumoral y en células del sistema inmunitario dentro del microambiente tumoral (Rothenberger y col., 2018). Estudios realizados durante la última década han demostrado que las interacciones entre las células tumorales y las células estromales reclutadas circundantes son parte integral en

la alteración de la homeostasis y la potenciación de la tumorigénesis (Rothenberger y col., 2018). Por lo tanto, el aumento de HSF1 en perras ovariectomizadas podría deberse a la producción local de estrógenos en el microambiente tumoral.

El extenso periodo de tiempo necesario para que se desarrolle el tumor de glándula mamaria, en aquellos animales sometidos a terapia hormonal, indica que las hormonas actúan como promotores y no como iniciadores en el desarrollo del tumor (Sampaio y Daleck, 2000).

7.4. ¿Existen cambios en el factor HSF1 en tumor de mama en perra según ocurrencia del tumor por 1ª vez o reincidencia?

Nuestros resultados indican que la mayor inmunexpresión del factor HSF1 fue en perras con tumores que se presentan por primera vez. Dada la alta inmunexpresión detectada en dichos tumores primarios sugerimos que los mismos tienen elevada probabilidad de realizar metástasis. Esto se basa en estudios previos que han mostrado que el HSF1 actúa como factor cancerígeno induciendo el fenotipo agresivo (Gökmen-Polar y Badve 2016).

Las células madre de cáncer mamario, también conocidas como células iniciadoras de tumor, median las metástasis a partir de tumores primarios (Brooks y col., 2015). HSF1 es esencial para la auto renovación de este tipo de células madre cancerígenas (Carpenter y col., 2017).

Asimismo, en otros tipos de tumores la sobreexpresión de HSF1 se ha asociado a un mal pronóstico, estadio avanzado o metástasis en endometrio, carcinoma hepatocelular, melanoma y carcinoma de células escamosas (Wang y col., 2015).

Además, la importancia de identificar HSF1 en tumores mamarios, se menciona en mujeres donde más del 90% de las muertes por tumores de la glándula mamaria, son atribuibles a las metástasis. Por lo que se menciona que es necesario identificar a aquellos pacientes con riesgo de metástasis mediante la cuantificación de HSF1 (Carpenter y col., 2017).

7.5. ¿Cómo se vincula al factor de transcripción HSF1 en tumores de mama en perra con la histopatología del tumor?

Nuestros resultados indican, teniendo en consideración la casuística de la histopatología del tumor que un 74% de los casos fueron carcinomas. Esto coincide con estudios previos en tumores de mama en perra que mencionan a los carcinomas de origen epitelial como la mayoría de los tumores malignos que se presentan en la casuística (Sorenmo y col., 2003, Goldschmidt y col., 2011). Asimismo, reportes previos en casuística en perra mencionan a los sarcomas y tumores inflamatorios dentro de los tumores malignos más agresivos (Goldschmidt y col.; 2011). Además, en estudios en Italia los sarcomas representan la minoría de la casuística, pero son los más agresivos (Rasotto y

col., 2017). En este sentido, nuestros resultados coinciden con datos de otros estudios donde la frecuencia de los carcinomas es mayor que otros tipos tumorales (Shafiee y col., 2013). En dichos estudios la mayoría de los tumores malignos fueron adenocarcinomas bien diferenciados, en su mayoría complejos y tubulopapilares (Rasotto y col., 2017), mientras que los tipos especiales de carcinomas y sarcomas fueron raros. Según los resultados del presente estudio coinciden con dicha casuística, dado que el sarcoma representó el 7%, el tumor inflamatorio 4%, frente a los carcinomas que representaron el 78% de los casos analizados.

En cuanto a la inmunexpresión de HSF1 según la histopatología del tumor mamario en perra en los 2 casos clínicos de sarcoma y en los 2 tumores inflamatorios dicha inmunexpresión fue elevada. Sin embargo, al contar con un bajo número de animales en los sarcomas y en tumores inflamatorios no podemos asegurar que esto sea atribuible al tipo tumoral. Según los resultados obtenidos todos los tumores analizados eran tumores de tipo maligno, menos la hiperplasia de células mioepiteliales.

7.6. ¿Cómo se vincula al factor de transcripción HSF1 en tumores de mama en perra con la raza del animal?

Nuestros resultados indican, tomando en consideración las 3 principales razas en donde se registraron los tumores mamarios (Cruza, Caniche y Cocker Spaniel) la inmunexpresión de HSF1 fue 14,4%, 13,8% y 16,7% respectivamente.

Coincidiendo con la mayoría de la bibliografía consultada (Cullen y col., 2002), en donde la mayor incidencia de tumor se da en animales puros, pero como se mencionó anteriormente dado el número de animales reducido por raza no podemos aseverar que la raza sea un factor influyente a la hora de expresar mayor HSF1.

En el presente estudio considerando la casuística de animales según la raza, el 69% correspondió a animales de raza y el 31% restante correspondió a animales cruza.

Este resultado coincide con lo registrado en el período de 2001 a 2006 en el mismo Centro Hospital de Facultad de Veterinaria, en donde la mayor proporción de animales con tumores de mama que se presentaron en el fueron animales de raza (54%) con respecto a animales cruza (46%) (Demicheli y col., 2011). También en Uruguay, otro autor sugiere al Caniche, el Teckel y el Pastor alemán como las de mayor frecuencia en tumores (Fernández, 2011). Asimismo, nuestros resultados coinciden con lo registrado en otros países de Latinoamérica. En México el mayor número de tumores se registró en perras de raza Cocker Spaniel y Caniche (Salas y col., 2015). En Colombia la mayor frecuencia de tumores se registró en perras de raza Caniche y Criollo (Velandia Ríos y Hartmann Aguilera 2014). Sin embargo, otros autores indican que no existe predisposición racial en la presentación de la enfermedad debido a que inciden diferentes factores como los geográficos o los socio económicos entre otros (Ortega García y col., 2013).

7.7. Inhibición del factor de transcripción HSF1 como blanco de estrategias antitumorales

Finalmente, los resultados encontrados en tumor mamario de perra caracterizando la expresión de HSF1 resultan importantes ya que es el puntapié inicial en el conocimiento de esta proteína vinculada al desarrollo tumoral en animales domésticos. De hecho, la importancia radica en lo que mencionan diversos trabajos referidos al papel fundamental que desempeña el factor de shock térmico 1 (HSF1) en la protección de la estabilidad del proteoma o la proteostasis mediante la inducción de proteínas de choque térmico (HSP). En este sentido, se menciona que, si bien HSF1 permanece latente en células normales no estresadas, es constitutivamente activo en células malignas, lo que produce su crecimiento y supervivencia. HSF1 afecta la tumorigénesis, la progresión del cáncer y la resistencia al tratamiento al preservar la homeostasis del proteoma del cáncer, por lo que se sugiere inhibir la actividad de HSF1 como posible estrategia contra el cáncer (Kijima y col., 2019). El presente trabajo colaboró con la generación de conocimientos sobre la dinámica de la proteína HSF1 en tumores mamaros de perras.

8. CONCLUSIONES

El presente estudio caracterizó la inmunoexpresión del factor de shock térmico HSF1 en tumores mamarios en perras. Esta inmunoexpresión varía según el estatus hormonal, ocurrencia del tumor y la edad del animal.

Se determinó que la ovariectomía reguló positivamente la expresión del factor HSF1 en tumores mamarios tanto primarios como reincidentes en todos los rangos etarios de las perras analizadas.

En los casos clínicos que presentaron aumento de la expresión de HSF1 en tumores mamarios se sugiere, dado la vinculación de dicho factor con mecanismos de evasión de apoptosis y progresión tumoral, una alta probabilidad de metástasis en dichas perras.

La información generada sobre la expresión del factor HSF1 posibilitará a futuro generar terapias moleculares basadas en la inhibición de dicho factor.

8.1 Perspectivas

El estudio de tumores de mama en la perra y de factores de agresividad como el factor HSF1 implica un avance en el conocimiento de la dinámica tumoral. El análisis a tiempo de dicho factor podría sugerir ser blanco de nuevas terapéuticas para atacar el crecimiento tumoral. Por lo tanto, se sugiere incorporar el análisis inmunohistoquímico de proteínas de shock térmico para el estudio de procesos metastásicos. Finalmente, el incorporar dicho análisis generará un avance en el diagnóstico y en la comprensión de la dinámica tumoral para hacer tratamientos anti HSF1 en tumores mamarios.

Realizar trabajos multidisciplinarios que integren los conocimientos sobre proteínas específicas y amalgamarlos con los estudios en clínica resultan ser de los más satisfactorios por considerar que de esta manera podemos devolver a la sociedad un poco de lo que hemos aprendido durante el transcurso de nuestros estudios en la Facultad de Veterinaria.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Araújo MR de, Campos LC, Ferreira E, Cassali GD (2015). Quantitation of the regional lymph node metastatic burden and prognosis in malignant mammary tumors of dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 29: 1360-1367
2. Baba AI, Câtoi C. (2007) Capítulo 1 Comparative oncology. En: *Comparative Oncology*. Bucharest: The Publishing House of the Romanian Academy; Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9561/>. Fecha de consulta: 23/03/2019.
3. Bacha, WJ.; Wood, LM (2001) Atlas color de histología veterinaria. 2da. ed. Buenos Aires, Ed. Intermédica S.A.I.C.I., 308p.
4. Badowska-Kozakiewicz A, Malicka E (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. Banks, WJ. (1986) *Histología veterinaria aplicada*. México, D.F, Ed Manual Moderno, 730p.
6. Brooks MD, Burness ML, Wicha MS (2015). Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer. *Cell Stem Cell* 17: 260–271.
7. Caicedo, J.; Iruregio, C.; Cabarcas, M.; Acosta, B. (2017) Estudio comparativo de la frecuencia de tumores mamarios según sexo edad y tipo histológico en caninos y humanos en los laboratorios de patología anatómica de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*; 5:37-46
8. Calderwood SK, Gong J (2012). Molecular chaperones in mammary cancer growth and breast tumor therapy. *J. Cell. Biochem.* 113: 1096–1103.
9. Carpenter RL, Sirkisoorn S, Zhu D, Rimkus T, Harrison A, Anderson A, Paw I, Qasem S, Xing F, Liu Y, Chan M, Metheny-Barlow L, Pasche BC, Debinski W, Watabe K, Lo H-W (2017). Combined inhibition of AKT and HSF1 suppresses breast cancer stem cells and tumor growth. *Oncotarget* 8: 73947–73963
10. Chau G, Chavera A, Perales R, Gavidia C (2013). Frequency of neoplasms in canine mammary gland: Retrospective study in the period 1992-2006 in Lima, Peru. *Rev. Investig. Vet. Del Peru* 24: 72–77

11. 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
12. 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
13. Claver, JA; Sanches, A.; Sicardi, A.; Lawzewitsch, I. (1984). *Microscopia y técnicas histológicas*, 3era. Ed. Buenos Aires, Ed. Hemisferio Sur S.A, 91p.
14. Cullen J, Page R, Misdorp W (2002). An Overview of Cancer Pathogenesis, Diagnosis, and Management. En: Meuten D (Ed.), *Tumors in domestic animals*. 4ta. Iowa, Iowa State Press A Blackwell Publishing Company, pp. 3-47.
15. Dai C (2018). The heat-shock, or HSF1-mediated proteotoxic stress, response in cancer: From proteomic stability to oncogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 373.
16. Dai C, Sampson SB (2016). HSF1: Guardian of Proteostasis in Cancer. *Trends Cell Biol.* 26: 17–28.
17. Dai C, Whitesell L, Rogers AB, Lindquist S (2007). Heat Shock Factor 1 Is a Powerful Multifaceted Modifier of Carcinogenesis. *Cell* 130: 1005–1018.
18. De-Andrés 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 doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. 316p.
19. Dellmann H-D, Arnal Atarés M del C, Vargas Vargas A, Fernández de Luco Martínez D (1993). *Histología Veterinaria*. 2da. Ed. Zaragoza, Ed. Acribia, 398p.
20. Demicheli, V., Pascal, P., Pérez M (2011). Prevalencia de tumores de mama en perra y su determinación histopatológica según la OMS. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, UdelaR. 43p.
21. Dubey A, Prajapati KS, Swamy M, Pachauri V (2015). Heat shock proteins: a therapeutic target worth to consider. *Vet. World* 8: 46–51.
22. Dyce M, Sack W, Wensing C (2012). *Anatomía Veterinaria*. 4ta. Ed. Mexico, DF, Ed. Manual Moderno, 834p.

23. 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. *Vet.* 48: 25–30.
24. Ensemble Gen: HSF1. Disponible en: https://www.ensembl.org/Dog/Search/Results?q=hsf1;site=ensembl;facet_species=Dog. Fecha de consulta: 12/02/2019.
25. Fernández MC (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.
26. Gaona HV, Laville RE, Arce SRA, Martínez MP (1999). Distribución de mastocitos del estroma de la glándula mamaria de perra (*Canis familiaris*), en periodos activo e inactivo. *Vet. México* 30: 317–321.
27. Georgopoulos C, Welch WJ (1993). Role of the Major Heat Shock Proteins as Molecular Chaperones. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9: 601–634.
28. Gökmen-Polar Y, Badve S (2016). Upregulation of HSF1 in estrogen receptor positive breast cancer. *Oncotarget* 7: 84239–84245.
29. Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R, Zappulli V (2011). Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. *Vet. Pathol.* 48: 117–131.
30. Gracanin A, Wolferen ME Van, Sartorius CA, Brenkman AB, Schoonen WG, Mol JA (2012). Canid progesterone receptors lack activation function 3 domain-dependent activity. *Endocrinology* 153: 6104–6113.
31. Hermo G, García M, Torres P, Gobello C (2005). Tumores de Mama en la Perra. *Cienc. Vet.* 7: 1–25.
32. Kijima T, Prince T, Neckers L, Koga F, Fujii Y (2019). Heat shock factor 1 (HSF1)-targeted anticancer therapeutics: overview of current preclinical progress. *Expert Opin. Ther. Targets* 23: 369–377.
33. Klein BG (2014). *Fisiología Veterinaria (Cunningham)*. Barcelona, Ed. Elsevier España, 718p.
34. König HE, Liebich H-G (2015). *Anatomía De Los Animales Domésticos* 2da ed. Madrid, Editorial Médica Panamericana, 400p.
35. Lana, S.; Rutteman, G.; Wihrow, S. (2009) *Oncología clínica de pequeños animales*. En: Withrow & MacEwen's. 4ta. ed. Barcelona. Ed. Multimedia Ediciones Veterinarias, pp. 605–622.

36. Lazcano IH, Sánchez Tejero E, Nerín Sánchez C, Bernabé RC, Escudero IM, Pinar J, Resumen SF (2016). Marcadores Tumorales. *Rev. Clínica Med. Fam.* 9: 31–42.
37. Lindquist S (1986). The Heat-Shock Response. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 1151–1191.
38. Liu B, Han Y, Qian S-B (2013). Cotranslational response to proteotoxic stress by elongation pausing of ribosomes. *Mol. Cell* 49: 453–463.
39. Mangieri J (1994). *Oncología Veterinaria 3era. Ed.* Buenos Aires, Ed. PVA, 242p.
40. Manohar BM, Nagini S, Kumaraguruparan R, Balachandran C, Karunakaran D (2005). Of humans and canines: A comparative evaluation of heat shock and apoptosis-associated proteins in mammary tumors. *Clin. Chim. Acta* 365: 168–176.
41. Martín M, Herrero A, Echavarría I (2015). El cáncer de mama ; Breast cancer. *ARBOR Ciencia, Pensam. y Cult.* 191: a234.
42. Mendillo ML, Santagata S, Koeva M, Bell GW, Hu R, Tamimi RM, Fraenkel E, Ince TA, Whitesell L, Lindquist S (2012). HSF1 drives a transcriptional program distinct from heat shock to support highly malignant human cancers. *Cell* 150: 549–562.
43. Meng L, Hunt C, Yaglom JA, Gabai VL, Sherman MY (2011). Heat shock protein Hsp72 plays an essential role in Her2-induced mammary tumorigenesis. *Oncogene* 30: 2836–2845.
44. Mosser DD, Morimoto RI (2004). Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene* 23: 2907–2918.
45. Mueller F, Fuchs B, Kaser-Hotz B (2007). Comparative biology of human and canine osteosarcoma. *Anticancer Res.* 27: 155–164.
46. Munson L, Moresco A (2007). Comparative pathology of mammary gland cancers in domestic and wild animals. *Breast Dis.* 28: 7–21.
47. Neudegger T, Verghese J, Hayer-Hartl M, Hartl FU, Bracher A (2016). Structure of human heat-shock transcription factor 1 in complex with DNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23:140 - 146
48. Nunez Ochoa L, Oca Acosta AM de (2012). Frequency of Mammary Gland Tumors in Bitches with Cytological Diagnosis. *Rev. Cient. Ciencias Vet.* 22: 426–431.

49. Ortega García M V., Galán Torres JA, Millán Ruiz Y, Sánchez Céspedes R, Martín de las Mulas González-Albo J (2013). Clasificación en subtipos moleculares de tumores de mama de pequeños animales mediante métodos inmunohistoquímicos. *Sanid. Mil.* 69: 6–12.
50. Pawlina W (2016). *Ross Histología Texto y Atlas 7ª. ed.* Barcelona, Ed. Wolter Kluwer, 1052p.
51. 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.
52. Rasotto R, Berlato D, Goldschmidt MH, Zappulli V (2017). Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes: An Observational Cohort Study of 229 Cases. *Vet. Pathol.* 54: 571–578.
53. Romairone A, Cartagena A (2014). *Atlas de tumores Zaragoza*, Ed. Servet, 179p.
54. Rostami M, Tateyama S, Uchida K, Naitou H, Yamaguchi R, Otsuka H (1994). Tumors in domestic animals examined during a ten-year period (1980 to 1989) at Miyazaki University. *Chem. Pharm. Bull.* 56: 403–405.
55. Rothenberger NJ, Somasundaram A, Stabile LP (2018). The role of the estrogen pathway in the tumor microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.* 19: 611-627.
56. Salas Y, Aburto E, Alonso RA, Márquez A, Corona H, Romero L (2016). Asociación histológica con factores potenciales de riesgo y tiempo de sobrevida en el tumor mamario canino. *Vet. Mex.* 3: 1–13.
57. 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: 127381.
58. Sampaio C, Daleck C (2000). Canine Mammary Tumors: Hormonal Influence and Effects of Ovariohysterectomy As an Adjuvant Therapy. *Ciência Rural* 30: 731–735.
59. Sánchez C. R, Schneider B. E, Martínez R. G, Fonfach Z. C (2008). Cáncer de mama Modalidades terapéuticas y marcadores tumorales. *Cuad. Cirugía* 22: 55–63.
60. Santagata S, Hu R (2011). High levels of nuclear heat-shock factor 1 (HSF1) are associated with poor prognosis in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108: 18378-18383

61. Shafiee R, Javanbakht J, Atyabi N, Kheradmand P, Kheradmand D, Bahrami A, Daraei H, Khadivar F (2013). Diagnosis, classification and grading of canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: an Clinico-Cytohystopathological study with environmental factors influencing public health and medicine. *Cancer Cell Int.* 13: 469.
62. Solimini NL, Luo J, Elledge SJ (2007). Non-Oncogene Addiction and the Stress Phenotype of Cancer Cells. *Cell* 130: 986–988.
63. Sorenmo KU, Rasotto R, Zappulli V, Goldschmidt MH (2011). Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Vet. Pathol.* 48: 85–97.
64. Sorenmo K, Ross R., Powers B., Al. E, Al. E (2003). Canine mammary gland tumors. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 33: 573–596.
65. Steele AD, Hutter G, Jackson WS, Heppner FL, Borkowski AW, King OD, Raymond GJ, Aguzzi A, Lindquist S (2008). Heat shock factor 1 regulates lifespan as distinct from disease onset in prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 13626–13631.
66. Switonski M, Szczerbal I, Nowacka J (2004). The dog genome map and its use in mammalian comparative genomics. *J. Appl. Genet.* 45: 195–214.
67. Torres G, Eslava P (2007). Mammary tumors in canine: Complex adenocarcinoma of the mammary gland with metastasis to the regional lymph node. *Orinoquia* 11: 99–110.
68. Velandia Ríos VC, Hartmann Aguilera DM (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 la ciudad de Bogotá. Tesis de grado. Facultad de Ciencias agropecuarias. Universidad de la Salle. 32p
69. Vihervaara A, Sistonen L (2014). HSF1 at a glance. *J. Cell Sci.* 127: 261–266.
70. Wang B, Lee C-W, Witt A, Thakkar A, Ince TA (2015). Heat shock factor 1 induces cancer stem cell phenotype in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.* 153: 57–66.
71. Wang X, Chao L, Ma G, Chen L, Jin J, Hua M, Liu H, Ouyang A, Zhang X (2010). Primary breast carcinoma: Association of mammographic calcifications with osteopontin expression. *Radiology.*

72. Wang X, Zhang D, Cao M, Ba J, Wu B, Liu T, Nie C (2018). A study on the biological function of heat shock factor 1 proteins in breast cancer. *Oncol. Lett.* 16: 3821–3825.
73. Withrow SJ, Vail DM (2009). *Oncología clínica de pequeños animales Withrow & MacEwen's*. 4ta. Ed. Barcelona, Ed. Multimedia Ediciones Veterinarias, 832p.
74. Zatloukal J, Lorenzová J, Tichý F, Nečas A, Kecová H, Kohout P (2005). Breed and Age as Risk Factors for Canine Mammary Tumours. *Acta Vet. Brno* 74: 103–109.