



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**TUMORES DE MAMA EN CANINOS. DETERMINACIÓN DE
POLIMORFISMOS EN LOS GENES *BRCA1/BRCA2* Y CORRELACIÓN ENTRE
LA PRESENTACIÓN CLÍNICA Y LA ESTADIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA.**

ALICIA BEATRIZ DECUADRO BARBOZA.

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY

2021



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**TUMORES DE MAMA EN CANINOS. DETERMINACIÓN DE
POLIMORFISMOS EN LOS GENES *BRCA1/BRCA2* Y CORRELACIÓN ENTRE
LA PRESENTACIÓN CLÍNICA Y LA ESTADIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA.**

ALICIA BEATRIZ DECUADRO BARBOZA

Rosa Gagliardi; DMTV, MSc, PhD.

Alejandro Benech; DMTV, MSc, PhD.

Silvia Llambi; DMTV, MSc, PhD.

Director de Tesis

Co-directores

2021

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE
DEFENSA DE TESIS**

Presidente. Fernando Dutra; DMV, MSc, PhD.

DILAVE, Laboratorio Regional Este, Uruguay.

Segundo Miembro. Lic. María Montenegro; MSc, PhD.

Área Genética, Departamento de Genética y Mejora Animal, Instituto de Producción Animal.

Facultad de Veterinaria. UdelaR.

Tercer Miembro. Claudia Della Cella DMV; MSc.

Unidad de Clínica de Pequeños Animales.

Facultad de Veterinaria. UdelaR.



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

Unidad de Posgrados
-Oficina de Posgrados-

FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS
DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

TUMORES DE MAMA EN CANINOS. DETERMINACIÓN DE
POLIMORFISMOS EN LOS GENES BRCA1/BRCA2 Y
CORRELACIÓN ENTRE LA PRESENTACIÓN CLÍNICA Y LA
ESTADIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA.

Por: **DMTV. Alicia Beatriz DECUADRO BARBOZA**

Directora de Tesis: Dra. Rosa Gagliardi
Codirectores de Tesis: Dr. Alejandro Benech
Dra. Silvia Llambi

Tribunal

Presidente: Dr. Fernando Dutra Quintela

Segundo Miembro: Dra. María Montenegro

Tercer Miembro: Mag. Claudia Della Cella

Fallo del Tribunal: Aprobada con Mención

MARTES 23 DE FEBRERO DE 2021

PLATAFORMA ZOOM, POSGRADO

El Fallo de aprobación de la Tesis puede ser: Aprobada (corresponde a la nota BBB- en el Acta), o Aprobada con Mención (corresponde a la nota SSS- 12 en el Acta)

DEDICATORIA

“Si grupos de expertos no solo de oncología y patología, sino de todos los campos del diagnóstico, tratamiento e investigación veterinarios se encargaran de aplicar sus conocimientos y experiencia en un marco de principios médicos basados en la evidencia para diseñar recomendaciones para estudios en sus especialidades, comenzaría una nueva era de progreso médico veterinario”.

Lipscomb,2012.

Nos parece oportuno transcribir:

“Algún día tal vez saldrá a la luz una de las ironías de la naturaleza: ... que el cáncer, responsable de muchas muertes, está conectado muy indisolublemente con la vida”.

C.Oberling- 1946

Esta tesis está dedicada a todos los pacientes que padecen cáncer, a los que siguen luchando y a los que perecieron frente a esta cruel enfermedad. En un futuro, quizás, tengo la esperanza que lograremos controlar esta dura batalla. Mientras tanto la investigación y la prevención son nuestras armas más poderosas.

AGRADECIMIENTOS.

Este trabajo de Tesis fue realizado en la Unidad de Clínica y Cirugía de pequeños animales, en el Unidad Académica de Genética y Mejora Genética de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay y el Instituto Rubino de Treinta y Tres, con financiación de la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), Comisión de Investigación y Desarrollo Científico de la Facultad de Veterinaria (CIDEDEC) y el Programa de Posgrados Académicos de la Facultad de Veterinaria.

Quiero agradecer a mi tutora **Rosa Gagliardi**, por su paciencia, calma y dedicación y por transmitirme su gran fortaleza.

A mis cotutores **Alejandro Benech** por su apoyo y por estar presente en el momento justo y a **Silvia Llambi** por su capacidad de minimizar mis miedos y su gran apoyo.

A **Natalie Ruiz** por estar siempre al firme para ayudarme en todo, aparte de ser una gran compañera.

A mi gran grupo de Oncología, **Cecilia Amaral**, **Cecilia Menéndez** y **Natalia Bartesaghi**, sin ellas todo sería más difícil y aburrido, destaco la importancia del trabajo en equipo que nos fortalece y nos estimula a aprender algo nuevo todos los días.

A mis compañeros de trabajo, **Luis Delucchi**, **Claudia Della Cella**, **Mary Cuns** y **Carolina Herrera** con los que día a día estamos al frente del Hospital.

Fernando Dutra que sin conocerme me abrió las puertas y me enseñó muchísimo de histopatología con mucha dedicación.

A **Natalia Maidana** que formo parte de esta tesis con una beca CIDEDEC por la ayuda en la extracción de muestras, seguimiento de los pacientes y mucho más.

A todo el grupo de enfermería (**Sofía**, **Mariana**, **Silvina** y **Silvana**), funcionarios, estudiantes del practicantado, equipo de cirugía, imagenología y laboratorio, no los nombro a todos porque son muchos, por la colaboración en la extracción de muestras y todo lo referente a esta tesis.

A todos los integrantes del área de Genética que me compartieron su material para el procesamiento de muestra y me hicieron sentir como una más, y en especial a **Narine** y **María** en lo que para ellas su ayuda fue pequeña, para mí fue enorme.

Alicia Dib, Directora del Hospital por estar siempre atenta a nuestras necesidades.

Ana Meikle por darme un empujón justo cuando lo necesitaba. Por su observación y la capacidad de querer explotar las diferentes habilidades que tenemos cada uno.

Valerie Cayssials y Eugenio Jara, por la enorme ayuda para el procesamiento de los datos.

A todos los propietarios por su confianza y buena disponibilidad y a las perras que formaron parte de este trabajo, sin ellas esto no hubiera sido posible.

Quiero remarcar que para sus propietarios ellas no son modelos experimentales si no que son integrantes de una familia y nuestro deber es mejorar su calidad de vida y la de todo su círculo familiar.

Muchas de ellas ya no están, pero quedaron inmortalizadas en este trabajo y en nuestra memoria.

A las células con esta capacidad de “inmortalidad” que evaden los puntos de control y la apoptosis y que hoy en día nos dan tantos dolores de cabeza, que siguen estando un paso adelante de nuestros conocimientos. Por hacernos estudiar tanto, ya llegara el día, en que podamos armar este rompecabezas y tener las armas necesarias para tratar con más eficacia esta enfermedad.

Por último, pero no menos importante quiero agradecer a mi **familia**.

Mi **madre** por ser una mujer muy disciplinada que me enseñó a levantarme en mis caídas más duras.

A la memoria de mi **padre** que no tuvo una vida fácil y vivió muy poco, pero me dejo la esencia de que siempre hay que enfrentar la vida con una sonrisa aun en las peores adversidades.

A mi **hermano**, una persona especial incomprendido por muchos, eso producto de su gran inteligencia.

A **María Clara y Gastón** por formar parte de mi vida.

A **Joel** mi compañero, por su energía desmedida y por enseñarme que por más difíciles que sean los obstáculos, si queremos, podemos derribarlos.

A mis hijos, **Martina y Juan**, perdón por tantas horas en la computadora y tan pocas horas de parque. Espero que algún día me entiendan y que sepan que ustedes son el impulso de todas mis metas.

ÍNDICE

Dedicatoria.....	i
Agradecimientos.....	ii
Índice de cuadros	viii
Índice de figuras.....	ix
Índice de tablas.....	xii
Índice de abreviaturas.....	xiv
RESUMEN	xvi
SUMMARY	xvii
1) Introducción	1
1.1. La hembra canina como modelo experimental en el estudio del cáncer de mama.....	1
1.2. Epidemiología de los tumores de mama.....	2
1.3. Etiopatogenia.....	3
1.4. Factores de riesgo.....	4
1.5. Presentación clínica de los tumores de mama.....	6
1.6. Diagnóstico de los tumores mamarios.....	7
1.7. Estadificación clínica.....	8
1.8. Clasificación de los tumores de mama.....	11
1.9. Factores pronósticos.....	15
1.10. Estudio de genes BRCA1 y BRCA2.....	17
1.11. Tratamiento y prevención.....	19

2) Antecedentes Específicos	22
2.1. Tumores mamarios en perras.....	22
2.2. Histopatología.....	23
2.3. Base genética.....	25
2.4. Perfiles de polimorfismo de un solo nucleótido.....	30
2.5. Estudios poblacionales	30
2.5.1. Frecuencias alélicas.....	30
2.5.2 Heterocigosidad.....	30
2.5.3. Valores de F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} para toda la población.....	31
2.5.4. Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	31
2.5.5. Análisis Factorial de Correspondencia.....	31
2.5.6. Dendrograma.....	32
3)Hipótesis	33
4) Objetivos	33
4.1. Objetivos Generales	33
4.2. Objetivos Específicos	33
5) Estrategia de la Investigación	34
6) Materiales y Métodos	34
6.1. Recursos materiales.....	35
6.2. Criterio de selección de casos.....	35
6.3. Diseño experimental.....	36
6.4. Estadificación de los pacientes.....	37

6.5. Muestras de sangre.....	38
6.6. Muestras de tejido de las glándulas mamarias tumorales.....	38
6.7. Clasificación Histopatológica de los tumores de mama.....	39
6.8. Extracción de sangre para realizar la extracción de ADN.....	39
6.9. Regiones de los genes BRCA1 y BRCA2 a estudiar.	40
6.10. Tratamiento de los pacientes.....	42
6.11. Seguimiento.....	42
6.12. Análisis estadístico.....	42
7) Resultados	43
7.1. Resultados clínicos en Tumores Mamarios.....	43
7.2. Resultados de histopatología de los tumores mamarios.....	46
7.3. Análisis de concordancia entre métodos de diagnóstico: Histopatológico vs Clínico.....	49
7.4. Análisis de correlación entre métodos.....	50
7.5. Resultados del estudio genético. Análisis poblacional.....	52
7.6. Prueba de Chi cuadrado para el Equilibrio de H&W.....	54
7.7. Heterocigosidad esperada y observada según las dos poblaciones.....	55
7.8. Valores de F_{IS} , F_{IT} y F_{ST}	56
7.9. Valores de F_{IS} por población	57
7.10. Análisis factorial de correspondencia.....	57
7.11 Dendrograma.....	58
8) Discusión	60
9) Conclusiones	67
10) Referencias Bibliográficas	69
11) Anexos	82

Índice de cuadros.

Cuadro I. Esquema de estadificación para los tumores mamarios caninos.....9

Cuadro II. Drenaje linfático en perras sin tumor de mama y perras con tumores.....11

Cuadro III. Clasificación de los tumores de mama según Misdrop et al. (1999). Por columna los tumores malignos están en orden creciente de malignidad (arriba hacia abajo)13

Cuadro IV. Clasificación de Goldschmidt et al. (2011)14

Índice de Figuras.

- Figura 1. Carcinoma inflamatorio. Foto tomada en la consulta especializada de Oncología. Facultad de Veterinaria (UdelaR).....3
- Figura 2 A) Carcinoma mamario con metástasis en piel. B) Carcinoma mamario ulcerado. Recidiva luego de la cirugía. Fotos tomadas en la Consulta Especializada de Oncología. Facultad de Veterinaria (UdelaR)6
- Figura 3. Paciente con carcinoma inflamatorio. Estudio citológico por PAAF. Fotos cedidas por la Dra. Cecilia Menéndez.....7
- Figura 4. Procedimiento radiográfico de rutina (3 incidencias), realizado en oncología para exploración de tórax: A) Incidencia latero-lateral derecha; B) Incidencia dorsoventral; C) Incidencia latero-lateral izquierda. Paciente: canino, hembra de 6 años de edad donde no se aprecian metástasis pulmonares. Foto cedida por la Unidad de Imagenología, Facultad de Veterinaria.....10
- Figura 5. Esquema donde se observa la numeración empleada para los tumores de mama en perras y el drenaje linfático en perras sin tumores de mama y perras con tumores. (GESVONC, 2015)10
- Figura 6. A) Mastectomía radical unilateral realizada en una perra de 6 años. B) Mastectomía regional realizada a una perra de 12 años. Fotos cedidas por la Dra. Florencia Sollier (Unidad de Cirugía de Pequeños Animales, Facultad de Veterinaria).....19
- Figura 7. Tumores de mama abdominales e inguinales. Foto de la autora.22
- Figura 8. Tumor de mama ulcerado. Foto de la autora.36
- Figura 9. Medición con calibre de un tumor de mama. Foto de la autora.....37.

Figura 10. Tumor de mama luego de la extirpación quirúrgica a cargo de la Dra. Florencia Sollier (Unidad de Cirugía de Pequeños Animales, Facultad de Veterinaria)	39
Figura 11. Edad de presentación de tumores de mama benignos y malignos (6 a 12 años)...43	
Figura 12. Distribución tumoral, benignos y malignos.....44	
Figura 13. Distribución según razas.....44	
Figura 14. Estadio de los tumores benignos encontrados en este estudio.....45	
Figura 15. Estadio de los tumores malignos encontrados en este estudio.....45	
Figura 16. Tipos de tumores malignos registrados por histopatología en este estudio.....46	
Figura 17. A) Paciente N° 5. Muestra histopatología de un carcinoma tubular simple tinción con hematoxilina y eosina 10x. B) Paciente N° 6. Muestra histopatológica de un carcinoma complejo, tinción con hematoxilina y eosina 10x.....47	
Figura 18 A) Paciente N° 2. Comedocarcinoma 40x. B) paciente N° 16 Muestra histopatológica de paciente con carcinoma túbulo papilar. Tinción con hematoxilina eosina 10x.....47	
Figura 19. A) Paciente N° 3. Histopatología de un carcinoma mixto 40x. B) Paciente N° 32. carcinoma rico en lípidos. Tinción hematoxilina y eosina 10x.....47	

Figura 20. Paciente N° 1. A) Histopatología de émbolos linfáticos localizados en la dermis en un carcinoma inflamatorio. Tinción hematoxilina y eosina 40x	48
Figura 21. Tipos de tumores benignos registrados por histopatología en este estudio.....	49
Figura 22. Foto histopatología de un adenoma complejo. Foto de la autora.....	49
Figura 23. Diagrama de puntos y correlación lineal. Correlación Histopatológica y estadio clínico.....	51
Figura 24. Representación gráfica tridimensional del análisis factorial de correspondencia.....	57
Figura 25. Dendrograma donde se observa con la letra a los animales enfermos y la c los animales control.	58
Figura 26. Dendrograma. Los pacientes fueron ingresados según el estadio clínico. El 0 está representado por los tumores benignos y luego la clasificación va del I al V.....	58
Figura 27. Dendrograma. Los pacientes se ingresaron según las razas.....	59

Índice de Tablas.

Tabla 1. Análisis de concordancia entre métodos de diagnóstico: Histopatológico vs Clínico.....	49
Tabla 2. Kappa ponderado y Kappa no ponderado.....	52
Tabla 3. Figuras alélicas.....	53
Tabla 4. Valores de χ^2 obtenidos para los loci en los que se observaron polimorfismos. En color rojo se muestran los dos que no presentaron equilibrio H&W.....	54
Tabla 5. Heterocigocidad esperada y observada. Se muestran los resultados obtenidos para cada población, con los loci estudiados.....	55
Tabla 6. Valores de F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} obtenidos.....	56
Tabla 7. Valores de F_{IS} por población.....	56

Anexos

Anexo 1. Ficha clínica usada para tumores mamarios.....	82
Anexo 2. Datos de perras con tumores de mama.....	85
Anexo 3. Datos de perras control sin tumores.....	86
Anexo 4. Descripción de características basales de perras con tumores mamarios.....	87
Anexo 5. Relación entre el grado histopatológico y el tipo tumoral maligno.....	88
Anexo 6. Resultados del Nanodrop Perras con tumores.....	89
Anexo 7. Resultados del Nanodrop. Perras control.....	90
Anexo 8. Resultados del genotipado para los 15 SNPs (rosado perras con tumores; blanco perras control).....	91
Anexo 9. Análisis del dendrograma.....	92

Índice de Abreviaturas.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

BRCA1 / 2: Genes 1 y 2 del cáncer de mama

COX-2: Ciclooxygenasa 2

CMT: Tumor mamario canino.

DSB: rotura de doble cadena del DNA

ERs: Receptor de estrógenos

ER β : Receptor de estrógeno beta

ESR1: Receptor de estrógenos 1

H&W: Equilibrio de Hardy-Weinberg

HER-2/neu: Proteína que participa en el desarrollo normal de las células.

HBC: Tumor mamario en humanos

Indels: inserción o deleción

Ki67: factor de proliferación celular

Lnn: linfonodo

MMP-9: Matrix metalopeptidasa 9

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PAAF: Punción aspiración con aguja fina

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PRs: Receptor de progesterona

PARP: Proteína de poli (ADP-Ribosa)

PARPi: Inhibidor de PARP

RPA: Proteína de replicación

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido.

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó el estudio clínico en 32 perras con tumores de mama, realizándose la estadificación y la clasificación histopatológica de los mismos. Se realizó el estudio genético buscando SNPs del exón 22 y exón 23 del gen *BRCA1* y del exón 11 y exón 27 del gen *BRCA2*. Observamos que la edad media de presentación de perras con tumores de mama fue de 9 años. Las mamas más afectadas fueron las abdominales caudales, e inguinales, 20 de las 32 perras presentaban tumores múltiples (62 %) y un 38% tumores únicos. Con respecto a las razas las más representativas fueron las cruza, Caniche, Cimarrón y Labrador. De las 32 perras estudiadas con tumores de mama el 65% (21) tuvieron diagnóstico histopatológico de tumor maligno mientras que, el 35% (11) fueron benignos. Con los datos de la estadificación clínica se pudo observar que el 64% de las perras que presentaron tumores benignos se encontraban en estadio I (1 a 3 cm) y 36 % se encontraban en estadio II (3 a 5 cm). Dentro de las perras que obtuvieron un diagnóstico de tumores malignos, el 57% se encontraban en estadio III, el 9% en estadio II y 24% en estadio I. En el presente estudio no se obtuvieron animales que se encontraran en estadios IV y un 10 % estaban en estadio V de la enfermedad (metástasis en pulmón). Los tumores malignos encontrados con más frecuencia fueron el carcinoma tubular y el carcinoma complejo, seguido por el carcinoma sólido y el túbulo papilar. Dentro de los tumores benignos se destacó con mayor frecuencia el adenoma complejo seguido por el tumor benigno mixto y el papiloma ductal simple. Se obtuvo una correlación moderada en lo referente a la estadificación clínica e histopatología ya que observamos tumores benignos T2 (de 3 a 5 cm) y tumores malignos T1 (1 a 3 cm) lo que hizo que la correlación no fuera fuerte. En cuanto al estudio genético se analizaron el exón 22 y exón 23 del gen *BRCA1* y el exón 11 y exón 27 del gen *BRCA2* en casos clínicos de perras con tumores de mama y en casos control sin tumores. Se estudiaron 15 marcadores moleculares (SNPs, Indels) descritos en la plataforma Ensembl <http://www.ensembl.org/index.html> El cálculo de frecuencia de cada SNPs se realizó empleando el programa Genetix. Los estudios de asociación se realizaron mediante dendrogramas, función hclust del paquete stats en R. Los resultados fueron que 6 de los 15 marcadores estudiados fueron polimórficos (todos del tipo SNP). Por otro lado, observamos SNPs tanto en perras con tumores de mama como en las perras control, por lo que concluimos que esta observación no está relacionada con la presencia de tumores de mama en estas perras.

SUMMARY

In this work, a clinical study was carried out in 32 female dogs with mammary neoplasms, the corresponding staging and pathological classification was completed. The genetic study was accomplished in search of SNPs on the exon 22 and exon 23 from the *BRCA1* gene and exon 11 and exon 27 of the *BRCA2* gene. It was observed that the average age of the affected bitches was 9 years old. The most affected mammary glands were the caudal abdominal and the inguinal, 20 out of the 32 animals presented multiple neoplasms (62%) and 38% had a single tumor. In what concerns to the most representative dog breeds, we find Mongrel dogs, Poodle, Cimarrón and Labrador. Of the 32 studied dogs, 65% (21) had a histopathological diagnosis of a malignant neoplasm while 35% (11) were benign. With the data collected from the clinical staging, we were able to state that 64% of the female dogs that presented benign tumors were found in stage I (1 to 3 cm) and 36% were found in stage II (3 to 5 cm). Between the bitches with malignant tumors, 57% were animals found in stage III, 9% in stage II, and 24% in stage I. In the present study, no animals were found in stages IV and 10% were in stage V of the disease (i.e., lung metastases). The most frequently encountered malignant tumors were tubular carcinoma and complex carcinoma, followed by solid carcinoma and papillary-tubular carcinoma. Among benign tumors, complex adenoma was the most frequently detected, followed by the mixed benign tumor and simple ductal papilloma. A moderate correlation was obtained between clinical staging and histopathology, although we observed some size overlapping between T2 benign (3 to 5 cm) and T1 malignant (1 to 3 cm) neoplasms, which made the correlation not strong. Regarding the genetic study, exon 22 and exon 23 of the *BRCA1* gene and exon 11 and exon 27 of the *BRCA2* gene were analyzed in clinical cases of dogs with mammary tumors and in control cases without tumors. 15 molecular markers (SNPs, Indels) described in the Ensembl platform <http://www.ensembl.org/index.html> were studied. The frequency calculation of each SNP was carried out using the Genetix program. Association studies were carried out using dendrograms, hclust function from stats package in R. We found that 6 out the 15 markers studied were polymorphic (all the SNP type). We observed SNPs both in dogs with mammary neoplasia and control dogs. For this reason, we conclude that this observation is not related to the presence of mammary neoplasms in the studied dogs.

INTRODUCCIÓN

1.1) La hembra canina como modelo experimental en el estudio de cáncer de mama.

El cáncer es la primera causa de muerte en perros, siendo responsable de un 27-30% de las muertes, aumentando hasta el 50% en algunas razas como el Golden Retriever o el Boyero de Berna (Adams et al. 2010; Fleming et al. 2011).

Un estudio realizado entre 1985 y 2002 indicó que la incidencia de cáncer fue 3 veces mayor en hembras que en machos, diferencia que se explica por la alta tasa de cáncer de mama observado en perras (Merlo et al. 2008).

Por este motivo el Instituto Nacional del Cáncer reconoció el potencial para avanzar en el estudio del cáncer en animales de compañía mediante el establecimiento del Programa de Oncología Comparada en el año 2003 (Paoloni et al. 2008). Son ya varios los estudios llevados a cabo por estas instituciones que han facilitado información a estudios de medicina humana (Paoloni et al. 2014).

Otra de las similitudes encontradas entre los seres humanos y perras es el componente genético y riesgo hereditario de padecer cáncer de mama como los genes *BRCA1* y *BRCA2*, genes supresores de tumores. Mutaciones en estos genes conducen a la acumulación de daño en el ADN y el aumento de la posibilidad de desarrollar cáncer de mama y ovario en mujeres (Rivera et al. 2011).

Tanto *BRCA1* como *BRCA2* se han identificado también en el desarrollo de tumores mamarios en el Springer Spaniel Inglés (Rivera et al. 2009; Rivera et al. 2011).

Los perros desarrollan tumores mamarios y otros tipos de cáncer espontáneamente con un sistema inmune intacto, que exhibe una serie de similitudes clínicas y moleculares con el cáncer de mama en humanos. Además de la presentación espontánea del tumor, las similitudes clínicas entre los tumores mamarios humanos (HBC) y caninos (CMT) incluyen la edad de inicio (a partir de los 6 años en perras y 40 en mujeres), la etiología hormonal y el curso de la enfermedad. Además, los factores que afectan el resultado de la enfermedad, incluido el tamaño del tumor, la etapa y la invasión de los linfonodos, son similares en HBC y CMT. Del mismo modo, las características moleculares del receptor de esteroides, el factor de crecimiento epidérmico, el marcador de proliferación, la expresión de metaloproteinasas y ciclooxigenasa, y la mutación del gen supresor de tumores *p53* en CMT, imitan al HBC. Además, los carcinomas ductales in situ en las glándulas mamarias humanas y caninas son particularmente similares en sus características patológicas, moleculares y visuales. Las características de los CMT y sus similitudes con los HBC indican que el perro podría ser un excelente modelo para el estudio de la enfermedad en humanos (Somaya et al. 2018).

1.2) Epidemiología de los tumores de mama.

La perra posee 4-6 pares de mamas divididos en dos cadenas (derecha e izquierda) y se designan, según su localización, como torácicas (cranial y caudal), abdominales (cranial y caudal) e inguinales. Se pueden numerar también del 1 al 5 siendo el 1 la primera torácica y la 5 la última inguinal. Las glándulas mamarias son glándulas cutáneas modificadas, tubuloalveolares compuestas. Su desarrollo comienza en el embrión, pero su crecimiento total no se produce hasta la pubertad y concluye luego de la primera parición (Claver et al. 1985).

Los tumores de mama son las neoplasias más frecuentes en las perras enteras representando cerca de la mitad de los casos oncológicos (Sorenmo et al. 2000; Hermo et al. 2005; Ochiat et al. 2015). Menos del 1% de las neoplasias de glándula mamaria se presenta en caninos machos, normalmente se producen por la secreción de estrógenos por parte de un tumor testicular en las células de Sertoli (Rutteman et al. 2000; Ogilvie et al. 2008; Von Euler H, 2014).

La incidencia de tumores benignos y malignos en poblaciones de perros se correlaciona con la expectativa de vida y es reducida de manera importante por las prácticas de ovariectomía (castración) en perras jóvenes, la cual es común en Estados Unidos, pero no está fomentada en algunos países europeos ni en Uruguay. La incidencia aumenta por el uso de progestágenos inhibidores del estro (Lana, S. 2008; Nelson y Couto, 2010). En nuestro país se realizó un estudio entre los años 2005 a 2009 sobre los factores asociados a la presentación del tipo de cáncer en caninos atendidos en el Hospital de la Facultad de Veterinaria donde se observó que el tipo de cáncer que se presentó con mayor frecuencia en hembras caninas fue el de mama (Elgue et al. 2012).

Por otra parte, el índice de incidencia estandarizada para tumores de mama es de 205/100.000 perros por año, basándose en una población definida de perros asegurados en el Reino Unido (Dobson et al. 2002).

Aproximadamente la mitad de los tumores mamarios caninos son malignos y la mitad de estos han hecho metástasis al momento del diagnóstico inicial. Dos tercios de las neoplasias malignas ocurren en las mamas abdominales caudales, e inguinales, probablemente debido al mayor volumen de tejido mamario presente en las mismas (Kurzman et al. 1986). En más del 50 % de los casos se afectan múltiples glándulas. Pueden estar fijados a la piel, pero por lo general no se adhieren a la pared corporal subyacente, aunque los malignos más que los benignos tienen mayor probabilidad de fijarse a la pared abdominal y estar cubiertos por piel ulcerada (Nelson y Couto, 2010; Vail et al. 2020).

Los tumores de mama benignos en su mayoría son fibroadenomas. Los tumores malignos más habituales en esta especie son los carcinomas sólidos, seguidos de los adenocarcinomas tubulares, solamente el 3% son sarcomas y el 1% son carcinomas inflamatorios (Ruthane et al. 2007) En la figura 1 se muestra un paciente con carcinoma inflamatorio.



Figura 1. Carcinoma inflamatorio. Nótese el edema, eritema y engrosamiento de la piel que estaban asociados a signos de dolor. Paciente canino, hembra de 12 años, atendido en la Consulta Especializada de Oncología (Facultad de Veterinaria, UdelaR).

Según otros autores, dentro de los tumores malignos el de mayor presentación es el carcinoma tubular simple, seguido del carcinoma sólido simple, carcinoma tubular complejo y el carcinoma papilar quístico simple, y por último los distintos tipos de sarcomas (Flores Alés, 1996; Oliveira de Oliveira et al, 2003). En el trabajo de Flores Alés (1996) dentro de los tumores benignos, los adenomas son los más frecuentes luego el fibroadenoma y el tumor mixto benigno. Sin embargo, en otros trabajos, el tumor benigno más frecuente fue el tumor mixto benigno, seguido del adenoma complejo y el fibroadenoma (Ziller Ortiz, 2004).

La edad promedio de las perras afectadas es de 10 a 11 años (rango 2 a 16). Los tumores benignos se presentan en animales más jóvenes que los malignos (Ogilvie et al. 2008; Rivera et al. 2009).

1.3) Etiopatogenia.

En las perras la etiopatogenia de los TMC es multifactorial. La formación tumoral es muy compleja y requiere la acumulación de múltiples alteraciones oncogénicas. Tras el sexo y la edad, el principal factor de riesgo para desarrollar esta enfermedad es una historia familiar positiva, lo que sugiere la existencia de factores genéticos que predisponen al desarrollo de cáncer de mama. En mujeres se considera que la proporción de neoplasias mamarias directamente atribuibles a factores hereditarios es de un 5% a un 10% del total (De la Hoya, 2000).

El desarrollo de tumores mamarios en la perra es claramente hormono-dependiente. Comparado con las perras intactas, el riesgo para los tumores malignos en perras esterilizadas antes del primer estro es 0,5%, luego del primer estro aumenta a un 8%, y se incrementa a un 26% si la castración es después del segundo estro (Paoloni et al. 2007; Sobral et al. 2008; Al-Dissi et al. 2010; Liu et al. 2014). La esterilización más tardía no reduce el riesgo para los tumores malignos, aunque sí parece ser reducido el riesgo para tumores benignos (Ruthane et al. 2007; Lana et al. 2008; Rivera et al. 2009).

El tejido de la glándula mamaria normal contiene receptores de estrógenos (ERs) y de progesterona (PRs) como ocurre en la mayoría de los tumores benignos. Como contraste, los carcinomas, desprovistos de remanentes de epitelio mamario normal en muy pocos casos contienen ERs y PRs, con rara presencia en las metástasis (Lana et al. 2008). Se han encontrado receptores para estrógenos y progesterona en el tejido glandular mamario normal, en el 70% de los tumores benignos y en el 50% de los tumores malignos. Los tumores que no presentan receptores son los más agresivos e indiferenciados. La presencia de receptores es poco frecuente en las metástasis, lo que indicaría un patrón de crecimiento autónomo. Este hallazgo concuerda con la idea de que una alteración en el mecanismo normal de expresión de dichos receptores produciría un progresivo desarrollo de tumores malignos o que la progresión tumoral implica la alteración de su expresión. (Corrada et al. 2001; Della Cella, 2014).

Otro factor importante a tener en cuenta es que los caninos comparten el mismo ambiente que los seres humanos y están expuestos a muchos de los mismos carcinógenos. El efecto protector de la gestación temprana en humanos no ha sido demostrado en perras. (Liu et al. 2014).

1.4) Factores de riesgo.

Existen diversos factores de riesgo que predisponen al animal a presentar tumores mamarios:

Edad: Se considera uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de tumores mamarios con una incidencia máxima entre los 8 y 11 años, y los perros más jóvenes son propensos a tener tumores benignos (Burrai et al. 2020; Vail et al. 2020).

A pesar de tener diferentes expectativas de vida, la edad promedio de inicio de los tumores mamarios es aproximadamente la misma en tiempos biológicos para las mujeres (después de los 40 años) y perras (después de los 6 años). Además, la máxima incidencia de la enfermedad es también comparable entre las dos especies (50-58 años en mujeres y 8-11 años en perros) (Queiroga et al. 2011).

Raza: No hay consenso con respecto a las razas que tienen mayor incidencia. Según se afirma el Chihuahua y Bóxer tienen menor riesgo de padecer tumores mamarios que otras razas (Ogilvie et al. 2008). Sin embargo, un estudio en Suecia menciona que varias razas de perros, entre las que se encuentran el Doberman, Ovejero Alemán, y Bóxer, están predispuestos a tumores de mama (Rivera et al. 2009). Diversos estudios demuestran que, en el desarrollo de tumores mamarios además de los factores hormonales existe una influencia de factores genéticos y una elevada predisposición racial a algunos tipos de cáncer (Benavente, 2016). En un estudio realizado por Zatloukal et al. (2005), en la República Checa, reportaron que las razas con mayor incidencia de tumores mamarios eran Cocker Spaniel, Caniche y Dachshund, mientras que en un estudio realizado en Argentina

por Benavente et al en 2013, las razas más diagnosticadas fueron el Cocker Spaniel, Pekinés y el Ovejero Alemán.

En un estudio publicado por Burrai et al. (2020), el 61% de las CMT se observaron en perras de raza pura, lo que sugiere, que la raza podría ser un factor de riesgo, y que ciertas razas, como Caniche, Shih Tzu, así como el Ovejero Alemán, son propensos a desarrollar neoplasias mamarias.

Por lo tanto, parece ser que el riesgo varía según el estudio y la localización geográfica. (Egenvallet, et al. 2005).

Se sabe poco sobre la neoplasia canina familiar, aunque diversos autores han mencionado una mayor incidencia en animales cruce que en razas puras (Nieto et al. 2003). Algunas discrepancias notables existen, específicamente entre los informes estadounidenses y europeos. La raza Bóxer tiene un riesgo reducido de CMT según los datos de la Universidad de Pensilvania, mientras que los estudios escandinavos reflejan un mayor riesgo en el Bóxer. Un estudio de la raza Beagle mostró que dos líneas o familias diferentes tienen riesgos muy diferentes. Estos resultados apoyan colectivamente una influencia genética en el desarrollo de CMT (Vail et al. 2020).

Uso de progestágenos: Su uso a largo plazo se evidenció en más del 70% de las perras que presentaron tumores (Nelson y Couto, 2010; Vail et al. 2020).

Obesidad: Este elemento también puede ser un factor predisponente en la neoplasia mamaria canina. Experimentalmente en roedores, y estudios epidemiológicos en humanos han mostrado que una dieta alta en grasa y la obesidad incrementa el riesgo de tumor de mama. El tejido adiposo tiene la particularidad de poder sintetizar algunos esteroides. Las grandes cantidades de tejido adiposo contribuyen a la exposición de la glándula a estrógenos promoviendo la tumorigénesis (Simpson, 1996; Ogilvie et al. 2008; Lana et al. 2008). Se ha visto que el riesgo de padecer tumores mamarios aumenta en aquellas perras que en su juventud fueron obesas (Pérez Alenza et al. 1998).

Se ha sugerido que los frecuentes episodios de pseudogestación podrían incrementar la aparición de lesiones preneoplásicas (Murrel et al. 1991; Rutteman et al. 1990). Este aumento del riesgo ligado a la pseudogestación podría ser secundario a la asociación del efecto de la edad y a la acumulación de productos de secreción dentro de la mama. Estos productos no se eliminan como en la lactancia fisiológica. Habría una combinación de hipoxia ligada a la distensión de los acinos, liberación de radicales libres carcinogénicos y acumulo de productos carcinogénicos de origen alimenticio o derivados de la degradación de la misma leche. Estos productos estarían en un contacto prolongado con el epitelio mamario y podrían inducir a lesiones preneoplásicas o influenciar la evolución de lesiones preexistentes. Dentro de todo esto, la prolactina jugaría un rol indirecto por inducción a la pseudopreñez (Corrada y Gobello, 2001).

1.5) Presentación clínica de tumores de mama.

Los tumores mamarios se manifiestan clínicamente como un nódulo único o múltiples desarrollándose simultánea o subsecuentemente (Vail et al. 2020). Los tumores mamarios pueden variar de tamaños desde unos pocos milímetros hasta varios centímetros (Ogilvie et al. 2008) (figura 2). Al menos el 50% de las perras con neoplasias mamarias tienen masas tumorales múltiples, sin embargo, el pronóstico no está influido por su residencia o cantidad (Ogilvie et al. 2008). Del 41 al 53% de los tumores mamarios que aparecen en la perra son considerados malignos. Pueden estar asociados al pezón o más a menudo con el tejido glandular. En los casos de tumores mamarios benignos, el tumor es pequeño bien circunscripto y firme a la palpación (Vail et al. 2020). También puede ocurrir que de una misma masa tumoral pueda obtenerse una apariencia histológica variable. Los tumores malignos más que los benignos tienden a fijarse a la pared corporal (Nelson y Couto, 2010). La mayoría de los tumores mamarios malignos son clasificados como tumores epiteliales o carcinomas. Los sarcomas puros (fibrosarcomas, osteosarcomas, sarcomas de otro tipo) representan una minoría (Lana et al. 2008).

Según Gurrai et al. (2020) el tamaño del tumor se considera uno de los principales hallazgos macroscópicos relacionados con el comportamiento de la patología. Consideraron el papel del tamaño del tumor como un factor de CMT clínico relacionado con el pronóstico. Se vio que los tumores benignos eran más pequeños que los tumores malignos.



Figura 2. A) Carcinoma mamario con metástasis en piel. B) Carcinoma mamario ulcerado. Recidiva luego de la cirugía. Fotos tomadas en la Consulta Especializada de Oncología, Facultad de Veterinaria (UdelaR).

1,6) Diagnóstico de los tumores mamarios.

En perras de edad avanzada, la neoplasia mamaria debe ser la primera patología a considerar cuando se observa un nódulo que afecta al tejido mamario. De todas formas, no se puede descartar que se trate de otro tipo de lesiones benignas como mastitis, galactostasis, galactorrea; o una neoplasia de los tejidos adyacentes (mastocitoma, lipoma, carcinoma de células escamosas, etc.). En el proceso diagnóstico inicial es muy importante obtener una historia clínica completa, una exploración física completa y una exploración detallada de todas las glándulas mamarias y linfonodos regionales, así como una analítica sanguínea completa que incluya hemograma y bioquímica sérica, urianálisis, para así determinar el estado general de salud del animal (Borrego, 2016).

La punción aspiración con aguja fina (PAAF) para realizar una citología para diferenciar entre tumor maligno y benigno ha sido comunicada como un método no válido, sin embargo, la evaluación citológica de la masa puede descartar otras lesiones como lesiones inflamatorias, lipomas o mastocitomas (Ruthane et al. 2007; Lana et al. 2008). La PAAF para evaluación citológica quizás también sea beneficiosa para el diagnóstico de los carcinomas inflamatorios (figura 3).

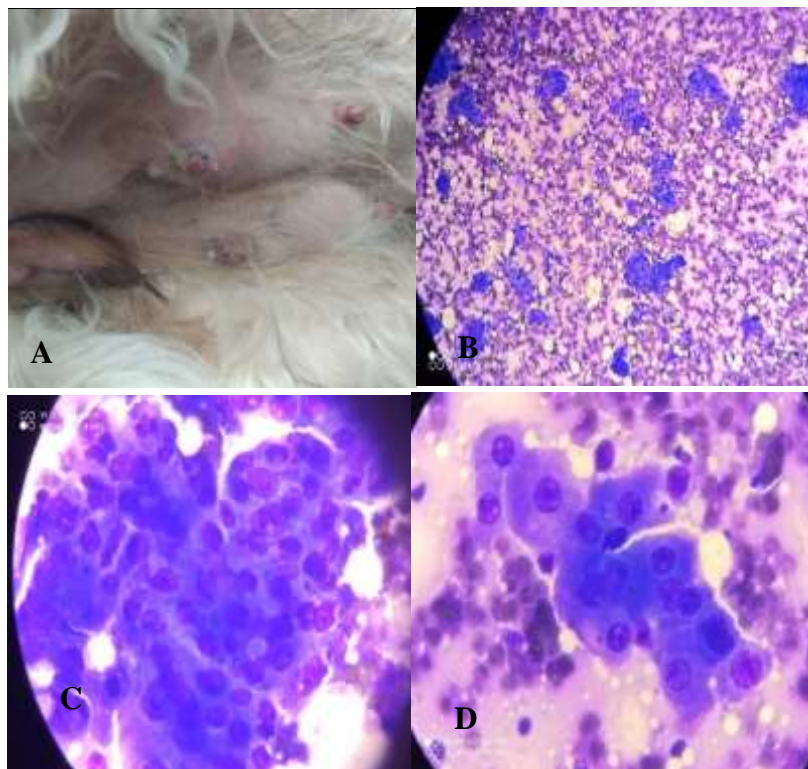


Figura 3. A) Paciente con carcinoma inflamatorio. Se realizó estudio citológico por PAAF. B) Imagen panorámica constituida por grupos cohesivos de células epiteliales.10x. C y D. A mayor aumento las células epiteliales presentan criterios de malignidad incluyendo anisocitosis, anisocariosis, macronucleolos y multinucleolos.100x Tinción Diff Quick

Fotos cedidas por la Dra. Cecilia Menéndez (Hospital, Facultad de Veterinaria).

Si se sospecha de metástasis hacia los linfonodos, la citología debe ser usada para evaluar los linfonodos sospechosos. La citología por PAAF puede colaborar con el diagnóstico definitivo en algunos casos, no obstante, los resultados citológicos pueden ser engañosos. La principal finalidad de la citología es distinguir entre lesiones inflamatorias y neoplásicas, y diferenciar entre neoplasias malignas y benignas. Las lesiones de la glándula mamaria suponen un reto especial debido a la diversidad de tipos celulares que pueden estar involucrados y a la frecuente superposición de poblaciones celulares dentro de las lesiones hiperplásicas, displásicas, benignas y malignas. El diagnóstico por citología exacto para poder diferenciar neoplasias mamarias malignas y benignas en los perros, va a variar desde un 33% hasta el 79% (Allison, 2009).

El método definitivo de obtener un diagnóstico es por medio de la biopsia de tejido. Siempre se recomienda la biopsia escisional o incisional. (Lana, 2008).

1,7) Estadificación clínica de tumores mamarios.

La importancia de la estadificación radica en permitir al clínico realizar un pronóstico de la enfermedad y planificar un posible tratamiento. El sistema utilizado es el propuesto por Owen en 1980 para la Organización Mundial de la Salud (OMS). Esta estadificación se realiza mediante el sistema TNM, donde se categoriza a los animales en 5 estadios según el tamaño tumoral y su adhesión a tejido adyacente (T), la afectación de linfonodos regionales (N), y la presencia o ausencia de metástasis a distancia (M) (cuadro I).

Cuadro I. Esquema de estadificación para los tumores mamarios caninos.

ESTADIOS	PARÁMETROS		
	T	N	M
	TAMAÑO	NÓDULO	METÁSTASIS
I	T1	NO	MO
II	T2	NO	MO
III	T3	NO	MO
IV	Cualquier T	N1	MO
V	Cualquier T	Cualquier N	M1

T tumor primario
 T1 menor a 3 cm. de diámetro
 T2 3 a 5 cm. de diámetro
 T3 mayor a 5 cm. de diámetro

N linfonodo regional
 NO sin metástasis
 N1 metástasis

M metástasis distante
 MO sin metástasis
 M1 metástasis

Fuente (Ogilvie et al. 2008)

Las características a evaluar en el tumor primario son crecimiento rápido reciente, tamaño, evidencia clínica de invasión (fijación a la piel o fascia), ulceración, y evidencia clínica de carcinoma inflamatorio (Lana et al. 2008).

Las metástasis en los tumores mamarios malignos se producen a través de los vasos linfáticos a linfonodos regionales, o vía hematogena, siendo los pulmones el sitio más frecuente de metástasis a distancia (Sorenmo et al. 2011).

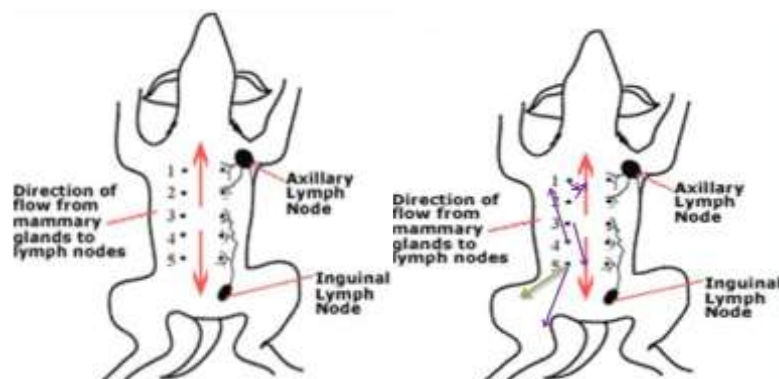
La ecografía es un componente de la estadificación exhaustiva con el fin de evaluar la posible extensión locorregional (linfonodo inguinal superficial, linfonodos axilares) o linfadenopatía metastásica intraabdominal, especialmente en aquellos casos en que los tumores de mama se localizan en las glándulas mamarias caudales o que presenten factores pronósticos negativos. La sospecha ecográfica de metástasis debe confirmarse preferentemente mediante análisis citológico de una PAAF ecoguiada. (Borrego, 2016).

Por lo tanto, la estadificación debe incluir la base de datos mínima, consistente en radiología torácica (tres incidencias: dorsoventral, laterolateral derecha y laterolateral izquierda) (figura 4), ecografía abdominal, hemograma completo, panel de bioquímica sérica, urianálisis y evaluación de linfonodos regionales mediante palpación. Los linfonodos axilar e inguinal deben ser palpados y aspirados para citología si están aumentados de tamaño (Ogilvie et al. 2008).



Figura 4. Procedimiento radiográfico de rutina (3 incidencias), realizado en oncología para exploración de tórax: A) Incidencia latero-lateral derecha; B) Incidencia dorsoventral; C) Incidencia latero-lateral izquierda. Paciente: canino, hembra de 6 años de edad donde no se aprecian metástasis pulmonares. Foto cedida por la Unidad de Imagenología, Facultad de Veterinaria.

Las dos glándulas mamarias caudales (4 -5) comunican con el linfonodo inguinal superficial mientras que las glándulas craneales (1-2) comunican con el linfonodo axilar. La tercera glándula puede drenar tanto al linfonodo axilar como inguinal. Los carcinomas que tienen lugar en la mama 5 pueden mostrar metástasis a través del plexo linfático en el subcutis de la parte interna del muslo a linfonodos poplíteos. (Ogilvie et al. 2008) (figura 5, cuadro II).



Drenaje linfático en perras sin tumores. Drenaje linfático en perras con tumores de mama.

Figura 5. Esquema donde se observa la numeración empleada para los tumores de mama en perras y el drenaje linfático en perras sin tumores de mama y perras con tumores. Fuente: (GESVONC, 2015).

Cuadro II. Drenaje linfático en perras sin tumor de mama y perras con tumores.

Glándula mamaria	Drenaje linfático normal	Drenaje linfático neoplásico.
1°	Linfonodo(lnn) axilar	Lnn axilar/esternal
2°	Lnn axilar	Lnn axilar/esternal
3°	Lnn axilar/inguinal	Lnn axilar/inguinal/iliaco medial
4°	Lnn inguinal	Lnn inguinal/axilar
5°	Lnn inguinal	Lnn inguinal/poplíteo/vasos linfáticos mediales del muslo.

Fuente: (GESVONC, 2015)

1.8) Clasificación de tumores de mama.

En 1974, la OMS publicó la primera “Clasificación Histológica Internacional de Tumores en Animales Domésticos”, donde se incluyen tumores y displasias de la glándula mamaria. Éste sistema de clasificación estaba basado en tres trabajos sobre tumores mamarios malignos en caninos publicado en “Veterinary Pathology” (Misdorp et al. 1973). Estas publicaciones incluían un glosario basado en la morfología descriptiva, que formó las bases para la clasificación de los tumores mamarios malignos caninos (Misdorp et al. 1972). Varias clasificaciones de tumores mamarios en caninos han sido propuestas (Monlux et al.1977; Moulton et al. 1979).

La clasificación revisada y establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en un intento por obtener una división pronóstico de peso, es descriptiva y subdivide además los carcinomas en no-infiltrativos, carcinomas simples (túbulo-papilar, sólido, o anaplásico) o complejos. Esta subdivisión se fundamenta en clasificar los tumores por el aumento en su potencial malignidad (Von Euler, 2014). La clasificación de la OMS sigue el proceso de diferenciación, comenzando por los tumores malignos que más estrechamente se asemejan a la estructura normal de la glándula mamaria y finalizando con los tumores poco diferenciados que no presentan estructura glandular. Proporcionó un sistema de clasificación histológica que pudiera ser útil para alcanzar un pronóstico. Su objetivo es la estandarización internacional de la terminología y la nomenclatura de los tumores mamarios caninos, la cual combina la clasificación morfológica descriptiva con un criterio pronóstico, clasificando los tumores mamarios más frecuentes en grados crecientes de malignidad. (Misdorp et al. 1999). (Cuadro III)

Esta clasificación ha sido posteriormente modificada en el año 2011, proponiendo la clasificación histológica y la nomenclatura de las neoplasias y de las displasias de la glándula mamaria en la especie canina (Goldsmith et al. 2011).

Las clasificaciones anteriores no incluían los carcinomas inflamatorios, al considerar que no se trataba de un subtipo histológico específico, refiriéndose únicamente a un nombre genérico dado a un carcinoma de mama con marcada inflamación (Misdorp et al. 2002). En la nueva clasificación de Goldsmith et al. (2011) el carcinoma inflamatorio ya aparece como una entidad específica. (Cuadro IV).

Esta clasificación histológica de los tumores de mama en perras, fue validada en el año 2017 por Rasotto et al. 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 (Goldshmidt et al. 2011, Rasotto et al. 2017).

Esta clasificación incorpora algunas neoplasias como entidades específicas. Éstas incluyen el tipo cribiforme del carcinoma simple y el comedocarcinoma, ambos descritos bajo la forma de carcinoma in situ. Otros han sido identificados como variantes malignas de neoplasias anteriormente descritas como benignas, e incluyen el carcinoma ductal, contraparte maligna del adenoma ductal previamente clasificado como un adenoma basaloide, y el carcinoma papilar intraductal, contraparte maligna del adenoma papilar intraductal previamente clasificado como papiloma ductal (Misdorp et al. 1999). Los carcinomas micropapilares (una entidad recientemente descrita) han sido incorporados en esta clasificación (Gama et al. 2008). Otras nuevas entidades, como el carcinoma y mioepitelioma maligno han sido identificadas usando marcadores inmunohistoquímicos para células epiteliales (CK8, 18, 19 Y CK7) y para células mioepiteliales y basales (CK5, 6, 14, 17, actina de músculo liso, calponina, vimentin, p63) (Sorenmo et al 2011). Se incorporaron otras nuevas entidades recientemente descritas como el carcinoma micropapilar y la hiperplasia lobulillar regular (adenosis), pero los criterios generales establecidos para la clasificación de los tumores mamarios no han cambiado. Según Goldsmith et al. (2011) el mayor problema al evaluar las neoplasias mamarias en caninos es identificar aquellas neoplasias que son realmente malignas. La presencia de algunas células con núcleo grande y nucléolo prominente, a menudo lleva al sobre diagnóstico de carcinoma mamario.

Los siguientes son los criterios más significativos para el diagnóstico de tumores mamarios malignos en perros, basados en secciones de Hematoxilina-Eosina:

- Tipo tumoral.
- Pleomorfismo nuclear y celular significativo.
- Índice mitótico.
- Presencia de áreas de necrosis distribuidas aleatoriamente dentro de la neoplasia.
- Invasión peri tumoral y linfática.
- Metástasis al linfonodo regional.

Se incorporaron modificaciones de acuerdo con el tejido de origen: epitelial, mioepitelial, o mesenquimal (Misdorp et al. 2002). La mayoría de los tumores de glándulas mamarias son de origen epitelial simple, algunos, sin embargo, pueden tener más de un tipo de tejido como ser tejido epitelial y mioepitelial (tumores complejos) o con áreas de cartílago y hueso (tumores mixtos).

Cuadro III. Clasificación de los tumores de mama según Misdorp et al. (1999).

Por columna los tumores malignos están en orden creciente de malignidad (arriba hacia abajo).

Tumores malignos.	Tumores benignos	Lesiones no clasificadas
Carcinoma in situ no infiltrativo	Adenoma simple	Displasia mamaria
Carcinoma complejo	Adenoma basaloide	Hiperplasia ductal
Carcinoma simple	Adenoma complejo	Hiperplasia lobular (lobulillar)
Carcinoma túbulo-papilar	Fibroadenoma	Fibrosis focal
Carcinoma sólido	Papiloma ductal	Ectasia ductal
Carcinoma anaplásico	Tumor mixto benigno	Ginecomastia.
Tipos especiales de carcinomas		
Carcinomas de células fusiformes		
Carcinoma con diferenciación escamosa		
Carcinoma mucinoso		
Carcinoma rico en lípidos		
Sarcomas		
Fibrosarcomas		
Osteosarcomas		
Condrosarcomas		
Carcinosarcomas		

Cuadro IV. Clasificación de Goldschmidt et al. (2011).

<p>Neoplasias epiteliales malignas</p> <p>Carcinoma in situ</p> <p>Carcinoma simple</p> <p style="padding-left: 40px;">Tubular</p> <p style="padding-left: 40px;">Tubulopapilar</p> <p style="padding-left: 40px;">Papilar cístico</p> <p style="padding-left: 40px;">Cribiforme</p> <p>Carcinoma micropapilar invasivo</p> <p>Carcinoma sólido</p> <p>Comedocarcinoma</p> <p>Carcinoma anaplásico</p> <p>Carcinoma surgiendo de un adenoma complejo/tumor mixto.</p> <p>Carcinoma de tipo complejo</p> <p>Carcinoma y mioepitelioma maligno</p> <p>Carcinoma mixto</p> <p>Carcinoma ductal</p>	
<p>Neoplasias epiteliales malignas: tipos especiales.</p> <p>Carcinoma de células escamosas.</p> <p>Carcinoma adenoescamoso</p> <p>Carcinoma mucinoso</p> <p>Carcinoma rico en lípidos</p> <p>Neoplasia de células fusiformes</p> <p>Mioepitelioma maligno</p> <p>Carcinoma de células escamosas- variante de células fusiformes</p> <p>Variante de carcinoma de células de huso</p>	<p>Neoplasias mamarias benignas.</p> <p>Adenoma simple.</p> <p>Adenoma papilar intraductal. (Papiloma ductal)</p> <p>Adenoma ductal. (Adenoma basaloide)</p> <p>Fibroadenoma</p> <p>Mioepitelioma</p> <p>Adenoma complejo (Adenomioepitelioma)</p>

Carcinoma inflamatorio	Tumor benigno mixto.
Neoplasias malignas mesenquimales. (Sarcomas) Osteosarcoma. Condrosarcoma Fibrosarcoma Hemangiosarcoma	Hiperplasia y displasia mamaria. Ectasia del conducto. Hiperplasia lobulillar regular (adenosis). Hiperplasia lobulillar con actividad secretora (lactancia). Hiperplasia lobular con fibrosis (Tejido conectivo fibroso interlobular). Hiperplasia lobular con atipia
Tumores mamarios malignos mixtos. Carcinosarcoma.	Neoplasias del pezón Adenoma Carcinoma Carcinoma con infiltración epidérmica
	Hiperplasias/displasias del pezón Melanosis de la piel del pezón

1.9) Factores pronósticos.

La edad es considerada un factor negativo ya que las perras gerontes tuvieron pronósticos más sombríos en algunos estudios (Ogilvie et al. 2008).

El tamaño tumoral mayor a 3 cm, la afectación de linfonodos, los signos histológicos de invasión linfática y vascular, la ulceración y las metástasis a distancia también son factores de mal pronóstico. Las metástasis en linfonodos regionales se asociaron con mayor riesgo de recurrencia y disminución del tiempo de supervivencia global. Las perras sin metástasis tuvieron 3 veces más probabilidad de sobrevivir un año desde el diagnóstico que aquellas con enfermedad metastásica (Ruthane et al. 2007).

Perras con tumores menores de 3 cm, con crecimiento expansivo, bien, o moderadamente diferenciados y clasificados como carcinomas complejos, tuvieron tiempos de supervivencia significativamente más largos. En este estudio, realizado por Santos y colaboradores, considerando los tipos histológicos más frecuentes, los carcinosarcomas fueron los tumores más agresivos (33% de recurrencias locales y/o metástasis a distancia), mientras que los carcinomas complejos fueron los menos agresivos (20% de recurrencias locales y/o metástasis a distancia y un riesgo significativamente menor de muerte). Las diferencias entre los carcinomas simples y los otros grupos no fueron significativas, lo que demuestra que los carcinomas sólidos y tubulopapilares son probablemente un grupo heterogéneo de neoplasias, con distintas capacidades invasivas y metastásicas distribuidas equitativamente entre ambos grupos, como lo demuestran los porcentajes muy similares de recurrencias locales y/o metástasis a distancia (26.7% para sólidos y 27.7% para carcinomas tubulopapilares) (Santos et al. 2013).

La ulceración y la necrosis, dos características que se han sugerido como indicadores de mayor agresividad tumoral, no se relacionaron significativamente con el pronóstico en este estudio (Hellmén et al. 1993). Aunque la ulceración puede ser causada por el crecimiento invasivo del tumor, debe destacarse que también puede deberse a traumas autoinducidos, isquemia o infección de la piel, características que no están necesariamente asociadas a un comportamiento biológico agresivo. La necrosis se asoció a un peor resultado, pero diferentes metodologías de evaluación pueden explicar los resultados divergentes. (De Las Mulas et al. 2005).

Las perras con tumores positivos a los receptores de estrógenos y progesterona tienen mejor pronóstico que aquellas con neoplasias sin receptores con intervalo libre de enfermedad y tiempo de supervivencia global más prolongados. Los tumores positivos a los receptores tal vez sean benignos. (Ogilvie et al. 2008).

En mujeres las neoplasias positivas a ERs y PRs responden al tratamiento endocrino, pero los tumores que carecen de tales receptores no (Mc Guire et al. 1980; Nerurkar et al. 1987; Rooney et al. 1993). Otros análisis de expresión, llevados a cabo con técnicas de PCR a tiempo real, realizados en tumores mamarios de la mujer han encontrado una sobreexpresión del ER β en tumores con pronóstico desfavorable, como aquellos que no responden al tratamiento con Tamoxifeno (Iwao et al. 2000).

Se ha visto que la expresión de determinados genes como ser de MMP-9 por las células del estroma y de Ki-67 por las células tumorales son factores pronósticos independientes en los tumores mamarios caninos, que pueden usarse para la selección de aquellos animales que deben considerarse para el postoperatorio y tratamientos auxiliares. Estos factores exhibieron un valor pronóstico más fuerte que los parámetros clínicos o histológicos utilizados tradicionalmente para predecir el resultado del paciente, como el tamaño del tumor, el grado histológico y el modo de crecimiento. (Santos et al. 2013).

Con respecto a la extensión quirúrgica, los bordes quirúrgicos “limpios” según lo valorado con histopatología demostraron tener valor pronóstico para la supervivencia. El

procedimiento quirúrgico que se debe llevar a cabo es aquel que logra márgenes completos (Vail et al. 2020).

El pronóstico está estrechamente correlacionado con el nivel de diferenciación histopatológica. Los tumores malignos con el mejor pronóstico son los que presentan una estructura glandular con epitelio secretor que contenga alvéolos, túbulos y mioepitelio. Estos tumores se clasifican como carcinomas complejos, raramente metastatizan y mediante una escisión completa, su pronóstico es favorable. Si no existen células mioepiteliales, los tumores se denominan carcinomas simples, frecuentemente se dividen en carcinomas alveolares, tubulares, tubuloalveolares, papilares o papilares quísticos. Estos tumores son invasivos y pueden diseminarse a distancia. Si la diseminación ha sucedido a pesar de la eliminación quirúrgica, el pronóstico sigue siendo desfavorable. Si el tumor carece de estructuras lumenares, se denomina carcinoma sólido. Este tipo es más invasivo y tiende a metastatizar pronto, por lo que el pronóstico es más reservado. Las neoplasias menos diferenciadas con aspecto de tejido heterogéneo desorganizado son las más malignas. Estos tumores frecuentemente se conocen como anaplásicos y tienen una gran tendencia a invadir vasos linfáticos y sanguíneos. La invasión de vasos linfáticos cutáneos hace que la piel aparezca inflamada, de allí procede el término clínico descriptivo de carcinoma inflamatorio. El pronóstico para estos pacientes siempre es desfavorable, incluso recurriendo a la cirugía radical. A veces se observa el carcinoma de células escamosas en la glándula mamaria, su pronóstico es grave. La incidencia de los sarcomas es variable, del 5 al 10 %. La mayoría son osteosarcomas extraesqueléticos primarios o fibrosarcomas con pronóstico desfavorable. La glándula mamaria es la segunda zona más frecuente de localización de osteosarcomas en hembras enteras después del esquelético, y su comportamiento es igual de maligno. Si existen células neoplásicas malignas tanto epiteliales como mesenquimales, el tumor se denomina carcinosarcoma. Estos tumores son siempre muy agresivos y presentan un pronóstico similar al de los carcinomas anaplásicos (Goldschmidt et al. 2011; Cassali et al. 2013; Von Euler, 2014).

1.10) Estudio de genes *BRCA1* y *BRCA2*.

En lo que se refiere a la predisposición y distribución, se han identificado varios genes, aunque la mayoría de los factores de riesgo son desconocidos, conociéndose aún menos sobre el riesgo hereditario (Rivera et al. 2009). En un estudio de tumores de mama se evaluaron diez genes y se vio que *BRCA1* y *BRCA2* estaban asociados significativamente con la presencia de tumor mamario en caninos (Rivera et al. 2009).

Los genes de susceptibilidad al cáncer de mama *BRCA1* y *BRCA2* pertenecen al grupo de los genes supresores de tumores y juegan un rol crítico en la preservación de la estabilidad genómica, actuando como sensores de daño en el DNA, siendo responsables de su reparación (Pierce et al. 2002).

Por otra parte, mutaciones frecuentes en tumores humanos, han sido también descritas en tumores espontáneos caninos. Algunos ejemplos son la mutación V600E en BRAF, en carcinoma de próstata, carcinoma urotelial, melanoma, glioma o tumor de vaina nerviosa

periférico de los perros (Mochizuki et al. 2015) o las mutaciones del proto-oncogen c-kit, presente en perros con mastocitomas (London et al. 1999).

BRCA1 está involucrado en la etiopatogenia tumoral, es productor de una fosfoproteína que participa en la regulación del ciclo celular. La pérdida de la expresión de *BRCA1* fue asociada con una alta proliferación del marcador ki-67 y ERs alfa. La reducción y distribución de la proteína BRCA1 en tumores mamarios caninos fue significativamente asociado con características malignas. Los resultados podrían indicar que el gen *BRCA1* tendría un comportamiento maligno en esos tumores (Nieto et al. 2003).

El gen *BRCA1*, localizado en el cromosoma 9 en caninos, codifica una fosfoproteína nuclear de 220 kDa. *BRCA1* se asocia con la diferenciación funcional en numerosos tejidos y participa en la regulación del ciclo celular en células epiteliales mamarias. Está involucrado en la etiopatogenia tumoral. En caninos, su rol en tejido mamario normal no ha sido estudiado en profundidad, ni tampoco en tumores mamarios. (Nieto et al. 2003).

La pérdida de *BRCA1* produce ADN defectuoso ya que no se reparan los daños. Estos hallazgos apoyan el papel de que *BRCA1* es un gen supresor de tumores, la disminución de su expresión representa un paso crítico en el desarrollo del cáncer de mama (Nieto et al. 2003; Yoshikawa et al. 2012).

Con respecto al gen *BRCA 2*, localizado en el cromosoma 25 en caninos y 13 en humanos, se ha informado que sus mutaciones están asociadas con el desarrollo de tumores mamarios en perros ya que al clonar y secuenciarlo se encontraron polimorfismos (Ochiat et al. 2015).

En humanos se ha determinado que mutaciones en diversos genes predisponen al desarrollo de tumores mamarios (Rivera et al. 2009). Alteraciones en el gen *BRCA1* son responsables de parte de los cánceres de mama hereditarios en mujeres (Lana et al. 2008).

En humanos se ha visto que las mujeres que han heredado mutaciones en los genes *BRCA1* o *BRCA2* tienen aumentado sustancialmente el riesgo de padecer cáncer de mama, con un riesgo de por vida de 56% a 84%. La mayoría de las mutaciones de estos genes demostraron causar truncamiento de proteínas a través de indels, mutaciones sin sentido, variantes de empalme o reordenamientos (Rivera et al. 2009).

En un estudio exploratorio, la expresión de ARNm de BRCA1, BRCA2 y RAD51 se cuantificó en muestras de tejido microdisecionadas con láser altamente definidas de adenomas simples, adenocarcinomas de la glándula mamaria y sus metástasis en los linfonodos mediante PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real. Se encontró una sobreexpresión de RAD51 y BRCA2 en 8 de 10 (80%) y 5 de 10 (50%) de las metástasis en los linfonodos, respectivamente. La comparación directa de tumores primarios y metástasis reveló un aumento de la expresión de ARNm de BRCA1 (2/10 perros, 20%), BRCA2 (2/10 perros, 20%) y RAD51 (3/10 perros, 30%) en las metástasis de los linfonodos. En conjunto, los resultados sugieren que RAD51 está regulado al alza en la mayoría de las metástasis en los linfonodos de los tumores mamarios caninos (Klopfleisch et al. 2009).

Un elemento importante en la regulación de la transcripción de un gen, es el promotor. En un estudio se analizó la actividad del promotor de *BRCA1*, su estado de mutación y los patrones de expresión de *BRCA1* en caninos. Se concluyó que los niveles de la proteína *BRCA1* en tumores malignos son significativamente más bajos que en el tejido mamario normal. Además, se encontró una mutación puntual en el promotor de *BRCA1* (únicamente en tumores malignos) en una alta frecuencia. El promotor de *BRCA1* comparte 71% de identidad con el de humanos (Qiu et al. 2015).

Los estudios realizados a nivel internacional son en diferentes razas caninas. En nuestro país, la mayoría de los casos de tumores mamarios vistos en el Hospital de Facultad de Veterinaria son en perras mestizas y de diversas razas. Por otra parte, no se han realizado estudios de mutaciones en estos animales. Dada la importancia descrita en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, en este proyecto se plantea el análisis de los exones 22 y 23 del gen *BRCA1*, y los exones 11 y 27 del gen *BRCA2*. Regiones en las que se han descrito numerosas mutaciones puntuales (SNPs) en caninos. (<http://www.ensembl.org/index.html>).

1.11) Tratamiento y prevención.

El propietario debería ser asesorado con respecto a medidas preventivas como realizar la ovariectomía de su perra antes del primer estro, y controlar el peso (Ogilvie et al. 2008). Una vez presentes, los tumores de glándula mamaria son uno de los principales problemas del aparato reproductivo que nos llega actualmente a la consulta clínica representando cerca de la mitad de los casos oncológicos. Debido a su complejo desarrollo, que tiende a la progresión y malignización del tejido mamario a lo largo del tiempo, no quedan dudas que cuanto más rápido se proceda a su extracción quirúrgica, mayores son las posibilidades de supervivencia del paciente. La cirugía es el tratamiento de elección para la neoplasia mamaria localizada. El tipo de cirugía depende de la extensión de la enfermedad (Ogilvie et al. 2008; Lana et al. 2008). La mayoría de los tumores de mama logran la remisión completa con la cirugía como tratamiento único (Ruthane et al. 2007) (figura 6).

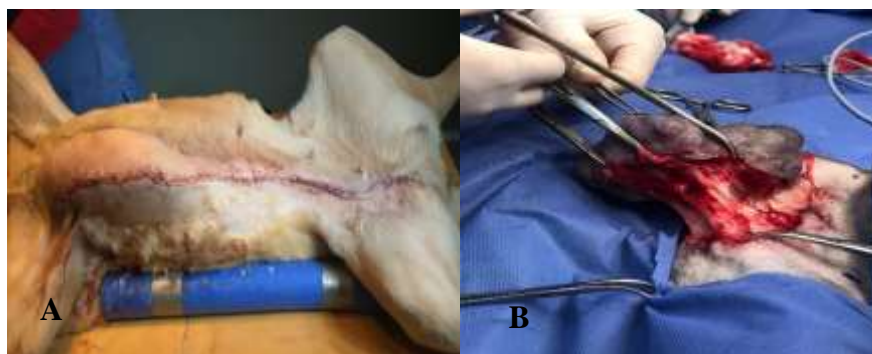


Figura 6. A) Mastectomía radical unilateral realizada en una perra de 6 años. B) mastectomía regional realizada a una perra de 12 años. Fotos cedidas por la Dra. Florencia Sollier. (Unidad de Cirugía de pequeños animales. Facultad de Veterinaria).

Las técnicas quirúrgicas empleadas, incluyen: mastectomía, mastectomía regional, mastectomía radical uni o bilaterales (Vail et al. 2020). Los pros y los contras de la escisión radical versus la local son ampliamente discutidos. La elección de la técnica adecuada

depende del tamaño del tumor, del número de mamas afectadas, la localización, fijación a los tejidos circundantes y el estado sanitario general del paciente. La remoción de los linfonodos regionales está indicada si el examen citológico de los mismos revela la presencia de células tumorales (Alisson et al. 2009). La elección del procedimiento quirúrgico más adecuado debe ser individualizada para cada paciente y estar determinada por el drenaje linfático del tumor, su grado de infiltración en los tejidos adyacentes, la probabilidad de lograr un control local de la enfermedad, así como la recuperación del paciente (Sorenmo et al. 2009; Borrego 2016). Una contraindicación importante de la cirugía son los carcinomas inflamatorios, ya que no es posible eliminar por completo el tumor y la recidiva puede ocurrir unos pocos días después de la cirugía (Ruthane et al. 2007). Como regla general debe haber suficiente tejido normal alrededor del tumor para eliminar digitaciones ocultas del cáncer, que puedan extenderse desde la lesión primaria. Todo el tejido resecado debería ser remitido a patología, con los bordes claramente delineados para facilitar la identificación (Ogilvie et al. 2008).

La ovariectomía desarrollada conjuntamente con la remoción del tumor mamario prolongaría el tiempo de supervivencia no solamente en perras con tumores benignos, sino también en malignos. En perras castradas con un período inferior a 2 años desde el momento de la ablación quirúrgica la supervivencia fue de un 45% más que si no se hubiera hecho. Por consiguiente, la castración de todas las hembras al tiempo de la remoción del tumor mamario debe ser considerada (Sorenmo et al. 2000).

Las perras con tumores mamaros malignos, y en presencia de factores pronósticos negativos, como por ejemplo enfermedad avanzada localmente o presencia de metástasis, o con un tipo histológico biológicamente agresivo, pueden beneficiarse de un tratamiento adyuvante como la quimioterapia o terapias antiangiogénicas (Borrego, 2016). Los fármacos más comúnmente utilizados son doxorubicina, carboplatino, mitoxantrona, 5-fluorouracilo y ciclofosfamida. Una respuesta parcial a la mitoxantrona, droga eficaz en el cáncer mamario humano, fue registrada en 1 de 6 perras tratadas (Hahn, 2001; Ogilvie et al. 2008). Inhibidores selectivos de COX-2 como el piroxicam, ha mostrado efecto frente a estos procesos y está indicado en los carcinomas inflamatorios (Ruthane et al. 2007).

La investigación del cáncer en las últimas dos décadas ha proporcionado un mejor entendimiento de las vías moleculares y los mecanismos de las metástasis y resistencias a fármacos. Se han diseñado tratamientos mucho más específicos/dirigidos y una de estas estrategias es lo que se conoce como quimioterapia metronómica. A diferencia de la quimioterapia convencional, la quimioterapia metronómica se caracteriza por la administración continua de fármacos a dosis que son mucho más bajas que la de los tratamientos convencionales. Una de las dianas de la quimioterapia metronómica es la vascularización tumoral (angiogénesis) y los linfocitos T reguladores (Tregs) que ayudan a las células tumorales a evadir el reconocimiento y destrucción por parte del sistema inmune en muchos tipos de cáncer en medicina humana y veterinaria (London et al. 2014). En veterinaria, algunos de los fármacos más utilizados son el fosfato de toceranib y la ciclofosfamida en combinación en muchos casos con antiinflamatorios no esteroideos (Borrego, 2016).

Con respecto a la radioterapia, puede emplearse como terapia adyuvante postquirúrgica, en el tratamiento de tumores inoperables o en metástasis óseas (Rutteman et al. 2000). Se puede realizar antes o después de la resección quirúrgica del tumor. Generalmente la radiación fracasa en el centro del tumor, donde existen grandes volúmenes de células muchas en condiciones de hipoxia, pero es efectiva en la periferia, donde las células están en cantidades reducidas y bien vascularizadas (McLeod et al. 1989).

Existe interés en investigar tratamientos adicionales para aumentar la eficacia de la quimioterapia y radioterapia, y tomar ventaja de las mutaciones observadas en el cáncer de mama en perros. Por tanto, el grupo de fármacos de los inhibidores de PARP poli(ADP)-ribosa polimerasa podría investigarse para el tratamiento de tumores mamarios en pacientes caninos. De estos fármacos, olaparib es un inhibidor de PARP, bloquea las proteínas (denominadas PARP) que ayudan a reparar el ADN dañado. Debido a que las mutaciones en *BRCA 2* pueden también dificultar la reparación del ADN, la inhibición ulterior de este proceso con olaparib puede causar la muerte de las células tumorales que portan una mutación en *BRCA*. Olaparib, rucaparib y niraparib, son compuestos que "atrapan" la proteína PARP1 en el ADN, evitando la liberación de PARP1 desde el sitio del daño. En consecuencia, obstaculizan el ciclo catalítico de PARP1; algunos son más potentes que otros (Thumser-Henner et al.2020).

En 2009, se inició en mujeres un ensayo clínico de fase I de olaparib, que incluyó a pacientes con tumores de ovario y de mama (entre otros tipos de tumores), con mutaciones de la línea germinal *BRCA1* o *BRCA2*. El sesenta y tres por ciento de los pacientes con mutaciones experimentaron un beneficio clínico, mostrando así el efecto clínico de la letalidad sintética usando PARPi (Fong et al. 2009). Desafortunadamente, hasta la fecha no se han realizado más investigaciones sobre el uso de PARPi en pacientes caninos. Antes de que estas terapias se administren en combinación con quimioterapia y radioterapia en clínicas de animales, se necesitan más investigaciones. Además, PARPi representa una adición no despreciable al ya alto costo del tratamiento del cáncer para los dueños de perros (Thumser-Henner et al.2020).

2) ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

2.1. Tumores mamarios caninos.

Las neoplasias mamarias caninas se presentan comúnmente como nódulos circunscritos con tamaño, consistencia y movilidad variables, para la piel y los músculos. También se pueden asociar con ulceración y reacciones inflamatorias locales. Se observan con frecuencia múltiples tumores en una única glándula mamaria, o pueden involucrar múltiples glándulas mamarias simultáneamente, y pueden ser de diferentes tipos histológicos (Kurzman et al. 1987). Es el tumor con el peor pronóstico el que siempre determinará la evolución clínica del paciente (Calvalcanti et al. 2006). Las glándulas mamarias inguinales y abdominales caudales se ven afectadas con mayor frecuencia que las glándulas torácicas, por tener mayor volumen de tejido mamario (Cassali et al. 2009) (figura 7).



Figura 7. Tumor de mamas abdominales caudales e inguinales. Foto de la autora.

El examen físico general comprueba si el tumor es móvil en el tejido mamario o infiltrativo, involucrando la piel adyacente, la fascia inferior o la pared abdominal, lo que implica un peor pronóstico. En casos de tumores más malignos puede existir eritema cutáneo, temperatura elevada, ulceración y edema. (Vail et al. 2020)

Se ha observado una progresión neoplásica continua desde las lesiones preneoplásicas hasta carcinomas plenamente invasivos como también se describe en el cáncer de mama en humanos (Sorenmo et al. 2009). Ello implica adenosis, adenosis esclerosante, papiloma intraductal, papiloma esclerosante, hiperplasia ductal, hiperplasia ductal atípica, y carcinoma ductal *in situ*. Los focos malignos también han sido hallados en tumores por lo demás benignos. (Von Euler, 2014)

2.2. Histopatología

La clasificación histológica de los tumores mamarios es la mejor herramienta para predecir el comportamiento biológico. Por este motivo, es esencial realizar un análisis

histopatológico de todos los tumores, independientemente de su tamaño, ya que este examen proporciona información adicional importante que puede ayudar al clínico a definir el pronóstico y el mejor plan de tratamiento. La calidad de la muestra se ve afectada por la falta de representación, la fijación inadecuada y la falta de información sobre la misma (Werner et al. 2009).

Para los procedimientos de corte de las muestras, las recomendaciones de Estrella et al. (2010) para tumores entre 3-5 cm y muestras mayores de 5 cm, se deben recolectar tres y cinco fragmentos de la masa tumoral respectivamente, y cada fragmento no debe medir más de 1.5x1.5x0.5 cm. Es imposible recortar la muestra de biopsia porque cada muestra es única. Se deben considerar el tamaño de la muestra, el área total del margen, el tipo de tumor y las posibles restricciones financieras. La sección transversal (método radial, "mitades y cuartos") es el método más utilizado para masas pequeñas o moderadas. El tumor se divide en dos a lo largo de su eje más corto. Posteriormente, cada mitad del tejido se biseca a través de su eje más largo, creando cuartos de sección que demuestran la masa en un plano diferente. Por otro lado, el corte paralelo a intervalos regulares (corte en serie) aumenta el porcentaje de tejido marginal examinado. Se deben tomar muestras de todas las glándulas mamarias de la cadena enviada, incluso si no contienen un tumor. Durante la escisión de los linfonodos debe medirse y, en caso de aumento de tamaño, cortarse en secciones longitudinales. La evaluación histopatológica con tinción con hematoxilina-eosina permite evaluar la metástasis contando el número de grupos de células (Estrella et al. 2010). Según las recomendaciones previas, las muestras deben fijarse en formaldehído y enviarse al laboratorio dentro de las 24 horas para su procesamiento. Cuando se realice la mastectomía parcial, cada glándula mamaria afectada, incluida la piel y el tejido subcutáneo, y los linfonodos regionales deberían recolectarse por separado y fijarse en formalina tamponada con fosfato neutro al 10%. Sin embargo, este procedimiento podría dificultar la evaluación de los márgenes de resección quirúrgica. Como alternativa, toda la cadena mamaria con linfonodos inguinales podría colocarse en un recipiente con formalina al 10%. Si la muestra quirúrgica es grande, algunos cortes en el lado cutáneo de la muestra podrían evitar una fijación inadecuada. El volumen de esta solución debe ser al menos 10 veces el tamaño del fragmento. Se recomienda que el tiempo de fijación no supere las 24-48 horas. Se debe etiquetar con el nombre del animal, el tejido y la ubicación de la lesión, y deben acompañarse de la solicitud del médico con información precisa sobre el historial médico del animal, incluida la descripción macroscópica del tumor (Ferreira et al. 2003).

Como método diagnóstico, el más seguro es el examen histopatológico de biopsias excisionales o incisionales. Además de facilitar la clasificación de la lesión, el examen histopatológico permite evaluar la infiltración de la piel, los tejidos blandos y los vasos sanguíneos circundantes. También se evalúan detalles sobre la histomorfología del tumor (presencia o ausencia de pleomorfismo, grado de diferenciación, índice mitótico, presencia o ausencia de necrosis) que contribuye a una escisión precisa (Ferreira et al. 2003).

Entre las razones para realizar la clasificación histopatológica de los tumores de mama, se encuentra el objetivo de evaluar la arquitectura de la neoplasia y las variaciones morfológicas del núcleo, el grado histológico, lo que presenta una correlación significativa con la agresividad del tumor (Elston y Ellis 1998).

En medicina humana, actualmente el sistema de clasificación más utilizado es el de Nottingham modificado por Elston y Ellis 1998, que ha reemplazado las evaluaciones subjetivas previas cuando el grado de diferenciación tumoral se estimó por la apariencia general del tumor. Según este sistema, la determinación del grado histológico se basa en: la evaluación del índice de formación de túbulos (un punto: más del 75% del tumor está compuesto por túbulos, dos puntos: entre 10% y 75% de formaciones tubulares, y tres puntos: los túbulos ocupan el 10% o menos del tumor); el pleomorfismo nuclear (un punto: núcleos pequeños y regulares; dos puntos: aumento moderado en el tamaño y la variación de los núcleos; tres puntos: pleomorfismo marcado, con gran variación en tamaño y forma de núcleos); y recuento mitótico (un punto: 0-8 mitosis, dos puntos: 9-16 mitosis y tres puntos: más de 17 mitosis en lente 40x). El grado histológico del tumor se obtiene a través de la suma de las puntuaciones, lo que da como resultado una cantidad total que oscila entre 3 y 9. El resumen de los grados del tumor es: 3-5 puntos: grado I; 6-7 puntos: grado II; 8-9 puntos: grado III. La anaplasia aumenta con un aumento de grado. El grado histológico se considera como un indicador pronóstico independiente para el tumor de mama primario en mujeres. El grado de malignidad se basa no solo en el tipo tumoral sino también en la presencia de importante pleomorfismo celular, índice mitótico, la presencia de áreas necróticas, invasión peritumoral, linfática y metástasis en linfonodos regionales (Elston y Ellis 1998; Goldschmidt et al. 2011; Cassali et al. 2013).

Los casos de carcinoma indiferenciado (grado III) tenían un riesgo de muerte 21 veces mayor en comparación con los casos de carcinoma diferenciado (grado I y II). También se asoció un mayor riesgo (aproximadamente 10 veces) con los carcinomas simples indiferenciados en comparación con los diferenciados. El valor predictivo del grado histológico no se vio influenciado por el tamaño del tumor o la edad del perro en el momento de la mastectomía (Karayannopoulou et al. 2005).

En lo que se refiere a caninos, recientemente, el número de investigadores veterinarios que han adoptado los criterios de clasificación histológica propuestos por Nottingham para evaluar los carcinomas de mama en perros ha aumentado. Según la literatura disponible, el uso de los criterios de estadificación clínica TNM y la evaluación de los factores pronósticos morfológicos clásicos (tamaño del tumor, recuento mitótico, grado y tipo histológico y afectación linfática), bien establecidos en humanos, son útiles para evaluar el pronóstico de las perras con carcinomas mamarios. Por lo tanto, los criterios de diagnóstico deben mejorarse y estandarizarse, y se necesita una inversión continua en el estudio de los marcadores pronósticos y predictivos para que estos factores sean empleados de manera rutinaria por los patólogos veterinarios y proporcionados a los médicos y cirujanos. El objetivo no es someter a los pacientes a tratamientos agresivos innecesarios o dejar de tratar a quienes se beneficiarían. Siempre se debe priorizar la calidad de vida del animal (Cassali et al. 2013).

2.3) Base genética.

Los genes asociados con el cáncer están mucho más relacionados entre perros y humanos que entre ratones y humanos. Recientemente, muchos estudios han destacado los factores de riesgo similares que están asociados con el cáncer de mama entre perros y humanos (Chiu et al. 2019).

En las últimas décadas, se han identificado similitudes clínicas y moleculares entre el HBC y los CMT. Las similitudes clínicas incluyen la incidencia espontánea de tumores, la edad de inicio, la etiología hormonal y el curso idéntico de la enfermedad (Owen, 1979). Además, los factores que afectan el resultado clínico, incluido el tamaño del tumor, el estadio clínico y la invasión de los linfonodos, son idénticos entre perros y humanos (Queiroga et al. 2011).

El HBC es el cáncer más común entre las mujeres y afecta hasta un tercio de las mujeres durante su vida (Mahdi et al. 2013).

En tumores de mama en mujeres, se han identificado múltiples alteraciones cromosómicas que involucran deleciones en los cromosomas 3p, 11p, 13q, 17p y también pérdida de heterocigosis en los cromosomas 1p, 1q, 17q y 18q entre otras, que en algunas ocasiones producen pérdida de los denominados genes supresores (Ramón y Cajal, 2000).

En lo que respecta a los genes en sí mismos, todos aquellos cuya activación/inactivación constitutiva lleve a un aumento de la proliferación celular, altere el control del ciclo celular, interfiera con la diferenciación celular o estén involucrados en la muerte celular programada o apoptosis son potencialmente oncogénicos. Además, hay que añadir todos aquellos cambios moleculares que se pueden heredar por línea germinal y predisponer a diversos tipos de tumores, y a los mecanismos de carcinogénesis como deficiencias en el control de reparación del ADN, que se pueden asociar con el desarrollo de tumores (Ramón y Cajal, 2000).

Los carcinomas mamarios caninos metastásicos se pueden diferenciar de los carcinomas no metastásicos por sus perfiles de expresión génica. Más de un tercio de los genes expresados diferencialmente también se describen como relevantes para el cáncer de mama humano. Muchos de los genes expresados diferencialmente están vinculados a funciones y vías que parecen ser relevantes para la inducción y el mantenimiento de la progresión metastásica y pueden representar nuevas dianas terapéuticas (Klopfleisch et al. 2010).

Diversos estudios demuestran que, en el desarrollo de tumores mamarios además de los factores hormonales existe una influencia de factores genéticos y una elevada predisposición racial a algunos tipos de tumores (Benavente et al. 2016).

El cáncer es una enfermedad compleja que involucra cambios genéticos y fenotípicos. Varios polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) se han asociado con el riesgo de desarrollo de cáncer de mama en mujeres, sin embargo, se sabe poco sobre su influencia en el riesgo de tumor mamario canino (Canadas et al. 2018).

Dada la alta homología entre la secuencia del genoma canino y su contraparte humana, el modelo canino ofrece un excelente recurso para explorar estrategias de prevención del cáncer de mama triple negativo en las mujeres (no contienen receptores de estrógeno, de progesterona ni producen exceso de la proteína HER2) particularmente portadoras de mutaciones *BRCA1/2* de alto riesgo (Somaia et al. 2019).

Los genes *BRCA*, genes supresores de tumores están involucrados en la síntesis de complejos multiproteicos que aseguran la transcripción y regulación de la síntesis de ADN, así como el reconocimiento y corrección de roturas de la cadena doble de ADN. Además, juegan un papel importante en el control del crecimiento celular y conservación de la integridad genómica (Varol et al. 2018). Las mutaciones de la línea germinal en los genes *BRCA* se han asociado con un riesgo relativamente alto (4 veces mayor) de desarrollo de tumores mamarios en ciertas razas de perros (Egenvall et al. 2005; Rivera et al. 2009). También se informó en perros una asociación entre la expresión de *BRCA1* o *BRCA2* mutado y *RAD51* recombinasa (*RAD51*), una proteína que repara el ADN que, cuando se regula al alza, se asocia con el desarrollo de tumores mamarios (Ochiat et al. 2001). En un estudio se reveló que la expresión de *BRCA1* se redujo en lesiones mamarias malignas de CMT. (Nieto et al. 2003).

BRCA1 y *BRCA2* son los genes más importantes asociados significativamente con los tumores mamarios. En un estudio se determinó la asociación entre las variaciones de estos dos genes y los tumores mamarios caninos. El intrón 8 y el exón 9 de *BRCA1* y los exones 12, 24, 27 de *BRCA2*, se secuenciaron para detectar las variaciones genéticas. Además de seis polimorfismos previamente identificados, se detectaron seis nuevos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). La comparación de las secuencias de 25 perras portadoras de tumor mamario y 10 perras libres de tumor, sugirió que los dos SNPs en el intrón 8 y el exón 9 de *BRCA1* y dos SNPs en el exón 24 y el exón 27 de *BRCA2*, que se identifican en primer lugar en este estudio, podrían estar asociados con el desarrollo de tumores mamarios en perras. Especialmente un SNP en el exón 9 de *BRCA1* y un SNP en el exón 24 de *BRCA2* se asociaron significativamente con tumores mamarios caninos (Enginler et al. 2011).

La mayoría de las mutaciones observadas en los genes *BRCA1* y *BRCA2* resultan truncamientos de proteínas, que representan pérdida de alteraciones funcionales. También se detectaron muchas variantes en las secuencias de estos genes, cuyos efectos aún no han sido identificados (Rivera et al. 2009).

Los avances en la investigación molecular, genética y clínica aumentaron notablemente nuestro conocimiento de la biología básica del cáncer. El cáncer se reconoce claramente como una enfermedad compleja, que implica cambios en la secuencia genética, epigenética y fenotípica. Investigación exhaustiva en genética molecular aplicada a la oncología, ha llevado a la identificación de perfiles genéticos asociados con características de las neoplasias en la clínica y patología en el comportamiento biológico de los tumores y con su respuesta al tratamiento (Canadas et al. 2018).

Hasta la fecha, solo unos pocos estudios han informado una asociación entre SNP y el riesgo de CMT. Algunos autores describieron frecuencias alélicas significativamente diferentes

para varios SNP al comparar razas de alto y bajo riesgo para tumores mamarios, subrayando la importancia de antecedentes genéticos en la susceptibilidad al tumor mamario desarrollado en perros (Borge et al. 2013).

Otros autores han asociado recientemente SNP en genes *BRCA1* y *BRCA2* con neoplasia mamaria desarrollada en perros (Rivera et al. 2009; Enginler et al. 2011). Además, una asociación entre SNP en el gen *ESR1* y el riesgo de tumores mamarios en Springer Spaniels también se ha descrito (Borge et al. 2013).

Existen reportes de variaciones significativas en la incidencia de tumores de mama en una misma raza. Un estudio realizado en Beagles, sugiere que además de factores de edad y hormonales, la susceptibilidad genética hereditaria también contribuye en el riesgo de desarrollo de tumores mamarios en caninos (Vail et al. 2020).

BRCA1 está involucrado en todas las fases del ciclo celular, y juega un rol importante en la coordinación de la progresión del ciclo celular, siendo esencial para que se conserve la integridad del genoma. Es por esto, que la pérdida de la función o mutaciones en *BRCA1* dan como resultado: crecimientos retrasados, aumentos de apoptosis, falta de reparaciones de daños en el ADN defectuoso, duplicación anormal del centrosoma, deficiencias en los sitios de regulación del ciclo celular (“checkpoints”) G2/M, deterioro en el control de los husos y daños en los cromosomas (Deng, 2006).

En cuanto al hallazgo de polimorfismos en *BRCA1* entre perras sanas y con tumores de mama, se encontró un polimorfismo de nucleótido simple (SNPs) dentro del intrón 23 (Gray et al. 2000) y Tsuchida et al. (2001) encontró microsatélites en el intrón 14.

Se han detectado mutaciones en los genes: *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN*, *ATM*, *TP53*, *CHEK2*, *PPM1D*, *CDH1*, *MLH1*, *MRE11*, *MSH2*, *MSH6*, *MUTYH*, *NBN*, *PMS1*, *PMS2*, *BRIP1*, *RAD50*, *RAD51C*, *STK11* y *BARD1*, muchas de ellas relacionadas al aumento de la expresión de determinados genes, lo que aumenta el riesgo de incidencia de cáncer de mama. (Mahdi et al. 2013).

Sun et al. (2015) en China detectaron tres nuevos SNP en *BRCA1* canino; un SNP está asociado estadísticamente con CMT. Dos SNP en las supuestas regiones promotoras y un SNP no sinónimo en el exón 23. En comparación con 16 muestras normales, las secuencias de 34 CMT sugirieron que un SNP se asoció con el desarrollo de CMT. Un mayor número de muestras podría ser útiles para fortalecer la evidencia, y se justifican más estudios de análisis funcional para investigar el mecanismo subyacente de esta asociación.

En caninos se realizó un estudio donde se analizaron mediante el método de secuenciación directa muestras de 15 tumores benignos, 15 malignos y 10 animales sanos, los resultados indicaron dos mutaciones puntuales cada una en la región codificante de *BRCA1* canino en una muestra de tumor mamario benigno y en una muestra de tumor mamario canino maligno. No se detectaron mutaciones en las muestras de tejido mamario canino normal. (Qiu et al. 2016).

Borge et al. (2011) identificaron 64 SNP en 11 genes, incluidos *BRCA1* en CMT. En su informe, encontraron un SNP en la región codificante de *BRCA1*, que era un SNP sinónimo que generalmente no altera la estructura de las proteínas. Sin embargo, algunos SNP sinónimos pueden alterar el plegamiento del ARN y, por lo tanto, puede tener un impacto en la traducción de proteína. En este estudio, se utilizaron perros con tumor mamario, y se utilizaron perros normales como control. En el tejido mamario normal, no hubo variaciones de nucleótidos, lo que indica que las variaciones genéticas pueden estar asociadas con tumores de mama.

El primer hallazgo de un marcador polimórfico para *BRCA2* canino fue realizado por Yoshikawa et al. (2005) a. En su estudio, encontraron un único polimorfismo de inserción / deleción (indels) en la señal de localización nuclear 2 (NLS2) del *BRCA2* canino, llamado 10204ins / del AAA. Su estudio sugiere además que la eficiencia de translocación de *BRCA2* puede estar asociada con la morbilidad del tumor mamario en los perros, porque la tasa de morbilidad en los perros fue mayor con la inserción de AAA que con la deleción de AAA.

Yoshikawa et al. (2005) b posteriormente en otro trabajo informó de otros polimorfismos en el gen *BRCA2*. Teniendo en cuenta las secuencias genómicas de las regiones del exón 27 de perros sin tumores y portadores de tumores mamarios, encontraron cuatro SNP nuevos.

En las perras también se ha sugerido que *BRCA2* tiene una relación con los tumores mamarios. Sin embargo, no se ha establecido un consenso sobre la secuencia que presenta mutaciones en este gen (Yoshikawa et al. 2012).

Otro grupo también investigaron variaciones del exón 11 de *BRCA2* en tumores mamarios malignos. El exón 11, tanto en humanos como en perros, es el exón más grande y codifica los dominios de repeticiones BRC, motivos cruciales para la interacción con RAD51. Identificaron múltiples variaciones entre tumores mamarios caninos. Estos SNP eran en su mayor parte mutaciones sin sentido que podrían provocar cambios estructurales en la proteína *BRCA2* y mutaciones silenciosas que no provocan alteración de aminoácidos (Hsu et al. 2010).

Al comparar secuencias de tumores mamarios y glándulas mamarias sanas, Enginler et al. (2014) mostraron la existencia de dos SNP en el exón 24 y el exón 27 de *BRCA2*, mostrando una asociación significativa del polimorfismo del exón 24 en los tumores mamarios caninos.

Ozmen et al. (2017) detectaron por primera vez 19 SNP del exón 11 de *BRCA2* en tumores mamarios caninos. En general, las variaciones genéticas de *BRCA2* canino comprendían SNP, inserciones y deleciones. Sin embargo, tanto los SNP codificantes como los no codificantes tienen quizás un papel en la tumorigénesis, afectando la función de la proteína o la transcripción.

Maues et al. (2018) también investigó el exón 11 del *BRCA2* canino, evaluando la frecuencia de los SNP en perras con tumores mamarios. En su estudio, el 97,9 % de las perras se vieron afectadas por uno a tres SNP en el exón 11 de *BRCA2*, lo que sugiere una correlación entre estos polimorfismos genéticos y la carcinogénesis.

Las células tumorales que presentan mutaciones en *BRCA1* generan una mayor dependencia con la enzima poli (ADP-ribosa) polimerasa, para reparar su ADN y permitirle la continuidad de su división. Se han desarrollado drogas antineoplásicas contra *BRCA1*, que inhiben la enzima PARP, resultando efectivas en mujeres que presentan tumor de ovario con mutaciones en *BRCA1*, durante la primera etapa del ensayo clínico (Audeh et al. 2010).

Debido a que los tumores deficientes en *BRCA2* presentan este tipo particular de defectos, se ha explotado terapéuticamente mediante el principio de letalidad sintética. La letalidad sintética implica que la deficiencia en la expresión de un gen deja la célula viable, pero la perturbación de dos genes simultáneamente da como resultado la pérdida de viabilidad. Por lo tanto, los pacientes que portan mutaciones de la línea germinal de *BRCA2* son sensibles a una clase de fármacos llamados inhibidores de PARP (proteína poli (ADP-ribosa)), porque tienen un tipo específico de defecto de reparación del ADN a través de la mutación *BRCA2*. El estado de mutación específico de estas células representa una diana diagnóstica y terapéutica que, por un lado, explica las consecuencias de la deficiencia de *BRCA2*, pero, por otro lado, puede utilizarse para atacar terapéuticamente las células tumorales. Los inhibidores de PARP han sido aprobados clínicamente para explotar este principio y ahora se incluyen en el tratamiento de los pacientes humanos, particularmente en los casos de tumores con mutación *BRCA2*. Se ha demostrado que el nivel de *BRCA2* se reduce en muestras de glándulas tumorales, lo que sugiere que la baja expresión de *BRCA2* está contribuyendo al desarrollo de tumores mamarios en perros. Además, variaciones específicas del gen *BRCA2* afectan la fuerza de unión de RAD51, dañan críticamente la unión de *BRCA2*-RAD51 y provocan una reparación defectuosa. En humanos, los datos preclínicos y clínicos revelaron una interacción de letalidad sintética entre las mutaciones de *BRCA2* y la inhibición de PARP. Los inhibidores de PARP se utilizan con éxito para aumentar la sensibilidad a la quimioterapia y la radioterapia, aunque también se asocian con numerosos efectos secundarios y resistencia adquirida. El tratamiento del cáncer de los pacientes caninos podría beneficiarse de una mayor quimioterapia y radiosensibilidad, ya que sus protocolos de terapia del cáncer generalmente incluyen solo dosis bajas de medicamentos o radiación. Las primeras investigaciones muestran la tolerabilidad de iniparib en perros. Los inhibidores de PARP también implican mayores costos de terapia y, en consecuencia, es menos probable que los dueños de mascotas los acepten. Las mutaciones en el gen *BRCA2* canino tienen el potencial de ser explotadas en terapia clínica mediante el uso de inhibidores de PARP. Sin embargo, se necesitan más investigaciones antes de introducir inhibidores de PARP en la práctica clínica veterinaria (Thumser-Henner et al.2020).

2.4) Perfiles de polimorfismo de un solo nucleótido.

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) son diferencias de un solo nucleótido entre dos moléculas de ADN.

Los SNP tienen solo dos alelos y aparecen aleatoriamente en todo el genoma, esto significa que hay potencialmente millones de loci en el genoma que pueden utilizarse para realizar perfiles. Se estima que los SNP se presentan en unos 15 millones de posiciones dentro del genoma en la que estos cambios de una sola base revelan diferencias entre individuos. (Klug et al. 2013).

2.5. Estudios poblacionales.

2.5.1. Frecuencias alélicas.

Se define a la frecuencia alélica como el cociente resultante de dividir el número de alelos iguales en una población por el número total de alelos para ese gen. Para una frecuencia dada, el error estándar disminuye a medida que aumenta el tamaño de la muestra, pero se acerca a cero asintóticamente a partir de los 30 individuos. Se puede considerar, por tanto, que un tamaño óptimo de muestra sería de 30 a 60 individuos (Martínez, 2001).

Si la proporción de genotipos para un locus no está en equilibrio en algunas poblaciones, puede sospecharse que ha habido una selección que afecte a dicho locus o la existencia de alelos nulos. Al contrario, si una población se desvía significativamente del equilibrio para un número independiente de loci puede deberse a que dentro de la población existen subdivisiones, o que existe migración o flujo de genes desde una fuente externa o se están produciendo apareamientos no aleatorios (Callen et al. 1993; Montenegro, 2012).

2.5.2. Heterocigosidad

Una medida de la variación genética es la cantidad de polimorfismos presentes en una población. Un locus se considera polimórfico cuando el alelo más común tiene una frecuencia del 0,95, y por lo tanto el menos frecuente una frecuencia del 0,05. Una mejor valoración de la variación genética es la heterocigosidad de la población medida como la frecuencia media de individuos heterocigotos por locus. (Lacadena, 1981).

La diferencia entre la heterocigosidad observada y la heterocigosidad esperada calculada a partir de las frecuencias alélicas bajo la presunción de equilibrio Hardy Weinberg puede usarse como método para detectar distorsiones en la estructura de una población. (Wellek, 2004; Montenegro, 2012).

2.5.3. Valores de F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} para toda la población.

La teoría de los índices de fijación o estadísticos F fue concebida inicialmente por Sewall Wright en los años 40 y 50. Dos de los parámetros mediante el cual Wright propone medir las desviaciones de frecuencias genotípicas en poblaciones subdivididas son el F_{IS} y el F_{ST} . El F_{IS} es la correlación entre dos alelos, relativa a la subpoblación. La magnitud del F_{IS} , viene dada por el valor absoluto del índice, siendo bajo si el valor está entre 0 y 0.05, medio si se encuentra entre 0.06 y 0.15, alto si se encuentra entre 0.16 y 0.25 y muy alto si es mayor a 0.25 (Hartl, 1988).

El parámetro F_{ST} es la correlación entre dos alelos tomando al azar uno de cada subpoblación, e indica el grado de diferenciación genética entre las subpoblaciones. A través de los estadísticos F se puede conocer la estructura poblacional tanto en situaciones en las que existan selección como en las que no, ya que los términos están definidos por las frecuencias alélicas y genotípicas de la población en un momento concreto. (Nei, 1987).

2.5.4. Equilibrio de Hardy-Weinberg.

Esta ley fue enunciada por Hardy y Weinberg (H&W) independientemente en 1908 y formula que, en una población grande bajo apareamiento aleatorio, sin selección, mutación o migración, las frecuencias alélicas y genotípicas permanecen constantes de generación en generación.

En un estudio sobre variación genética debe determinarse si hay desviaciones significativas del equilibrio (H&W) en los loci estudiados. Si la proporción de genotipos para un locus no está en equilibrio en algunas poblaciones, puede sospecharse que ha habido una selección que afecte a dicho locus o la existencia de alelos nulos. Al contrario, si una población se desvía significativamente del equilibrio para un número independiente de loci, puede deberse a que dentro de la población existen subdivisiones, o que existe migración o flujo de genes desde una fuente externa o se están produciendo apareamientos no aleatorios (Callen et al. 1993; Short et al.2007).

2.5.5. Análisis Factorial de Correspondencia

Intenta explicar una variable hipotética (factor), por medio de un modelo lineal en el que el factor (o varios factores) es función de un conjunto grande de variables observables. El objetivo del Análisis Factorial de Correspondencia es encontrar una estructura más simple reduciendo la dimensionalidad de las variables sin perder información. Para simplificar el análisis de los datos se reduce el número de variables a un pequeño número de índices o factores. Con este método las frecuencias alélicas de las poblaciones en todos los loci, se usan como variables y el cluster de cada población se representa gráficamente (Li et al. 2005).

2.5.6. Dendrogramas.

Un dendrograma es la representación gráfica del orden en el que se han ido realizando las agrupaciones y de las distancias entre pares de individuos. Es un diagrama que

muestra las distancias de atributos entre cada par de clases fusionadas de manera secuencial. Para evitar cruzar líneas, el diagrama se expone gráficamente de tal modo que los miembros de cada par de clases que se fusionan son elementos próximos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los tumores de mama son los más frecuentes en hembras caninas dentro de las consultas oncológicas. También se debe considerar que el perro es un buen modelo de lo que sucede en humanos entre otras cosas por compartir su ambiente. Es interesante considerar este último punto a la hora de realizar estudios comparativos entre ambas especies. Al día de hoy hay poca información de lo que ocurre en caninos a nivel molecular. El estudio planteado en este proyecto va a colaborar en la obtención de este conocimiento con el fin de lograr en un futuro, tener mayores elementos a la hora de enfrentarnos a estos casos clínicos.

El análisis de los genes *BRCA1* y *BRCA2* y su comparación entre perras con y sin tumores, permitirá ver las diferencias entre ambos grupos. Al ver estas diferencias, en un futuro se va a poder asesorar a los propietarios con respecto al pronóstico y al posible tratamiento con quimioterapia.

Consideramos muy importante realizar el análisis clínico, histopatológico y el estudio de las secuencias génicas mencionadas y llevar un registro del grupo problema y su evolución.

3) HIPÓTESIS

Hipótesis 1. La presentación clínica de los tumores de mama (tamaño, afectación de linfonodos regionales y presencia de metástasis), tiene una correlación con la estadificación histopatológica.

Hipótesis 2. Las perras que desarrollan tumores de mama presentan alteraciones del ADN en los exones 22 y 23 del gen *BRCA1* y del exón 11 y exón 27 del gen *BRCA2*.

Hipótesis 3. Existe relación entre las mutaciones estudiadas de los genes *BRCA1* y *BRCA2*: entre animales sanos y controles, según el estadio clínico y las diferentes razas.

OBJETIVOS

4.1. Objetivos generales.

4.1.1. Determinar la correlación entre la clínica y la clasificación histopatológica.

4.1.2. Determinar la existencia de polimorfismos genéticos en tumores de mama caninos.

4.2. Objetivos específicos.

4.2.1. Realizar la estadificación clínica (TNM) e histopatológica de todos los pacientes con tumores.

4.2.2. Estudiar la presencia de polimorfismos en los exones 22 y 23 del gen *BRCA1* y del exón 11 y 27 del gen *BRCA 2* en caninos con tumores de mama y en animales control.

4.2.3. Estudiar si existe relación entre los polimorfismos encontrados con: los animales con tumores de mama y animales control, según el estadio clínico y las diferentes razas.

5) ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

A los efectos de cumplir con los objetivos de este trabajo se realizaron las siguientes etapas experimentales:

Etapa 1. Selección de los grupos experimentales. Se seleccionaron perras control con edad de 6 a 12 años, de diversas razas con otras patologías que no fueran oncológicas para que los dos grupos fueran homogéneos. Se descartó cualquier patología oncológica mediante la revisión clínica, RX de tórax y ecografía de abdomen.

Etapa 2. Se seleccionaron las perras con tumores de mama con el mismo rango etario. Se realizó la estadificación clínica TNM y el estudio histopatológico de los tumores de mama luego de la cirugía.

Etapa 3. A ambos grupos de animales se les realizó un estudio genético para el análisis de polimorfismos en los genes *BRCA1* y *BRCA2*. Para esto se realizó la extracción de sangre para extracción de ADN y dichas muestras fueron enviadas a EEUU para su posterior genotipado.

Etapa 4. Luego de tener el resultado del genotipado por parte de GeneSeek ink. se realizó el análisis estadístico correspondiente.

6) MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de Tesis fue realizado en el Departamento de Clínicas y Hospital Veterinario de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética y Uso de Animales (CEUA) con el número 518.

6.1) Recursos materiales.

El Hospital de la Facultad de Veterinaria (UdelaR), cuenta con las instalaciones necesarias para la atención clínica y obtención de muestras. El Laboratorio de Análisis Clínicos cuenta con instrumental necesario para los estudios sanguíneos (CB 31 Oi Biotecnica Instruments S.p.A.).

La unidad de imagenología cuenta con un equipo de radiología digital (Carestream) y un ecógrafo fijo hospitalario TOSHIBA Nemio MX.

La histopatología se realizó en el Laboratorio regional Este (DILAVE MGAP), con un microscopio Olympus BX51 usando tinción de hematoxilina y eosina con un aumento de 40x y 10x.

La extracción de ADN para el estudio molecular se realizó en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Veterinaria (UdelaR), utilizando el kit Qiagen y se cuantificaron las muestras con el Nanodrop ND 1000.

Posteriormente fueron guardadas en freezer perteneciente al Hospital hasta que fueron enviadas a GeneSeek ink. en EEUU.

6.2) Criterios de selección de casos.

Los casos de CMT fueron elegidos atendiendo las características clínicas descritas previamente en la especie, fueron seleccionados animales que presentaban nódulos/tumores, en la región mamaria con características clínicas compatibles con tumores mamarios.

Se seleccionaron hembras con un rango de edad de 6 a 12 años, por ser la edad donde más se manifiesta esta patología con un examen clínico general aceptable y cuyos estudios pre quirúrgicos (bioquímica sanguínea, RX de tórax, análisis de orina) y la estadificación de la enfermedad permitiera la realización de una técnica quirúrgica adecuada (riesgo anestésico: ASA I o II).

No ingresaron a este estudio pacientes con estadios muy avanzados de la enfermedad, con mala condición corporal o con otras enfermedades crónicas concomitantes que pusieran en riesgo el hecho de someterlos a un acto quirúrgico (riesgo anestésico ASA III o superior).

Para los casos control fueron elegidas hembras con el mismo rango de edad sin patologías oncológicas que ingresaron al Hospital de la Facultad de Veterinaria por otros motivos.

Todos los pacientes ingresaron por medicina general donde se realizó el primer examen clínico, se indicó la rutina sanguínea, al igual que las perras sin tumores que tenían ecografía de abdomen y Rx de tórax que descartaba cualquier patología oncológica.

6.3. Diseño experimental

Primer grupo: perras con tumores mamarios.

Se trabajó con 32 hembras distribuidas de la siguiente forma: 6 eran cruzas, 6 Caniches, 3 Labradores, 3 Cimarrones, 2 Cockers, 2 Ovejeros Alemanes, 2 Bóxers, 1 Rottweiler, 1 Boyero de Berna, 2 Pitbulls, 1 Golden Retriever, 1 Dogo, 1 American Staffordshire terrier y 1 Chihuahua.

El criterio de selección de las perras fue que fueran mayores de 6 años, sin distinción de raza, que estuvieran con buen estado general y aptas para ser derivadas a cirugía.

Todas las perras presentaron una rutina de sangre dentro de los parámetros de referencia. Se seleccionaron perras enteras (no castradas). Once de ellas habían tenido partos.

Se realizó el examen clínico que incluyó datos de anamnesis completa: edad, raza, estado reproductivo, y características del tumor: localización, tamaño, evolución, si es único o

múltiple. Se registró ubicación de los tumores en la cadena mamaria, número, tamaño, consistencia, coloración, adherencias, presencia de dolor y ulceración (figura 8).



Figura 8. Tumor de mama ulcerado. Foto de la autora.

En cada paciente se realizó un minucioso examen físico incluyendo la inspección y palpación de cada mama de ambas cadenas de forma individual, y de los linfonodos regionales (axilares e inguinales).

La descripción de las mamas afectadas por los tumores se realizó utilizando la letra I para la cadena izquierda, letra D para la cadena derecha seguido del número de mama afectada siendo el 1 la más craneal a nivel axilar y el 5 la mama más caudal inguinal.

En el Anexo 1 se encuentra la ficha utilizada para recabar los datos de las perras con tumores.

Todos los animales estaban aptos para la cirugía menos una que se realizó la eutanasia el día de la consulta, ya que presentaba disnea severa por metástasis pulmonar. Fueron intervenidas quirúrgicamente 31 perras menos una que se extrajo la muestra del tumor luego de la eutanasia.

Ninguna de las perras presentaba metástasis en linfonodos, ni metástasis en órganos abdominales. Esto fue descartado por palpación de linfonodos satélites y ecografía de abdomen.

Dos perras presentaban metástasis pulmonar. Una de ellas fue la que se realizó la eutanasia y la otra fue derivada a cirugía porque estaba estable y consideramos que la cirugía era una opción de tratamiento.

Los tutores de las pacientes seleccionadas recibieron información explicando los objetivos del estudio, los riesgos y beneficios asociados, el diseño y las intervenciones requeridas, así como cualquier posible conflicto de interés del personal que participó en el estudio, debiendo dar el consentimiento firmado antes de cada cirugía.

Segundo grupo: casos control.

Se trabajó con 13 hembras caninas adultas de 6 a 12 años de edad, enteras (no castradas) que ingresaron a la consulta en el Hospital Veterinario de la Facultad de Veterinaria (UdelaR), con otras patologías que no fueron oncológicas.

8 perras eran cruza, 2 Border Collie, 1 Blood Haund, 1 Caniche y 1 Gran Danés.

Todos los animales fueron revisados por un médico veterinario mediante un examen objetivo general y particular para poder determinar su estado de salud. Una de las perras ingresó para consulta cardiológica, tres presentaban insuficiencia renal crónica y una presentaba litiasis vesical, dos pacientes presentaban epilepsia idiopática, tres consultaron por lesiones dermatológicas, una ingresó para gastroenterología y en los dos restantes, los tutores solicitaron un chequeo general (Anexo 3).

6.4) Estadificación de los pacientes.

El estadiado clínico es importante para determinar el pronóstico.

Los dos sitios más comunes de metástasis son los pulmones y linfonodos regionales.

La estadificación clínica, se realizó basándonos en TNM (tumor, nódulos, metástasis), según Ogilvie et al. (2008).

A cada perra se le realizó las 3 incidencias de radiografía torácica, hemograma completo, panel de bioquímica sérica, urianálisis y evaluación de linfonodos regionales mediante palpación, citología por aspiración con aguja fina si están agrandados. Todos los tumores fueron medidos con un calibre en cm. (figura 9).



Figura 9. Medición con calibre de un tumor de mama. Foto de la autora.

La paciente con metástasis fue tratada con quimioterapia (descripción se detalla más adelante).

También se realizó ecografía de abdomen, buscando metástasis y otras patologías concomitantes ya que estas pacientes son hembras enteras y un alto porcentaje cursa con mucómetras.

6.5) Muestras de sangre.

De cada perra se extrajo una muestra de 6 ml de sangre de la vena radial con catéter de teflón (Injex®) n° 18 a 21 G, dependiendo del tamaño del animal. La muestra se dividió en 2 tubos con EDTA, uno para el hemograma en el laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Veterinaria y el otro para el estudio genético que se realizó en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Veterinaria, y uno en tubo seco para la bioquímica sanguínea en el Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Veterinaria.

Las muestras de sangre de los animales fueron extraídas con consentimiento de los propietarios de los animales, por un médico veterinario clínico, siguiendo las condiciones de asepsia y de manejo correspondientes.

6.6) Muestras de tejido de las glándulas mamarias tumorales.

Las muestras fueron extraídas luego de la cirugía (mastectomía regional o mastectomía radical.) La técnica varió en cada individuo según la extensión de la enfermedad. (figura 10). Estas muestras fueron empleadas para la realización del estudio histopatológico.

Los tumores se clasificaron primero según su tamaño en 3 grupos: tumores que miden menos de 3 cm (T1) 3 a 5 centímetros (T2) y mayores de 5 cm. (T3). En los casos con múltiples nódulos, se consideró el de mayor tamaño durante los procedimientos de selección. Luego, dependiendo del tamaño del tumor, se eligieron aleatoriamente tres fragmentos, representativos de áreas tumorales intratumor y periféricas, y se extrajeron de cada tumor. Se excluyeron las áreas necróticas.

Las muestras se fijaron en formol bufferado al 10% se enviaron al laboratorio Laclivet donde se realizaron los cortes en secciones de 4 μ m y se colorearon con tinción de Hematoxilina – eosina. Luego se procedió a la inclusión en bloques de parafina según métodos rutinarios para su estudio histopatológico en el Departamento de Patología del Laboratorio Regional Este del DILAVE (MGAP), de Treinta y Tres donde fueron analizadas con la supervisión y apoyo del Dr. Fernando Dutra.



Figura 10. Tumor de mama luego de la extirpación quirúrgica a cargo de la Dra. Florencia Sollier (Unidad de Cirugía de Pequeños Animales, Facultad de Veterinaria).

6.7) Clasificación Histopatológica de los tumores de mama.

Los tumores fueron agrupados según la clasificación histopatológica de Goldschmidt et al. (2011).

6.8) Extracción de sangre para realizar la extracción de ADN.

A las 32 perras con tumores de mama, así como a las 13 perras sin tumor (grupo control), se les realizó la extracción de las muestras de sangre en tubo con EDTA y se conservaron a $-18\text{ G}^{\circ}\text{C}$, hasta su posterior procesamiento (extracción de ADN).

Dicha extracción se realizó en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Veterinaria (UdelaR), Para este procedimiento se utilizó el kit Qiagen.

Todas las muestras de ADN se cuantificaron luego utilizando el espectrofotómetro Nanodrop ND 1000, con espectro total (220-750nm) que mide concentraciones de ácidos nucleicos con $1\ \mu\text{l}$ de muestra. El software calcula automáticamente la concentración de los ácidos nucleicos (Anexo 6,7).

Las muestras fueron enviadas a GeneSeek, ink. en EEUU. con el fin de estudiar los genotipos de las mutaciones tanto en las perras con tumores y las perras control en el gen *BRCA1* y *BRCA2*. Se enviaron 25ng/ul por cada muestra en solución.

Se analizó el exón 22 y exón 23 del gen *BRCA1* y el exón 11 y exón 27 del gen *BRCA2*.

Se eligieron zonas donde vimos que ocurren mayor número de mutaciones según la plataforma Ensembl <http://www.ensembl.org/index.html>

Se analizaron 15 (SNPs, Indels) que se detallan a continuación.

6.9) Regiones de los genes *BRCA1* y *BRCA2* a estudiar.

A continuación, se muestra los 15 polimorfismos que se analizaron.

BRCA1

EXÓN 22

ATCTTCAGGGGCCTAGAAATCTGTTGCTATGGACCCTTTACCAACATGCCAC
AGGTAAGAGACTGGGAGAAGTGCAGAGTCCAGCAGCAGACTTTCCCTTACAT
GGTGGAGTGTTACAGGA **GAGA** CTGTCTTAAGAAGGTTCCCTCAGATTGGTGAG
GTGCTCTAGAGGTCATTCTGTTTCTCTACCATCTGCCAGACAAAACCACACCT
AAACATTACCCTATATCAAAAAACAGCCCTGTGCCCTTCTCAAGAGCTAGA
AGGCCATGAAAAGTTAGCTTCTAGGATGCTAGTGTTCTGTGCTCATGGGGTGG
AGCTGACTTACTACCCTTTGGTTTAAGAAAAGAGAGAAATAATCAG

EXÓN 23

ATTCTAGTTCA **AG** CCTCTCTGTGTTT **Y** GGAGCAAAGACGGAGACTCTCCTACT
TAGAAGTCTTGCA

BRCA2

EXÓN 11

GTTTATTGCATTCTTCTTCCATCAAAAAAACTGTTTACAGAATGACTCAGAA
AAACCAGCTTTGTCTTTAACCAGCTCTTTTGGGACAATTCTGAGAAAAGTTTCC
AGTAATGGAGCCAGTTCTCCT **R**ATAATAAAATAATATCTCAGGATCCTGATTA
TAAAGAAGCAAAAATTAATAAGAAAAAATTGGAGTCATTTATAACCACAGAA
ACTGATTGTCTGTCATCCCTGCAGGAAAAACATTGGGAAGATGATGCAAAAA
AAC **M**AAGAGTTTC **M**GATATAAAAGAAAAAGTCTTGCCTACAG **Y**AAGTCACCC
TCCTGTGCCACATTCAGAAGTGGAAGGTA **R**TGATATTCACTTTCAGTCTCCAG
AAAGCTTTTCATTTGACTGTGATAATACCAGTCTGTAACTCCTAGCTCTAGGG
ATTCTCCATCAAGCCTAGTTGTGATGTCTAGAGGAAAAGAATCATATAAAATA
TCAGAGAACTAAAATGTAAGAATCATGAAACTGGTTTTGAATTAACC **M**AAA
ATATTCCCATGGAAAAGAATCAAGACATACATGTTTTAAATGCAGATTCTAAA
AATGCTAAACTGTTGTCAACTGAAAAACAT **R**TAACAGTAGCATCATCTTCAGT
AAAGGTTCAAGTTCAACCAAAATGCAAATCTCACCACAATCCAAA





GCAAAAAGCTAAGAACTGTTTCAGTGACCTTGAGAATATCAATGAGGAACT
TCTGTAGAAGTAGATAGAAGTTTCTCCTCAAGCAAATACAATGATTCTGTCTC

AATGATTCAGATAGAAGATTGTAATGATAAAAATTAAATGAGAAAAATAAT
AAATGCCGGCTAATACTACAAAATAATATTGAAATGACTACTGACATTTTTGT
TGAAGAATATACTGAAAGTTACAGGAGAAATACAGAAAATGAAGGTAACCAA
TGTACTGACGCTGGTAGAAATACTTGTAACTCAGAATCTGATGGCAGTGATTC
AAGTAAAAATGATACAGTTTATATTCATGAAGAAGAAAATGGCTTGCCCTGTA
TTGATCAGCACACATAGATCTGAAATTATTTAGCCAGTTTATGAAGGAGGGG
AACACTCAAATTAAGAAGGTTTGTTCAGATTTAACCTGTTTGGGAAGTTATGAA
AGCTGAAGAAACATCTCATGTTACTATGTCAAATAAACAGCAGTTAACAGCTA
ATACGGGGCAAACATAAAAGATTTTGTACTTTTATTTATCCTTTCAGMCT
GCAAGCAGAAAAAATATAAGGGTCTCCARAGAGTCATTAATAAAGCTAGAA
GTCTCCTTAATCAAAAATGGACAGAAGAATAAATAACTTTTCAGATTCC
TTGAATTCTGAATTACTTCCTGGCATAGATATCAA

EXÓN 27

ATGTCTTCTCCCAATAATGAGATGAATTATCAGAGTCCTTTATCACTTTGTAAG
CCAAAAGAGAAGTCTGTCCCATACCTGGATCAACCCAAATGACTTCAAAGTC
TTATTGTAAAGAGGAGAAAGAGATGGATGACCCAAAAACCTGCAAAAAGAGA
AGAGCCTTGGACTTTTTGAGTAGAGTGCCTTTACCTCCATCTGTCAGTCCCATT
TGTACATTTGTTTCTCCAGCTGCACAGAAGGCATTTTCAGCCACCACGGARRTTG
CGGCACCAAATATGAAACACTGATGAAGAAAGAGTTGAATTCTCCACAGATG
ACTCCACGTAAATTTAATGACCTTTCCCTTTTGGAAAGTGATTCAATAGCAGA
CGAAGAACTCGCAATGATAAACACCCAAAGCCCTTTTGTGGGTTCAACAGGAG
AACATCAACTTGTGTCTGTCAGTACTCTACCAGGACTGCTCCCACGAGCTCA
AAAGATTATCTTGGACTGAAAAGGCATTCTACTGCACCCGGGGTTCAGAGGAC
CCGAGAGCCCCCAGGCCTGCACCAGGAAGCGGGAGCCCCGTGTACAGAACAC
AAGTGATCTGAAAAGGACATCTCTGAGACTGCAGAGGCAACAAACACAAAAA
TGACAATGAATTGGTGACTGACTCAACCTTTCCAATGTGTGGAAAACACAGCC
TCAACCTGTATGTCAAGATGT

Referencias: |

-  Mutación con desplazamiento. (frameshift mutation)
-  Mutación sin sentido (missense)
-  Mutación sinónima (synonymous)
-  Variante que altera la proteína (protein altering variant)

M: A/C

R: A/G

Y: C/T

6.10) Tratamiento de los pacientes.

Todas las perras en estudio (menos una paciente que se le realizó la eutanasia el día de la consulta), fueron sometidas a mastectomía. La técnica varió en cada individuo según la extensión de los tumores, siendo evaluado por el cirujano a cargo, según los requerimientos de cada paciente.

Una de las perras luego de la cirugía se le realizó un protocolo de quimioterapia por tener metástasis pulmonar (paciente N° 34) por presentarse estable. Se realizaron 4 dosis de doxorubicina cada 3 semanas a una dosis de 30 mg/m² intravenosa.

A las demás pacientes se les realizó un seguimiento clínico.

6.11) Seguimiento.

El seguimiento clínico se realizó cada 3 meses y consistió en un examen clínico completo, palpación de las mamas operadas para la detección temprana de recidivas, palpación del resto de las mamas y tejido intermamario para la detección temprana de nuevas neoplasias y radiografías de tórax (3 incidencias) cada 6 meses.

6.12) Análisis estadísticos.

La correlación entre la estadificación clínica y la clasificación histopatológica de los tumores se realizaron mediante el test de Pearson para medir la discrepancia entre una distribución observada y otra teórica, indicando en qué medida las diferencias existentes entre ambas, de haberlas, se deben al azar en el contraste de hipótesis.

Para evaluar el grado de asociación entre las variables se utilizó el Test de concordancia de Cohen (Kappa), Kappa no ponderado y Kappa ponderado.

Para los cálculos de estadísticos poblacionales de variabilidad y estructura genética como: frecuencias alélicas de los polimorfismos, equilibrio de Hardy-Weinberg, estadísticos F de Wright (F_{is}, F_{IT}, F_{ST}), índices de heterocigosidad; análisis Factorial de Correspondencia (AFC), se utilizó el programa GENETIX v4.05 de distribución libre (Belkhir & Borsa).

Para el análisis de agrupamiento entre los polimorfismos identificados (SNPs, INDELs) en función de las dos poblaciones (animales enfermos/animales sanos), estadio tumoral y razas de los animales, se utilizaron herramientas de aplicación en bioinformática como el análisis de conglomerados o clusters jerárquico (función Hclust del paquete Stats en código de programación R, de distribución libre).

Todos los programas estadísticos mencionados son de distribución libre.

7) RESULTADOS

7.1) Resultados en Tumores mamarios

La edad de presentación de los tumores mamarios en este trabajo vario entre 6 y 12 años con un promedio de 9 años, estando el 67% de las perras muestreadas por encima de la media. (figura 11)

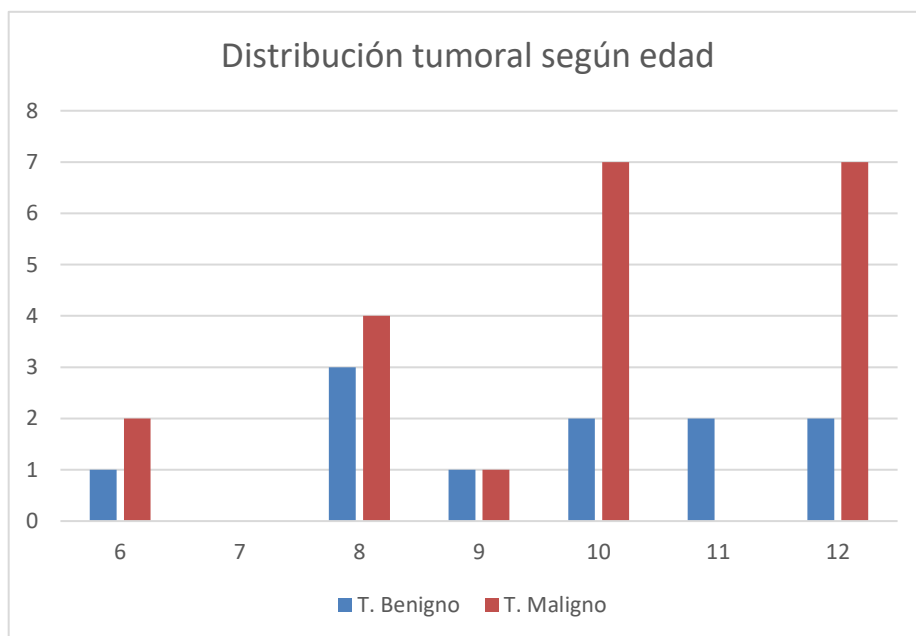


Figura 11. Edad de presentación de tumores de mama benignos y malignos. (6 a 12 años).

De las 32 perras estudiadas con tumores de mama el 65% (21) tuvieron diagnóstico de tumor maligno mientras que el 35% (11) fueron benignos (figura 12)

No hubo diferencia en la localización de los tumores entre ambas cadenas mamarias. El 51% se localizó en la cadena del lado derecho, mientras que el 49% se distribuyó en la cadena izquierda.

Las mamas que más tumores presentaron fueron las inguinales (11/32), seguido por los abdominales caudales (8/32), abdominales craneales (8/32), y torácicas caudales (4/32). En el caso de las mamas torácicas craneales se encontró un tumor único en un solo paciente.

La presentación de los tumores fue múltiple (20) 62% y únicos (12) 38%

De las perras con tumores múltiples 15 eran malignos y 4 benignos.

Dentro de los que se presentaron como únicos, 7 resultaron malignos y 5 benignos.

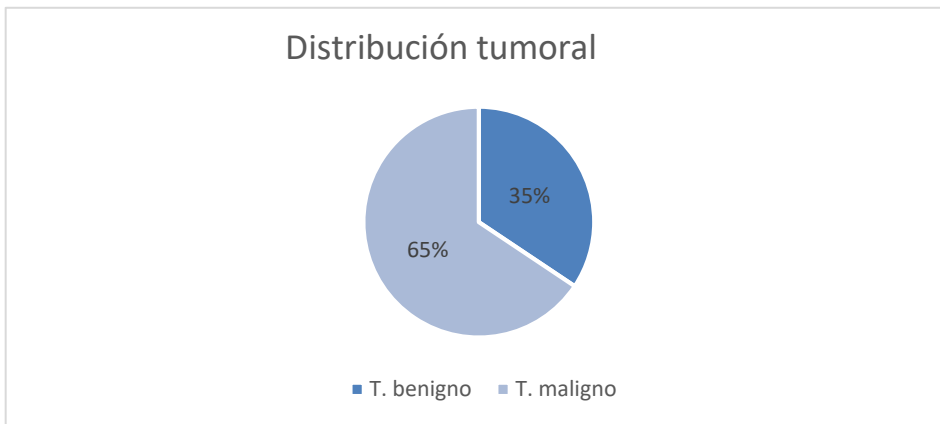


Figura 12. Distribución tumoral, benignos y malignos.

Con respecto a las razas tuvimos 6 cruza, 6 Caniches, 3 Cimarrones, 3 Labradores, 2 Cockers, 2 Ovejeros Alemanes, 2 Pitbulls, 2 Bóxers, 1 Rottweiler, 1 Boyero de Berna, 1 Golden retriever, 1 Chihuahua, 1 Dogo, y 1 American Staffordshire terrier. (figura 13).

Dentro de los controles las razas fueron: 8 cruza, 2 Border Collie, 1 Caniche, 1 Blood Haund, 1 Gran Danés.

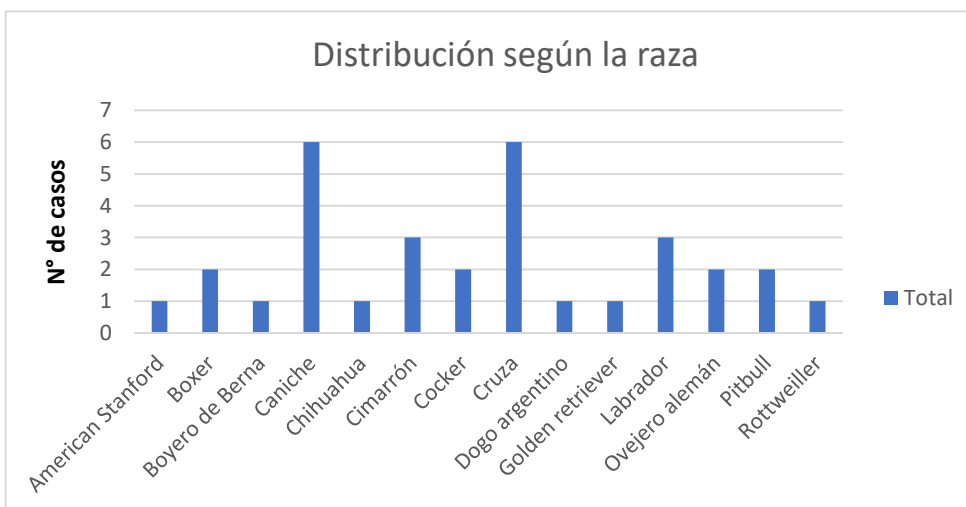


Figura 13. Distribución según razas.

Con los datos de la estadificación clínica se pudo observar que el 64% de las perras que presentaron tumores benignos presentaban un estadio I (1 a 3 cm) y 36 % presentaba estadio II. (3 a 5 cm) (figura 14).



Figura 14. Estadio de los tumores benignos encontrados en este estudio.

Dentro de las perras que obtuvieron un diagnóstico de tumores malignos, el 57% se encontraban en estadio III, el 9 % en estadio II y 24 % en estadio I. En el presente estudio no se obtuvieron animales que se encontraran en estadios IV (metástasis en linfonodos) y un 10% estaban en estadio V de la enfermedad. (metástasis en pulmón) (figura 15).

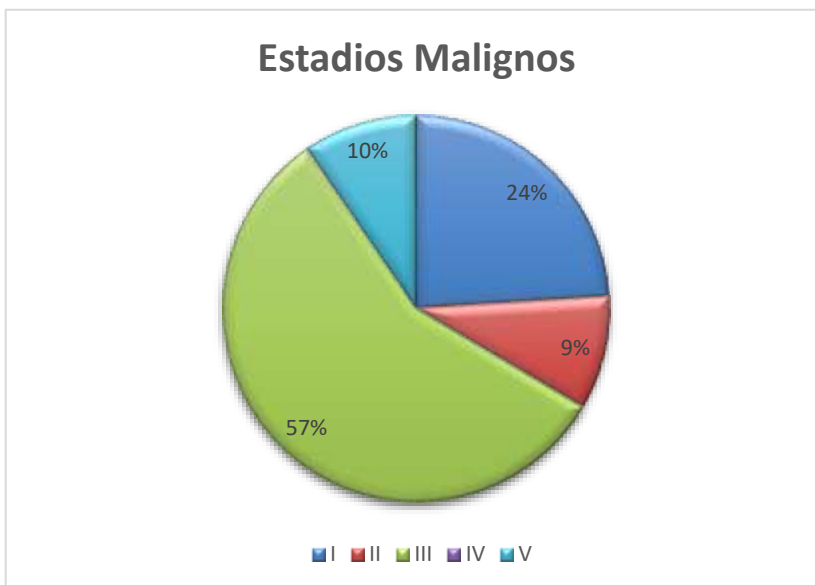


Figura 15. Estadios de los tumores malignos encontrados en este estudio.

7.2) Histopatología de los tumores mamarios.

Dentro de los tumores malignos, los más representados en este trabajo fueron el carcinoma tubular simple y el carcinoma complejo que se presentaron en igual frecuencia (4 cada uno), seguido por el carcinoma sólido y el túbulo papilar (2 cada uno) y luego el carcinoma simple, quístico papilar, comedocarcinoma, carcinoma anaplásico, carcinoma mixto, carcinoma intraductal papilar, mioepitelioma maligno, carcinoma rico en lípidos y carcinoma inflamatorio con una frecuencia de un tipo por cada paciente.(figuras 16,17,18,19,20) (Anexo 2)

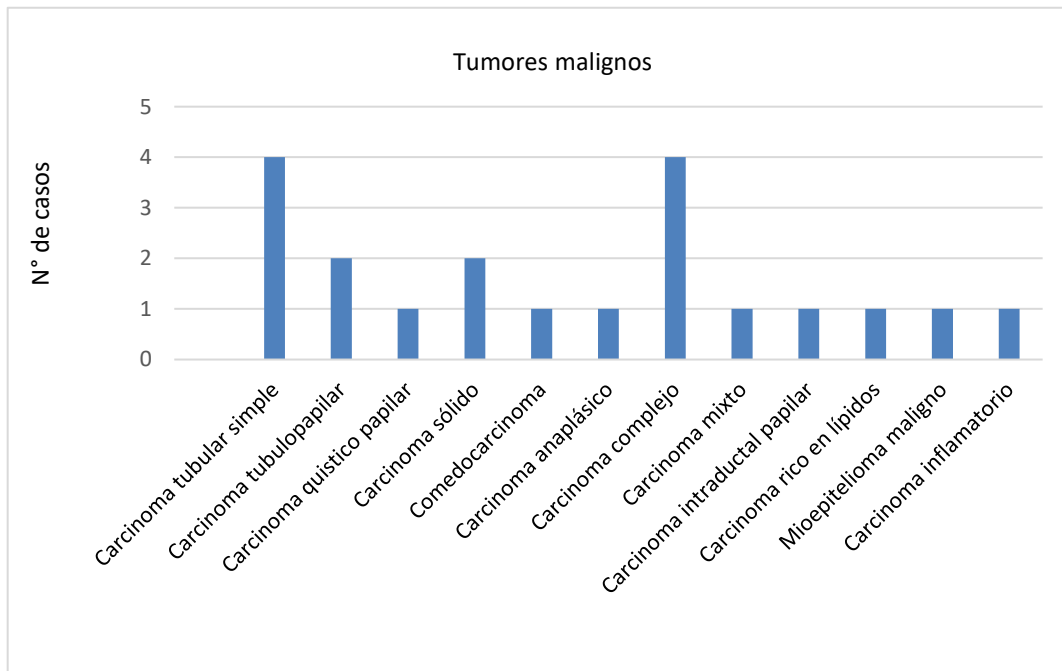


Figura 16. Tipos de tumores malignos registrados por histopatología en este estudio.

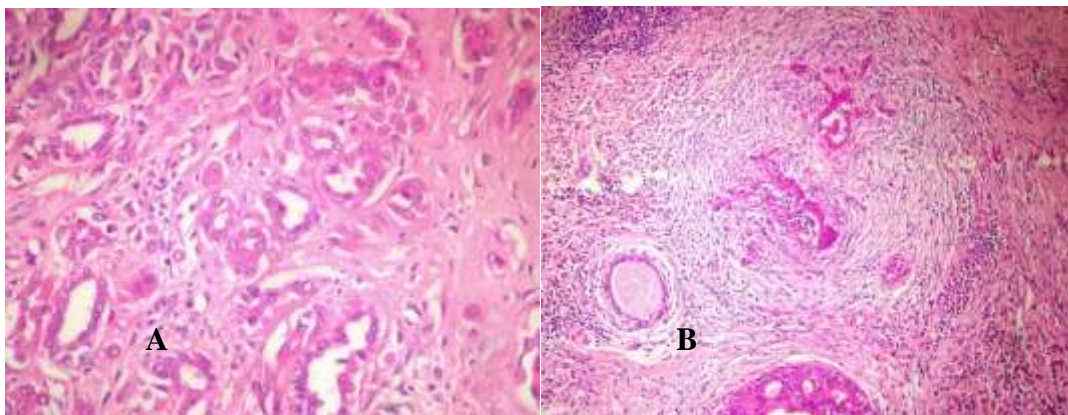


Figura 17. A) Paciente N° 5. Muestra histopatología de un carcinoma tubular simple tinción con hematoxilina y eosina 10x. B) Paciente N° 6. Muestra histopatológica de un carcinoma complejo, tinción con hematoxilina y eosina 10x. Fotos cedidas por el Dr. Fernando Dutra.

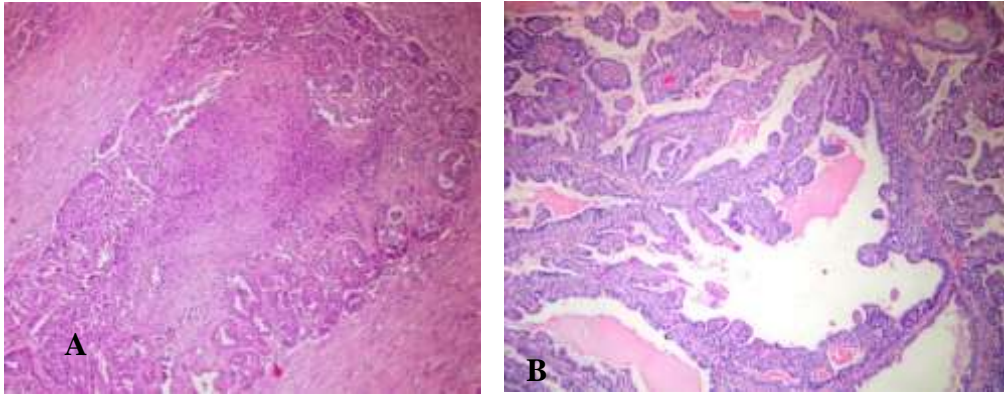


Figura 18. A) Paciente N° 2. Comedocarcinoma 40x. B) paciente N° 16. carcinoma túbulo papilar. Tinción con hematoxilina eosina 10x. Fotos cedidas por el Dr. Fernando Dutra.

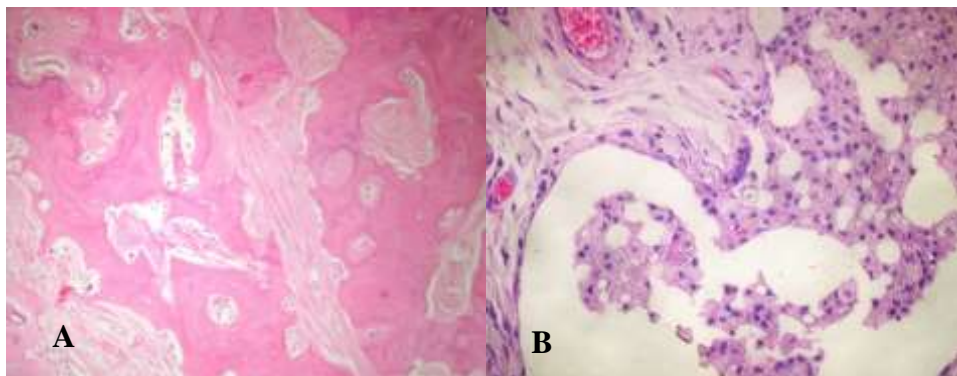


Figura 19. A) Paciente N° 3. Histopatología de un carcinoma mixto 40x. B) Paciente N° 32. carcinoma rico en lípidos. Tinción hematoxilina y eosina 10x. Fotos cedidas por el Dr. Fernando Dutra.

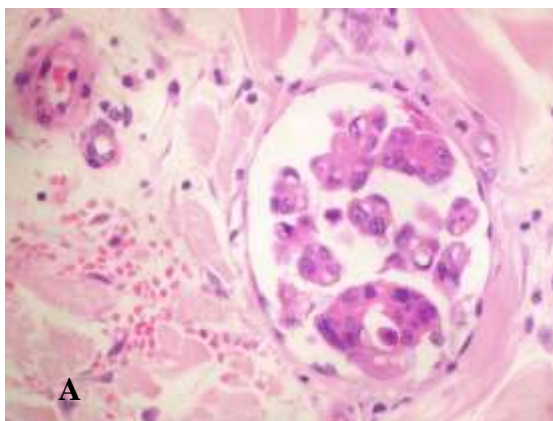


Figura 20. Paciente N° 1. A) Histopatología de émbolos linfáticos localizados en la dermis en un carcinoma inflamatorio. Tinción hematoxilina y eosina 40x. Foto cedida por el Dr. Fernando Dutra.

Siguiendo la clasificación de Goldschmidt et al. (2011), de los 21 tumores malignos, los epiteliales malignos representaron el 85,7% (18/21), mientras que los del tipo especiales representaron el 14,3% (3/21) del total de malignos.

Dentro de los tumores malignos grado I histopatológico tuvimos una sola perra con un carcinoma intraductal papilar.

Los grados II histopatológicos fueron siete perras que en orden de frecuencia fueron el carcinoma túbulo papilar, carcinoma complejo, carcinoma mixto, carcinoma tubular simple y carcinoma rico en lípidos.

Con respecto a los grados III histopatológicos tuvimos 13 perras que en orden de frecuencia fueron el carcinoma tubular simple, carcinoma complejo, carcinoma sólido, carcinoma inflamatorio, carcinoma anaplásico, mioepitelioma maligno y carcinoma quístico papilar (Anexo 2). Cuatro de estas perras con tumores malignos estaban ulcerados. (Anexo 4,5).

Ninguno de los tumores estaba adherido a planos profundos.

Dentro de los tumores benignos se destacó con mayor frecuencia el adenoma complejo (8 pacientes) seguido por el tumor benigno mixto (2 pacientes) y el papiloma ductal simple. (1 paciente). (figuras 21,22) (Anexo 2).

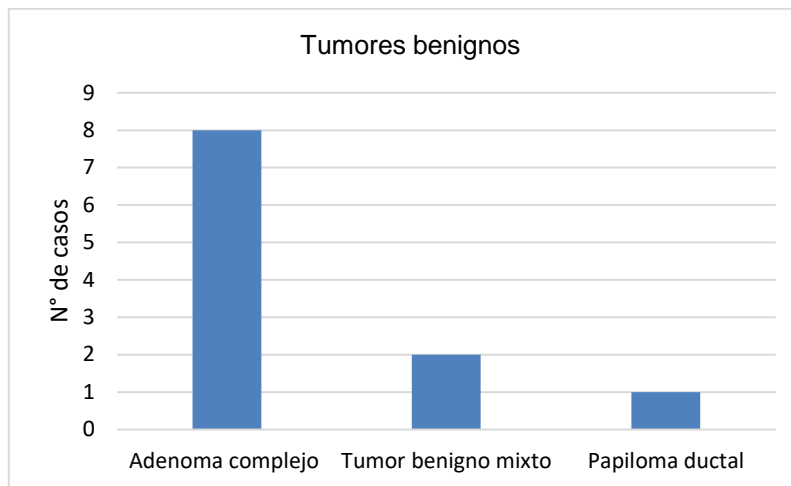


Figura 21. Tipos de tumores benignos registrados por histopatología en este estudio.

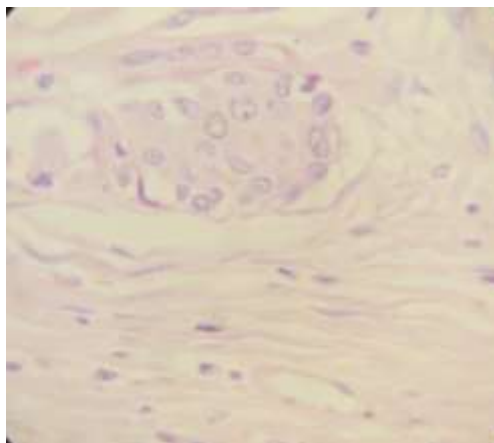


Figura 22. Adenoma complejo. Paciente N° 31. Foto de la autora

7.3) Análisis de concordancia entre métodos de diagnóstico: Histopatológico vs Clínico (tabla 1).

		Histopatología			
		0	1	2	3
Clínica	0	0	0	0	0
	1	7	0	2	3
	2	4	0	2	0
	3	0	1	3	10

Tabla 1. En la siguiente tabla se detalla el número de tumores clasificados en cada estadio según los dos métodos de diagnóstico simultáneamente (clínico e histopatológico)

Se utilizó el 0 para los tumores benignos.

La proporción de acuerdo (exactitud) es $12/32 = 37.5\%$ lo que nos indica una baja asociación lineal, por lo cual la correlación entre diagnósticos es baja.

7.4) Análisis de correlación entre métodos

El análisis estadístico realizado fue el test de chi cuadrado de Pearson, con el cual se busca determinar cuán asociadas se encuentran dos variables entre sí y estudia si los cambios que puedan suceder en una de ellas puede afectar a la otra. De esta manera, intenta medir la intensidad con la que dos variables pueden estar asociadas. Si el valor de r se encuentra entre 0 y 1 ($0 < r < 1$) la correlación que se presenta es positiva, pero el grado de asociación entre las dos variables es menor cuando más cerca de cero se encuentre, en contraparte, mientras más se acerca a 1 el grado de asociación será mayor. El coeficiente de correlación de Pearson solo cuantifica la asociación lineal entre dos variables, pero no el grado de acuerdo entre ellas, indica la proximidad que hay entre los puntos de la nube.

Se pueden obtener 2 resultados:

1. Correlación fuerte: La correlación será fuerte cuanto más cerca estén los puntos de la recta,
2. Correlación débil: La correlación será débil cuanto más separados estén los puntos de la recta.

Al obtener una baja correlación se realizó:

El estadístico de chi-cuadrado de Pearson (χ^2) se basa en la diferencia al cuadrado entre las frecuencias observadas y las esperadas.

El coeficiente de correlación de Pearson con intervalo de confianza 95% es $r = 0.55[0.24, 0.75]$. La asociación lineal es débil pero significativa ($t = 3.5822$, $gl = 30$, $p = 0.001$). (figura23)

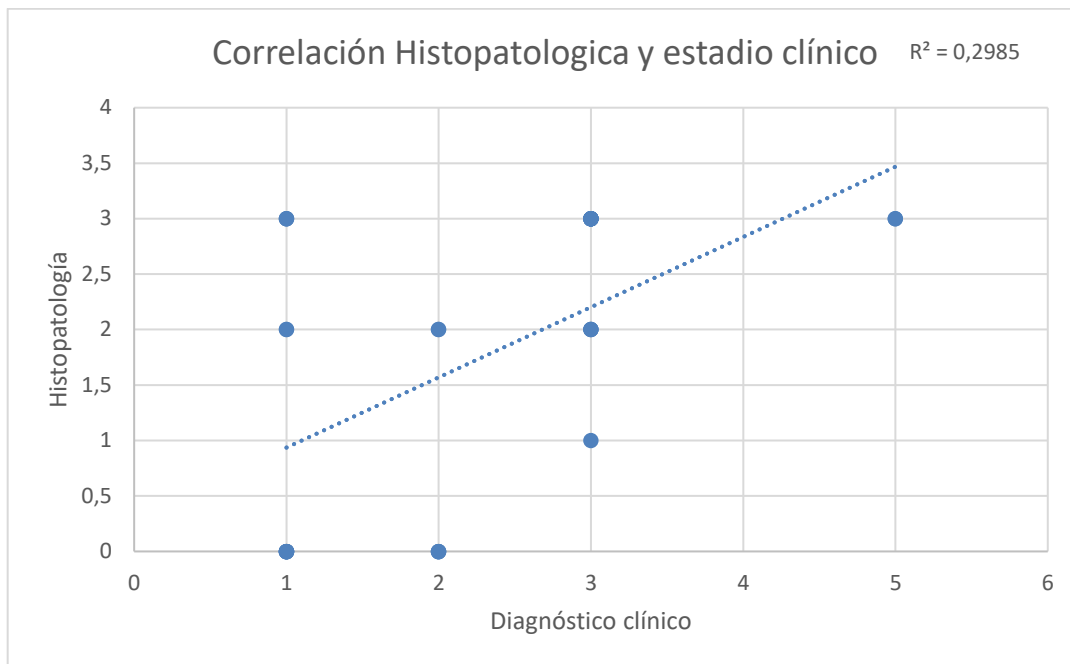


Figura 23. Diagrama de puntos y correlación lineal. Correlación histopatológica y estadio clínico.

Dada esta baja asociación lineal entre las dos variables (clínica e histopatológica) se utilizó el test de concordancia Kappa de Cohen y Kappa ponderado. Tabla 2.

Concordancia - Índice Kappa (depende del acuerdo observado y de la simetría de los totales marginales).

El índice kappa (κ) se usa para evaluar la concordancia o reproducibilidad de un instrumento de medida cuyo resultado es categórico (2 o más categorías).

El índice kappa (κ) representa la proporción de acuerdos observados más allá del azar.

En la interpretación del índice kappa (κ) hay que tener en cuenta que el índice depende del acuerdo observado, pero también de la prevalencia del carácter estudiado y de la simetría de los totales marginales.

El índice Kappa se mide de 0 a 1 donde 0 es sin acuerdo y 1 sería casi perfecto. (tabla 2).

	Límite inferior	Estimado	Límite superior
Kappa no ponderado	0,036	0,19	0,34
Kappa ponderado	0,155	0,48	0,81

Tabla 2. Kappa no ponderado y Kappa ponderado.

N = 32

Entonces, la estimación para el índice Kappa ponderado de Cohen, con intervalo de confianza 95%, es: $k = 0.48[0.16 - 0.81]$. La concordancia es moderada.

7.5. Resultados del estudio genético. Análisis poblacional

Frecuencias alélicas

Las muestras estudiadas se enviaron a GeneSeek, Lincoln-Nebraska, EEUU, con el fin de ser genotipadas para 15 marcadores diferentes (SNPs o indels). Esto se realizó en el grupo de perras con tumores, así como también en el grupo de perras control (sin patología tumoral). En el anexo 9 se muestran los resultados del genotipado obtenidos. Con estos datos se trabajó con el programa Genetix, de distribución libre (<https://kimura.univ-montp2.fr/genetix/>). De estos análisis surge que de los 15 loci estudiados, seis fueron polimórficos, todos de tipo SNPs, los otros nueve fueron monomórficos (no presentarían variación). Los loci polimórficos fueron: EXON 11 A>C, EXON 11 A>G, EXON 11 A>C3, EXON 11 A>G1, EXON 11 A>G3 y EXON 23 C>T. Se puede ver que los loci polimórficos son los mismos en las dos poblaciones (tabla 3). Por lo tanto, se encontraron 5 SNP en el exón 11 del gen BRCA2 y un SNP en el exón 23 del gen BRCA1 tanto en las perras con tumores como en las perras control. Esto equivale a un 40% de los SNP estudiados.

Estadística descriptiva de los polimorfismos observados mediante 15 loci de marcadores (SNPs, Indels) usados para caracterizar genotípicamente las dos poblaciones: caninos con tumores (E) / caninos control (S).

SNP	ALELO	Pob. E	Pob. S
EXON 11 A>C	C	0.0469	0.0769
	A	0.9531	0.9231
EXON 11 A>G	A	0.6094	0.6154
	G	0.3906	0.3846
EXON 11 A>indel	A	1.0000	1.0000
	-	00000	00000
EXON 11 A>C1	A	1.0000	1.0000
	C1	00000	00000
EXON 11 A>C2	A	1.0000	1.0000
	C2	00000	00000
EXON 11 A>C3	C3	0.2813	0.1923
	A	0.7188	0.8077
EXON 11 A>G1	A	0.9688	0.8846
	G1	0.0313	0.1154
EXON 11 A>G2	G2	1.0000	1.0000
	A	00000	00000
EXON 11 A>G3	A	0.9688	0.8846
	G3	0.0313	0.1154
EXON 11 C>T	T	1.0000	1.0000
	C	00000	00000
EXON 22	GAGA	1.0000	1.0000
GAGA>indel	-	00000	00000
EXON 23 AG>indel	AG	1.0000	1.0000
	-	00000	00000
EXON 23 C>T	C	0.0313	0.0769

	T	0.9688	0.9231
EXON 27 A>G	G	1.0000	1.0000
	A	00000	00000
EXON 27 TG>indel	TG	1.0000	1.0000
	-	00000	00000

Tabla 3. Frecuencias alélicas. Se presentan las frecuencias alélicas observadas.

Las letras A, G, C, T corresponden a los nucleótidos adenina, guanina, citosina, timina. Con números 1, 2 y 3 que se observan en estas letras indican correlativamente diferentes polimorfismos en el mismo exón. En color violeta están marcados los loci polimórficos o sea 6 de los 15 SNPs mencionados. Los otros colores se utilizaron para separar cada uno de los exones amplificados. Observamos baja variabilidad alélica, pese a lo cual, a nivel poblacional el grupo de tumores tiene mayor variabilidad que el grupo control.

7.6. Prueba de chi cuadrado para Equilibrio de Hardy Weinberg (H&W)

Con el objetivo de conocer si los loci en estudio se encontraban en equilibrio H&W o no, se realizó chi cuadrado a cada uno de ellos en ambas poblaciones. En la tabla 4 se presentan los resultados correspondientes. Respecto de los loci monomórficos, todos ellos estaban en desequilibrio, todos ellos con valores de chi cuadrado mayores de 10.83 o sea $p \geq 0.001$. Dos de los loci que presentaron polimorfismo están en desequilibrio, se muestran coloreados en la tabla 4.

LOCI	con/t		sin/t	
	χ^2	P	χ^2	P
EXON 11 A>C	0.08	≥ 0.70	0.09	≥ 0.70
EXON 11 A>G	0.69	≥ 0.30	0.01	≥ 0.90
EXON 11 A>C3	0.22	≥ 0.50	0.75	≥ 0.30
EXON 11 A>G1	0.04	≥ 0.80	4.94	MENOR 0.01
EXON 11 A>G3	0.04	≥ 0.80	4.94	MENOR 0.01
EXON 23 C>T	0.04	≥ 0.80	0.09	≥ 0.70

Tabla 4. Valores de χ^2 obtenidos para los loci en los que se observaron polimorfismos. En color rojo se muestran los dos que no presentaron equilibrio H&W.

7.7. Heterocigosidad esperada y observada según las dos poblaciones.

Población Perros tumor (E)

Población perros Controles (S) (Tabla 5)

HETEROZYGOTIE MOY. SUR LES LOCUS						

	Hexp.	H n.b.	Hobs.	P(0.95)	P(0.99)	Nbre Moyen d'allèles/locus

perrostumo	0.0768	0.0780	0.0750	0.1333	0.4000	1.4000
Ecart-type :	0.1514	0.1538	0.1446			
controles	0.0984	0.1024	0.0872	0.4000	0.4000	1.4000
Ecart-type :	0.1461	0.1520	0.1479			

Tabla 5. Heterocigosidad esperada y observada. Se muestran los resultados obtenidos para cada población, con los loci estudiados.

7.8. Valores de F_{IS} , F_{IT} Y F_{ST}

Otros cálculos que resultaron de interés son los índices F de Wright. Se calcularon F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} . Respecto de ellos, el valor F_{ST} va entre 0 y 1 donde 0 es cuando no hay subdivisión en la población analizada. Si el valor fuera positivo o en el extremo, o sea 1, tendríamos subdivisión extrema entre las dos poblaciones (con y sin tumores). En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos, viéndose que no hay una subdivisión entre los animales estudiados. Esto era de esperar ya viendo los resultados de los genotipados obtenidos (Anexo 8)

Calcul des paramètres F selon la méthode de Weir & Cockerham 1984
 Pour la signification des paramètres consultez l'aide !

FICHER TRAITE : D:\Genetix Todo\perrostotalesEyC.gtx
 Nombre de locus : 15

```

N°      Nom de la population
-----
1 -> perrostumores      32
2 -> controles          13
*****
*          ESTIMATIONS  MULTILOCUS (les details sont en fin de fichier) *
*****
Weir & Cockerham      FIS=  0.07681  FIT=  0.06800  FST= -0.00954
Robertson & Hill      RH =  0.00062
Corrigé Raufaste      RH'=  0.00062
    
```

Tabla 6. Valores de F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} obtenidos.

7.9. Valores de F_{IS} por población.

Los valores de F_{IS} van entre -1 y 1. Los valores negativos indican exceso de heterocigotas, respecto al equilibrio Hardy Weinberg, y los positivos, deficiencia de heterocigotas. los valores de F_{IS} son positivos, indicando déficit de heterocigotas o exceso de homocigotas, lo que nuevamente condice con los resultados de genotipado obtenidos, donde se ve que únicamente 6 de los 15 marcadores estudiados presentaron polimorfismo. (Tabla 7).

Population	Réel	(IC 95%)
perrostumo	0.03876	(-0.16096 - 0.23726)
controles	0.15353	(-0.27536 - 0.48718)

Tabla 7. Valores de F_{IS} por población.

7.10. Análisis factorial de correspondencia

Se realizó el análisis factorial de correspondencia con los seis marcadores que presentaron polimorfismo en ambas poblaciones (con y sin tumores). Los puntos representan animales de las poblaciones analizadas (amarillos=enfermos, azul=controles. En la gráfica se muestran los ejes uno (24.72%) y dos (16.01%) resultantes del análisis. Para construir el gráfico se utilizó el programa GENETIX V 4.05 (Belkhir, 2004). (figura 24).

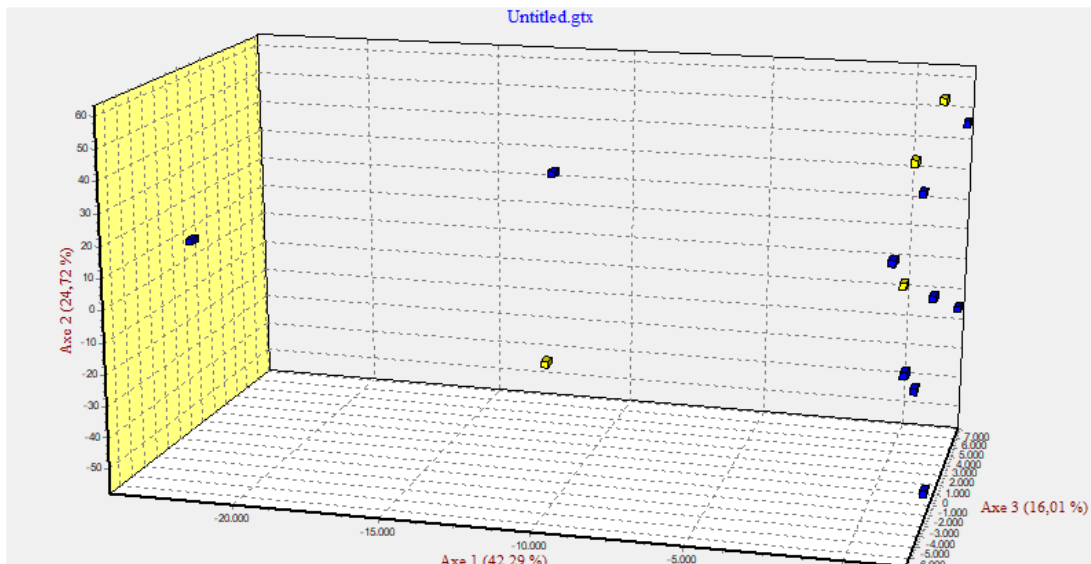


Figura 24. Representación gráfica tridimensional del análisis factorial de correspondencia. En esta imagen, nuevamente se puede ver como los individuos de ambas poblaciones estudiadas están mezclados, no se encuentra subdivisión entre ellos.

7.11. Dendrograma.

Para realizar los dendrogramas se codificó la matriz de genotipos a 0, 1 y 2, luego con la función `dist` en R se estimó la distancia a la cual se utilizan para realizar el cluster con la función `clust` del paquete “stats” en R para luego plotearlo.

Se realizó una regresión lineal entre cada marcador con las características como animales enfermos y control, estadio y raza. Los datos no fueron significativos. (figuras 25, 26, 27) (Anexo 9).

En las siguientes imágenes se presentan los dendrogramas obtenidos ingresando los datos considerando:

- Casos con tumores/sin tumores.
- Estadio clínico.
- Raza.

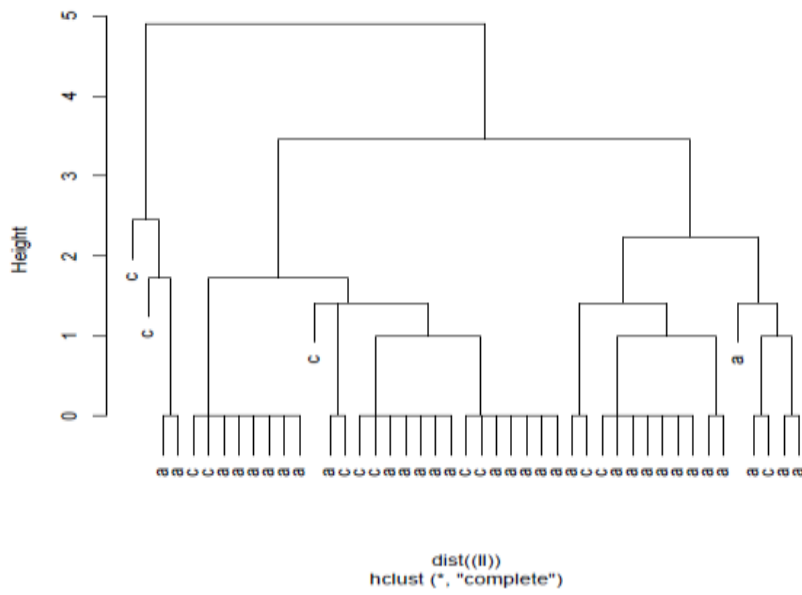


Figura 25. Dendrograma donde se observa con la letra a los animales enfermos y la c los animales control. Se visualiza que no hubo agrupamientos definidos ya que las a y las c quedaron mezcladas.

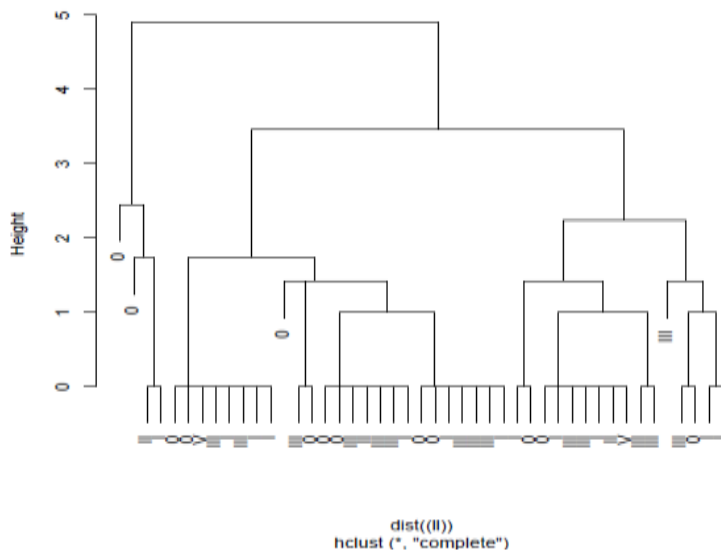


Figura 26. Los animales fueron ingresados según el estadio clínico. No se observan diferencias significativas.

El 0 está representado por los tumores benignos y luego la clasificación va del I al V.

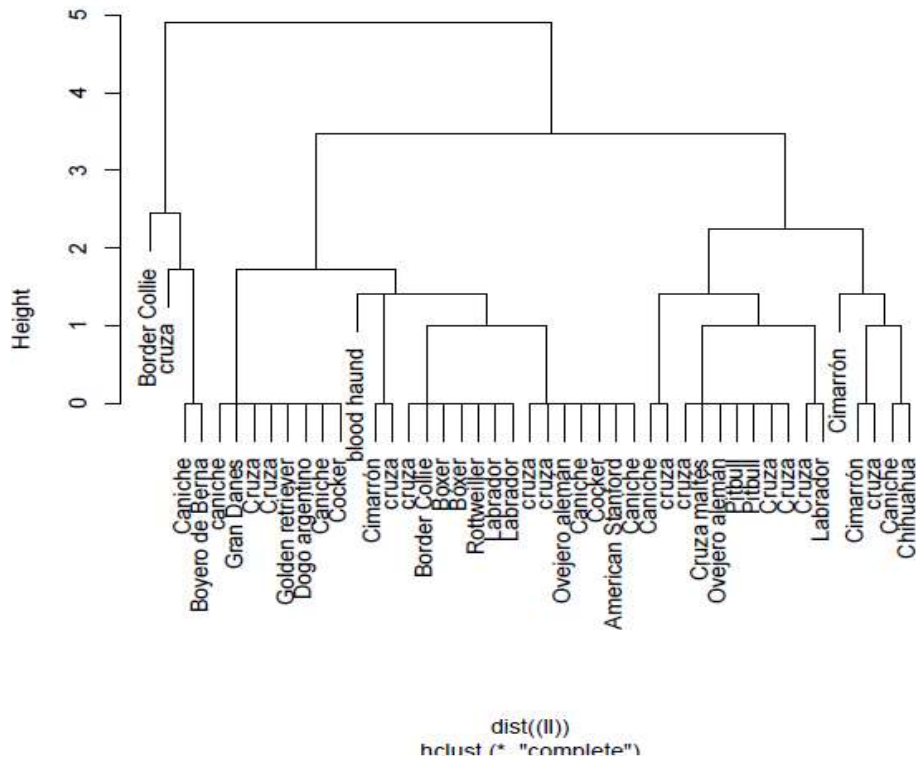


Figura 27. Los pacientes se ingresaron según las razas. No encontramos diferencias significativas ya que nuevamente no los pudimos agrupar.

En resumen, en lo que respecta al estudio genético de los 15 loci estudiados, seis fueron polimórficos (40%), todos de tipo SNPs, los otros nueve fueron monomórficos (no presentarían variación). Obtuvimos una baja variabilidad alélica, pero a nivel poblacional el grupo de tumores tiene mayor variabilidad que el grupo control.

8) DISCUSIÓN

El cáncer de mama es una neoplasia de origen multifactorial y los agentes causales pueden fluctuar dependiendo de la población de estudio, dada la variabilidad de causas genéticas, no genéticas y de las interacciones entre ellas.

En primera instancia la edad de presentación de los tumores mamarios en este trabajo varió entre 6 y 12 años con un promedio de 9 años, datos que coincidieron con los publicados por (Ogilvie et al. 2008; Rivera et al. 2009; Queiroga et al. 2011; Burrai et al. 2020 y Vail et al. 2020). En este trabajo fueron ingresados pacientes a partir de los 6 años porque es la edad donde aumenta la incidencia de estos tumores, por lo cual no tenemos datos de animales menores o mayores a esta edad.

Según Kurzman et al. (1986); Cassali et al. (2009), dos tercios de los tumores de mama ocurren en las mamas abdominales caudales, e inguinales, probablemente debido al mayor volumen de tejido mamario presente en las mismas, siendo menos frecuentes los tumores en mama torácicas. También Vail et al. (2020) observó que el 65 a 70 % de los tumores de mamas caninos se sitúan en las mamas abdominales caudales e inguinales datos que coinciden con los tumores descritos en este trabajo. Solo una perra presentaba un tumor en una mama torácica caudal derecha y 5 presentaban tumores en mamas torácicas, pero estaba involucradas varias mamas de la cadena. El resto de las perras tenían afectadas mayoritariamente las mamas abdominales caudales y las inguinales.

Al menos el 50% de las perras con neoplasias mamarias tienen masas tumorales múltiples (Ogilvie et al. 2008). En nuestro trabajo 20 de las 32 perras presentaban tumores múltiples representando un 62 %.

No hay consenso en lo que respecta a las razas con mayor incidencia de tumor de mama. Por lo tanto, el riesgo varía según el estudio y la localización geográfica (Egenvallet, et al. 2005). Algunos autores afirman que el Chihuahua y el Bóxer tienen menor riesgo de padecer tumores mamarios que otras razas (Ogilvie et al. 2008). Sin embargo, otros autores mencionan que varias razas de perros, entre las que se encuentran Doberman, Ovejero Alemán, y Bóxer, están predispuestos a tumores de mama (Rivera et al. 2009). Según Zatloukal et al (2005), las razas con mayor incidencia de presentar tumores mamarios eran Cocker Spaniel, Caniche y Dachshund, mientras que para Benavente et al (2016), las razas más diagnosticadas fueron el Cocker Spaniel, Pekinés y el Ovejero Alemán.

En nuestro caso encontramos más cantidad de animales cruzas y las razas Caniche, siguiendo por el Labrador y Cimarrón. Atribuimos este dato a las preferencias de razas que varían según los distintos países. Entendemos que el número de animales debería haber sido mayor para que este dato fuera representativo. Respecto de la entrada de casos al Hospital las perras fueron seleccionadas al azar sin distinción de razas (para poder tener una primera aproximación sin sesgo en cuanto a la variabilidad genética). A futuro sería interesante en función a los resultados obtenidos seleccionar diferentes razas para que este dato tenga mayor validez.

Burrai et al. (2020) observaron que los tumores benignos ocurrieron predominantemente en perros de razas pequeñas, particularmente en Yorkshire terrier, mientras que los malignos se detectaron con mayor frecuencia en perros Ovejero Alemán. En nuestro trabajo observamos mayor porcentaje de tumores benignos en Caniches y Ovejero Alemán, pero a diferencia del trabajo anterior el número de animales nuestro es muy bajo como para que este dato sea representativo.

Esta estudiado que el desarrollo de tumores mamarios en la perra es claramente hormono dependiente. Comparado con las perras intactas, el riesgo para los tumores malignos en perras castradas antes del primer estro es 0,5%, luego del primer estro aumenta a un 8%, y se incrementa a un 26% según Paoloni et al. 2007; Sobral et al. 2008; Al-Dissi et al. 2010 y Liu et al. 2014. En este trabajo todas las perras se presentaban enteras por lo tanto no tenían este efecto protector.

El diagnostico histopatológico antes de la cirugía no es una práctica habitual en medicina veterinaria, sino que es realizada luego de la extirpación quirúrgica.

Esto se justifica debido a que generalmente existen tumores múltiples y éstas podrían corresponder a neoplasias mamarias diferentes, por lo que habría que tomar una muestra de cada una de ellas.

Con respecto a la PAAF se debe agregar que existe una gran heterogeneidad celular, hecho que podría llevar a un error diagnóstico ante muestras tan pequeñas como las obtenidas por punción por aguja fina. Otro punto a tener en cuenta es que independientemente del resultado del análisis histopatológico, la modalidad terapéutica va a ser la misma (quirúrgica). La PAAF estaría indicada solo para los casos de diagnóstico diferencial como pueden ser lipomas, mastocitomas y carcinoma inflamatorio según Cassali et al. (2005). En nuestro trabajo el diagnostico se realizó por histopatología luego del procedimiento quirúrgico ya que no realizamos PAAF de rutina y no realizamos biopsias de las mamas por lo mencionado anteriormente.

De las 32 perras estudiadas con tumores de mama el 65% (21 perras) tuvieron diagnóstico de tumor maligno mientras que en el 35% (11 perras), fueron benignos. Estos datos concuerdan con los encontrados por otros autores que encontraron entre un 43 y un 51% de tumores malignos (Sorenmo et al. 2000; Hermo et al. 2005; Ochiat et al. 2015; Burrai et al. 2020).

La determinación del estadio clínico permite definir la extensión de la enfermedad y en consecuencia esto permite establecer un pronóstico y planificar el tratamiento (Casalli et al. 2005).

Según Vail et al. (2020) el pasaje de T1 a T2 y T2 a T3 hacen que el pronóstico de la enfermedad empeore y varíe el tratamiento. Las metástasis a linfonodos regionales independientemente del tamaño tumoral hacen que el estadio pase a IV, lo mismo ocurre con el estadio V donde puede ser cualquier tamaño tumoral, pero con metástasis a distancia.

Según Ferreira et al. (2009), la mayoría de las lesiones mayores de 5 cm (T3) eran malignas, con mayor tasa de proliferación en comparación con tumores más pequeños (T1, T2) datos que concuerdan con lo encontrado en este trabajo donde el 66,7% de los tumores T3 fueron malignos. Según Camargo Nuñez et al. (2019) en cuanto al tamaño del tumor, las lesiones T3 se asociaron predominantemente con carcinosarcomas, mientras que las lesiones T1 y T2 ocurrieron con mayor frecuencia en tumores benignos mixtos y carcinomas mixtos dentro de los malignos.

Burrai et al. (2020) observaron un aumento de 2,3 y 3,6 veces en las probabilidades de un tumor maligno al pasar de T1 a T2 y de T2 a T3 respectivamente. En este trabajo estudiaron 1866 perras con tumores mamarios únicos y observaron un 73% T1, un 16,6% los T2, y 10,3 % T3. Curiosamente, el 89,65% de los CMT se encontraron entre 0 y 5 cm y, sorprendentemente, el 63,76% de los tumores malignos tenían menos de 3 cm, de los cuales un 62,5% fueron clasificados como carcinoma simple. Las clases T2 y T3 incluyeron el 21,32% y el 14,91% de los tumores mamarios. Estos datos concuerdan con nuestro trabajo donde también observamos tumores malignos tanto T1 como T2 y también el tipo histopatológico más observado fue el carcinoma simple.

Dentro de los T1 en nuestro trabajo tuvimos tumores benignos, pero también observamos malignos. Dentro de los benignos en orden de frecuencia observamos el adenoma complejo seguido por el tumor mixto benigno y el papiloma ductal. Dentro de los malignos observamos el carcinoma mixto, comedocarcinoma y el carcinoma complejo.

Dentro de los tumores T2 también observamos tumores malignos y benignos. Dentro de los malignos tuvimos el carcinoma mixto y carcinoma complejo. Dentro de los benignos el más representativo fue el adenoma complejo.

En nuestro trabajo no tuvimos ningún tumor clasificado como carcinosarcoma, si observamos que los T3 más representativos fueron el carcinoma tubular simple y carcinoma túbulo papilar seguidos del carcinoma inflamatorio, carcinoma anaplásico, mioepitelioma maligno, carcinoma complejo, carcinoma intraductal papilar y el carcinoma rico en lípidos.

Las neoplasias mixtas son las neoplasias más frecuentes en las perras y se caracterizan por la proliferación de elementos mioepiteliales tanto epiteliales luminales como intersticiales mezclados con focos de tejidos mesenquimales como cartílago, hueso y grasa, estos datos concuerdan con otros autores como Burrai et al. (2020). También en este trabajo observaron un alto número de tumores de mama menores de 1 cm, lo que sugiere la necesidad de reconsiderar el parámetro de tamaño (T) en el sistema TNM y allanar el camino para el desarrollo de herramientas para la investigación y control de la clínica evaluando los factores de riesgo para tumores de pequeño tamaño. En nuestro trabajo tuvimos la misma observación de que tumores T1 resultaron ser malignos y algunos de ellos de alto grado como el comedocarcinoma y carcinomas sólidos.

Al comparar a las perras que presentaron estadio I y II, con las estadificadas en estadio V, estas últimas, tuvieron un peor pronóstico, coincidiendo con Karayannopoulou et al. (2005). En nuestro trabajo tuvimos 2 perras en estadio V al momento del diagnóstico, que tuvieron un carcinoma complejo y un carcinoma quístico papilar. En este trabajo no estudiamos la

sobrevida, pero pudimos observar que en estos dos casos estas dos perras fueron las que tuvieron la menor sobrevida a causa de la enfermedad comparadas con el resto de las perras.

Entre las perras que presentaron tumores malignos, en cuatro de ellas el tumor estaba ulcerado. Este dato es controvertido ya que según Hellmén et al. (1993) la ulceración y la necrosis son características que se han sugerido como indicadores de mayor agresividad tumoral no se relacionaron significativamente con el pronóstico en este estudio. Muchas veces se debe a traumas autoinducidos, isquemia o infección de la piel, características que no están necesariamente asociadas a un comportamiento biológico agresivo del tumor. En nuestro trabajo las perras con tumores ulcerados fueron indicadores de mayor agresividad tumoral.

En lo que respecta al estudio histopatológico Karayannopoulou et al. (2005) informaron que los pacientes con grado III obtuvieron significativamente una peor tasa de sobrevida que aquellos con grado I o II. También encontraron un riesgo 21 veces mayor de muerte en tumores con lesiones grado III que en los tumores grado I y II.

Según Vail et al. (2020) los tumores de mama malignos diagnosticados histopatológicamente, solo un bajo porcentaje de estos van a generar una invasión linfática y sanguínea con una posterior metástasis a distancia.

La clasificación histopatológica es un parámetro altamente significativo en el pronóstico en general. A pesar de esto, la histopatología de tumores malignos no siempre va a tener un pronóstico negativo, ya que cerca de la mitad de los tumores mamarios malignos, si están bien delimitados, como algunos tipos de carcinomas, no recidivan ni hacen metástasis luego de la ablación quirúrgica. El pronóstico está estrechamente correlacionado con el nivel de diferenciación histopatológica. Los tumores malignos con el mejor pronóstico son carcinomas complejos ya que raramente metastatizan y mediante una escisión completa, su pronóstico es favorable. Los carcinomas simples, frecuentemente se dividen en carcinomas alveolares, tubulares, tubuloalveolares, papilares o papilares quísticos. Estos tumores son invasivos y pueden diseminarse a distancia. Los carcinomas sólidos son más invasivos y tiende a metastatizar pronto. Las neoplasias menos diferenciadas como el carcinoma anaplásico y el carcinoma inflamatorio tienen una gran tendencia a invadir vasos linfáticos y sanguíneos. La invasión de vasos linfáticos cutáneos hace que la piel aparezca inflamada, de allí procede el término clínico descriptivo de carcinoma inflamatorio según Von Euler, (2014). En este trabajo las perras con carcinoma anaplásico y carcinoma inflamatorio fueron las que tuvieron peor pronóstico.

Según Burrai et al. (2020) en su trabajo encontraron que las lesiones benignas más frecuentes fueron los tumores benignos mixtos seguidos de los adenomas complejos y los adenomas simples mientras que los tumores malignos más frecuentes fueron los carcinomas tubulopapilares simples seguido de carcinomas complejos.

Según Flores Ales, (1996); Oliveira de Oliveira et al. (2003), dentro de los tumores malignos el de mayor presentación dentro de los carcinomas, fue el carcinoma tubular simple, seguido del carcinoma sólido simple, carcinoma tubular complejo y el carcinoma papilar quístico simple, y por último el sarcoma, datos muy similares con los tumores encontrados en este

trabajo donde los tumores más frecuentes fueron el carcinoma tubular simple, carcinoma complejo, carcinoma sólido y carcinoma mixto.

En los trabajos de Flores Alés, (1996). dentro de los tumores benignos, los adenomas son los más frecuentes luego los fibroadenomas y tumor mixto benigno. Sin embargo, en otros trabajos, el tumor benigno más frecuente fue el tumor mixto benigno, seguido del adenoma complejo, y el fibroadenoma (Ziller Ortiz, 2004).

En nuestro trabajo los tumores benignos en orden de frecuencia fueron el adenoma complejo, tumor mixto benigno y adenoma intraductal papilar datos que están muy relacionados con lo bibliográficos.

La evaluación de linfonodos regionales tiene un gran impacto en la supervivencia de los perros con CMT ya que muestran una disminución significativa de sobrevida en comparación con los individuos que dieron negativo en la prueba de metástasis en los linfonodos según Vail et al. (2020). En este trabajo no ingresaron pacientes con metástasis a linfonodos.

Dos de las perras presentaron metástasis en pulmón, coincidiendo con la bibliografía donde manifiestan que los pulmones son el sitio más frecuente de metástasis a distancia (Sorenmo et al. 2011; Vail et al. 2020).

Como se mencionó anteriormente en lo que respecta a la correlación entre el estadio clínico e histopatológico con los resultados del análisis estadístico tuvimos una concordancia moderada. El índice Kappa ponderado de Cohen, con intervalo de confianza 95%, es: $k = 0.48$ (0.16 – 0.81). estos datos concuerdan con lo que observamos de los resultados histopatológicos ya que tuvimos tumores T1 (1 a 3 cm) malignos y tumores T2 (3 a 5 cm) benignos. Existió un sesgo a la hora de estadificar los tumores. El método de diagnóstico clínico tendió en este estudio a clasificar los tumores hacia una mayor gravedad. Esto pudo deberse al hecho de que, al elegir el tumor de mayor tamaño de la cadena para enviar a histopatología, quizás no era el más representativo. Lo ideal es poder enviar toda la cadena mamaria para analizar. Esto muchas veces puede ser dificultoso para el patólogo en el momento de realizar los cortes. Para los procedimientos de corte, seguimos las recomendaciones de Estrella et al. (2010) para tumores entre 3-5 cm y muestras mayores de 5 cm, se deben recolectar tres y cinco fragmentos de la masa tumoral, respectivamente, y cada fragmento no debe medir más de 1.5x1.5x0.5 cm. En nuestro caso se enviaron cortes de 1,5 x1,5 x 0,5 cm. del tumor de mayor tamaño. Estos hallazgos hicieron que la correlación entre el estadio clínico y el histopatológico no fuera fuerte. También esto pudo deberse al hecho de que tumores T1 resultaron malignos y T2 resultaron benignos, esto concuerda con el trabajo de Burrai et al. (2020), donde ellos tuvieron la misma observación por lo cual habría que reevaluar el parámetro de tamaño (T) en el sistema TNM en lo referido al factor pronóstico. Esto último nos parece que fue la conclusión más acertada.

Existe evidencia de que los cambios en los genes *BRCA1* y *BRCA2* canino están asociadas con tumores mamarios en la especie. Las mutaciones de estos genes pueden aprovecharse tanto para el diagnóstico como para el tratamiento de tumores mamarios y para avanzar aún más en el tratamiento del cáncer en oncología veterinaria.

En lo que respecta a los estudios de genética molecular realizados, se trabajó con polimorfismos de los genes *BRCA1* y *BRCA2*. El hecho de que se encuentren en desequilibrio H&W puede ser debido a diferentes elementos. Entre ellos se debe mencionar el que son parte de la secuencia de un mismo exón en cada uno de los genes estudiados (*BRCA1* y *BRCA2*). Por otra parte, se debe considerar también, la posibilidad de que alguna fuerza evolutiva esté actuando sobre ellos. Debemos pensar que en los animales de raza el hombre realizó una intensa selección pudiendo indirectamente generar desequilibrios en las frecuencias génicas.

En estudios caninos, una preocupación más significativa es la de estructura de la población y si hay suficiente apareamiento dentro de las razas para mantener el equilibrio de H&W.

Las razas de perros se han desarrollado en los últimos 150 años mediante la cría selectiva de rasgos fenotípicos deseables como apariencia y capacidad de trabajo. El desarrollo de la raza comienza con una pequeña población fundadora, generalmente 2 o 4 perros, que tienen los rasgos deseables. La población crece a partir de apareamientos de animales emparentados entre sí, por ejemplo, entre hermanos o padres e hijos. A su vez esto lleva a que los perros de una raza determinada tienen una base genética en común.

La selección de rasgos fenotípicos ha resultado en la latente selección de enfermedades genéticas y algunas razas ahora tienen una alta incidencia de enfermedades particulares.

La especificidad de la raza de determinadas enfermedades hace que los perros sean candidatos ideales para estudios comparativos de asociación genética; sin embargo, la cría controlada da como resultado la pérdida de selección aleatoria que normalmente enriquecería el acervo genético y mantendría el H&W. Es de especial preocupación, por lo tanto, que la mayoría de las razas serían demasiado endogámicas para ser utilizadas en estudios de asociación de casos y controles. (Short, 2007).

En este trabajo, los valores de F_{IS} de la población son positivos pero bajos, indicando déficit de heterocigotas o exceso de homocigotas, aunque existe variabilidad alélica, lo que nuevamente condice con los resultados de genotipado obtenidos, donde se ve que únicamente seis de los 15 marcadores estudiados presentaron polimorfismo. De todas formas, es interesante el hecho de que, en la población con tumores, el F_{IS} es más bajo que en la población control (0.03876 este es un valor positivo, pero bajo o sea hacia la heterocigosis y 0.15353 es positivo pero alto o sea hacia la homocigosis respectivamente) con lo cual hay mayor variabilidad genética en la población con tumores. Uno de los elementos a considerar en este aspecto, es el número de animales que conformaron cada grupo (32 con tumores y 13 sin tumores), donde sería importante conformar grupos más homogéneos en tamaño.

Con respecto a los resultados del dendrograma se evaluaron las características, como animales sanos y enfermos, estadio clínico, raza, y no observamos agrupamientos; por lo tanto, no encontramos diferencias que fueran significativas. Estos datos concuerdan con el genotipado que pudimos observar, los SNPs tanto en perras control como enfermas lo que nos indica que no podemos decir que estos SNPs estén vinculados con los tumores de mama de las perras en estudio.

Hasta la fecha, solo unos pocos estudios han informado una asociación entre SNP y el riesgo de CMT. Entre ellos se pueden citar:

- Yoshikawa et al. (2005) a, encontraron un único polimorfismo de inserción / deleción en la señal de localización nuclear 2 (NLS2) del *BRCA2* canino, llamado 10204ins / del AAA. Estos autores también informaron de otros polimorfismos (Yoshikawa et al. 2005 b).
- Hsu et al. (2010) encontraron variaciones del exón 11 de *BRCA2* observando SNPs que eran en su mayor parte mutaciones sin sentido que podrían provocar cambios estructurales en la proteína *BRCA2* y mutaciones silenciosas que no provocan alteración de aminoácidos.
- Si se hace referencia a las frecuencias alélicas, algunos autores describieron frecuencias significativamente diferentes para varios SNPs en *ESR1* al comparar razas de alto y bajo riesgo para tumores mamarios, subrayando la importancia de antecedentes genéticos en la susceptibilidad al tumor mamario desarrollado en perros (Borge et al. 2013).
- En un estudio realizado en China se detectaron tres SNPs en *BRCA1* canino; un SNP asociado estadísticamente con CMT. Dos SNPs en las regiones promotoras y un SNP no sinónimo en el exón 23 (Sun et al. 2015).
- Qiu et al. (2016) encontraron dos mutaciones puntuales en la región codificante de *BRCA1* canino en una muestra de animales con tumor mamario benigno y en una muestra de animales con tumor mamario maligno. No se detectaron mutaciones en las muestras de tejido mamario canino normal.
- Ozmen et al. (2017) detectaron por primera vez 19 SNP del exón 11 de *BRCA2* en tumores mamarios caninos.

Los datos presentados en el análisis molecular realizado aquí pueden deberse a numerosos factores:

- Características inherentes a las poblaciones estudiadas, como ser la raza, y el tamaño de ambas poblaciones. Para futuros estudios se pretende aumentar el número de muestras de los bancos de ADN ya existentes, de ambas poblaciones. En lo que se refiere a la raza, se plantea circunscribir los animales estudiados, ya sea los que sean de determinada raza, o los animales cruza. Con esto se lograría una muestra de estudio más homogénea.
- Marcadores estudiados: Se trabajó con polimorfismos de los genes *BRCA1* y *BRCA2*. Estos genes, supresores tumorales, han sido y siguen siendo, muy estudiados en poblaciones humanas. Se ha mencionado que están muy involucrados en el desarrollo de tumores mamarios hereditarios. En caninos, esta diferenciación entre tumores hereditarios-no hereditarios, no está tan estudiada. Puede ser que estos marcadores en concreto no estén tan involucrados en los tumores mamarios más frecuentemente encontrados en esta especie. Por

esta razón es que se pretende aumentar el espectro de genes analizados, con el fin de encontrar marcadores que sean de utilidad en distintos aspectos de la clínica oncológica.

- Diversidad tumoral: Se trabajó con dos grupos de animales: con tumores, sin tumores. En el grupo con tumores, se incluyeron diferentes tipos (carcinoma tubular simple, carcinoma complejo, carcinoma sólido, carcinoma mixto, etc.), entre las perspectivas para próximos estudios, se considera de interés acotar los tipos de tumores analizados, con el fin de homogeneizar dicho grupo.

Los genes estudiados en este trabajo han sido ampliamente relacionados con cáncer de mama. En nuestro caso, no se encontró relación entre cada uno de los marcadores estudiados y la ocurrencia de tumor de mama entre el grupo problema y el grupo control.

Por esta razón es que, sumado a lo ya mencionado, se pretende aumentar el espectro de genes estudiados, con el fin de encontrar marcadores que sean de utilidad en distintos aspectos de la clínica oncológica.

9) CONCLUSIONES

Según la bibliografía consultada, el uso de los criterios de estadificación clínica TNM y la evaluación del grado histopatológico, son útiles para evaluar el pronóstico de las perras con carcinomas mamarios.

En nuestro trabajo el parámetro de tamaño (T) en el sistema TNM nos dio diferencias con los datos de la bibliografía.

Con respecto a los resultados de la correlación entre la clínica y la histopatología tuvimos una correlación moderada pero representativa dado que encontramos tumores malignos T1 (1 a 3 cm) y tumores benignos T2 (3 a 5 cm), esto hizo que nuestra correlación no fuera fuerte. Este nos da la pauta de que tendemos a clasificar los tumores clínicamente hacia una mayor gravedad.

En este trabajo observamos de los 15 marcadores moleculares (SNPs, indels) que 6 de ellos fueron polimórficos (todos del tipo SNPs).

Obtuvimos baja variabilidad alélica, pero a nivel poblacional el grupo de tumores tiene mayor variabilidad que el grupo control. El F_{IS} es más bajo en las perras con tumores que en la población control (0.03876 este es un valor positivo pero bajo o sea hacia la heterocigosis y 0.15353 para las perras controles, es positivo pero alto o sea hacia la homocigosis).

Este es el primer estudio realizado en Uruguay a nivel molecular del ADN buscando mutaciones en perras con tumores de mama ingresadas al Hospital de la Facultad de Veterinaria. Esto es el inicio de una línea de investigación a nivel del ADN de perras con

tumores de mama y el próximo paso para profundizar en este trabajo puede lograrse restringiendo la raza y aumentar el número de muestras.

Durante la realización de este trabajo, se conformaron dos bancos de muestras, uno de sangre y otro de ADN de perras con tumores mamarios, que congeladas se conservan varios años. Estas muestras se emplearán en estudios futuros.

10) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams V, Evans K, Sampson J, Wood J. (2010). Methods and mortality results of a health survey of purebred dogs in the UK. *Journal of Small Animal Practice*, 51(10), 512-524.
2. Allison R, Maddux J. (2009). Tejido glandular subcutáneo mamario, salivar, tiroideo y paratiroideo. En Cowell R. y col. *Diagnostico citológico y hematológico del perro y el gato*. 3er. Edición pp. 112 -128.
3. Al-Dissi A, Haines D, Singh B, Kidney B. (2010). Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 in canine simple mammary gland adenocarcinomas. *Canadian Veterinary Journal*, 51: 1109-1114.
4. Audeh M, Carmichael J, Penson R, Friedlander M, Powell B, McGuinn, K, Scott C, Weitzel J, Oaknin A, Loman, Lu K, Schmutzler K, Matulonis U, Wickens M, Tutt A. (2010). Oral poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet (London, England)*, 376(9737), 245–251.
5. Belkhir K, Borsa P, Chikhi V, Raufaste N, Bonhomme F. (2004). Genetix 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, Francia.
6. Benavente M, Bianchi C, Aba M. (2016). Canine mammary tumors: risk factors, prognosis and treatments. *J. Vet. Adv.*, 6(8): 1291-1300. Buenos Aires, Argentina.
7. Borrego J. (2016), Urogenital and Mammary Gland Tumors, Chapter 351.
8. Burrari, G. Gabrieli, A, Moccia, V, Zappulli, V, Porcellato, I, Brachelente, C, Pirino, S, Polinas, M, Antuofermo, E. (2020). A Statistical Analysis of Risk Factors and Biological Behavior in Canine Mammary Tumors: A Multicenter Study. *Animals*, 10, 1687.

9. Borge K, Melin M, Rivera P, Thoresen S, Webster, M, von Euler H, Lingaas F. (2013). The ESR1 gene is associated with risk for canine mammary tumours. BMC veterinary research, 9(1), 69.
10. Borge K, Borresen D, Lingaas, F. (2011). Identification of genetic variation in 11 candidate genes of canine mammary tumour. Vet. Comp. Oncol. **9**: 241–250.
11. Bostock, D (1986). Canine and feline mammary neoplasias. Br. Vet. J, 142, 506-15.
12. Callen D, Thompson A, Shen Y, Phillips H, Richards R., Mulley J. & Sutherland G. (1993). Incidence and origin of "null" alleles in the (AC) n microsatellite markers.
13. Calvalcanti M, Cassali G. (2006). Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas - revisão. Rev. Clin. Vet., 11, 56-64.
14. Camargo F, Araújo K., Bonolo C, Cavalheiro A, Lavallo, G. Cassali, G. (2019). Mixed tumors of the canine mammary glands: Evaluation of prognostic factors, treatment, and overall survival. Veterinary and Animal Science 7.
15. Canadas A, Santos M, Nogueira A, Assis, Gomes M, Lemos C, Medeiros R, Dias-Pereira P. (2018). Canine mammary tumor risk is associated with polymorphisms in *RAD51* and *STK11* genes. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 1 – 6.
16. Cassali et al (2013). Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. Braz J Vet Pathol, 7(2), 38 – 69.
17. Cassali G, Bertagnolli A, Lavallo G, Tavares W, Ferreira E, Campos C. (2009). Perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of mammary neoplasias in dogs. 34th World Small Animal Veterinary Congress - WSAVA, São Paulo.
18. Chiu Y, Lei H, Huang K, Chiang Y, Lin C. (2019). Overexpression of Kynurenine 3-Monooxygenase Correlates with Cancer Malignancy and Predicts Poor Prognosis in Canine Mammary Gland Tumors. J Oncol. 6201764.

19. Claver J, Sanchez A, Sicardi A, Lawzewitsch I. (1985). Lecciones de histología veterinaria. Vol. 7. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. 59-76.
20. Cohen J. Weighted kappa: (1968). Nominal scale agreement with provision for scaled disagreement or partial credit. Psychol Bull. 70 (4):213-20.
21. Corrada Y, Castex G, de la Sota L, Goya R, Gobello C. (2002). Growth hormone serum concentrations in bitches with spontaneous mammary tumors before and after mastectomy. Anales de Veterinaria de Murcia, 19: 37-42.
22. Corrada Y, Gobello C. (2001). Acromegalia del diestro en la perra. Analecta Veterinaria. Vol 21 N° 1: 57-62.
23. Della Cella C. (2014). Expresión de los receptores de estrógenos y de progesterona en tejido mamario normal y tumoral canino. Tesis de maestría. Facultad de Veterinaria. Universidad de la Republica.
24. De la Hoya M. (2000). Genes de susceptibilidad y cáncer de mama. VI Simposium sobre oncogenes y cáncer. Madrid.
25. De Las Mulas J, Millán Y, Dios R. (2005). Prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor α and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the Dog. Vet Pathol. 42: 200-212. 10.1354/vp.42-2-200.
26. Deng C. (2006). BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. Nucleic acids research, 34(5), 1416–1426
27. Dobson J, Samuel S, Milstein H, Rogers K, Wood J. (2002). Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. J Small Anim Pract. 43(6):240-6.

28. Egenvall A, Bonnett B, Ohagen P, Olson P, Hedhammar A, von Euler H. (2005). Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002 *Preventive Veterinary Medicine* 69:109–127.
29. Elgue V, Piaggio J, Amaral C, Pessina P. (2012). Factors Associated With the Presentation of the Type of Cancer in Dogs Assisted in the Hospital of the Faculty of Veterinary of Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 48 (187) 25-30.
30. Elston C, Ellis I. (1998). Assessment of histological grade. Eds. *Systemic Pathology. The breast*. London: Churchill Livingstone, 365-84.
31. Enginler S, Akış I, Toydemir T, Oztabak K, Haktanir D, Gündüz M, Kırşan I, Fırat I. (2014). Genetic variations of BRCA1 and BRCA2 genes in dogs with mammary tumours. *Vet Res Commun*; 38:21–27.
32. Estrela, L, A Araújo M, Costa N. (2010). Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. *BMC Cancer*. 2010; 10: 256.
33. Ferreira E, Bertagnolli A, Cavalcanti M, Schmitt F, Cassli G. (2009). The relationship between tumor size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumors. *Vet. Comp. Oncol.* 193, 1-6.
34. Ferreira E, Bregunci G, Schmitt F, Cassali G. (2003). Protocol for the anatomopathological examination of canine mammary tumors. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 55, 105- 09.
35. Fleming J, Creevy K, Promislow D. (2011). Mortality in North American Dogs from 1984 to 2004: An Investigation into Age-, Size-, and Breed-Related Causes of Death. *J Vet Intern Med* 25, 187-198.

36. Flores Alés A. (1996). Factores Epidemiológicos de Interés Pronóstico en Tumores Mamarios presentado en: Curso de Perfeccionamiento Profesional Oncología Mamaria en la Perra. Málaga, España.
37. Fong P, Boss D, Yap T, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M (2009). Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med*; 361(2):123–34.
38. Gama A, Alves A, Schmitt F. (2008). Clinicopathologic features of invasive micropapillary carcinoma in dogs. *Vet Pathol* 45:600–601.
39. GEVONC, AVEP (2015). Guía de actuación de los tumores mamarios caninos. España.
40. Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R, Zapulli V. (2011). Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol* 48, 117–131.
41. Gray I, Yuzbasiyan V. (2000). A single nucleotide (T-->G) polymorphism within intron 23 of the canine BRCA1 gene. *Animal genetics*, 31(1), 76–77.
42. Hahn K. (2001). Practical indications and contraindications for tamoxifen. *Proceeding The North American Conference. Small Animal and Exotics. Orlando, Florida.* pp 665-666.
43. Hartl D. (1988). *A primer of population genetics. Segunda Edición. Editado por Sinauewr Associated Inc. Sunderland Mass.*
44. Hellmén E, Bergstrom R, Holmberg L, Spangberg I, Hansson K, Lindgren A. (1993). Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Vet Pathol*, 30: 20-27.
45. Hermo G, García M, Torres P, Gobello C. (2005). Tumores de mama en la perra. *Ciencia Veterinaria. Ciencia Veterinaria Vol. 7, Nº 1.*

46. Hsu W, Huang Y, Chang T, Wong M, Chang S. (2010). Single nucleotide variation in exon 11 of canine BRCA2 in healthy and cancerous mammary tissue. *Vet J* 2010; 184(3):351–6.
47. Karayannopoulou, M., Kaldrymidou, E., Constantinidis, T. C. Dessiris, A. (2005). Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: Application of a human grading method. *Journal of Comparative Pathology*, 133, 246–252.
48. Klopfleisch R, Gruber A. (2009). Increased expression of BRCA2 and RAD51 in lymph node metastases of canine mammary adenocarcinomas. *Vet Pathol.* (3):416-22.
49. Klopfleisch, R., Lenze, D, Hummel M. (2010). Metastatic canine mammary carcinomas can be identified by a gene expression profile that partly overlaps with human breast cancer profiles. *BMC Cancer* 10, 618.
50. Kurzman I, Gilbertson S. (1986). Prognostic factors in canine mammary tumors. *Semin. Vet. Med. Surg. (Small Animal)* 1, 25-32.
51. Lacadena J. (1981). *Genética*. 3ª Edición. A.G.E.S.A. Madrid.
52. Lagadic M, Estrada M, Camadro J, Durand P, Gobel J. (1990). Tumeurs mammaires de la chienne: critères du pronostic histologique et intérêt d'un grading. *Rec. Méd. Vét*, 166, 1035-42.
53. Lana, S. (2008). Tumores de glándula mamaria. En: Withrow, S., Macewen, S. *Oncología clínica de pequeños animales*, 4º edición, ed. Multimedica, pp. 605- 620.
54. Li M, Sternbauer K, Haahr P, Kantanen J. (2005). Genetic components in contemporary Faroe Islands cattle as revealed by microsatellite analysis. *Journal Animal Breeding and Genetics* 122: 309-317.

55. Lipscomb T. (2012). Prognostic studies of mammary and other neoplasia in veterinary medicine: a new paradigm. *Vet. J*, 193, 1.
56. Liu D, Xiong H, Ellis A, Northrup N, Rodriguez C, O'Regan R, Dalton S, Zhao S. (2014). Molecular homology and difference between spontaneous canine mammary cancer and human breast cancer. *Cancer Res*. Sep 15; 74 (18):5045-56.
57. London C. (2014). Small molecule inhibitors in veterinary oncology practice. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 44, 893-908.
58. London C, Galli S, Yuuki T, Hu Z, Helfand S, Geissler E.(1999). Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. *Experimental Hematology* 27, 689-697.
59. Mahdi K, Nassiri M, Nasiri K. (2013). Hereditary genes and SNPs associated with breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*.14 (6):3403-3409.
60. Maues T, El-Jaick K, Costa F, Araujo G, Soares M, Moreira A (2018). Common germline haplotypes and genotypes identified in BRCA2 exon 11 of dogs with mammary tumours and histopathological analyses. *Vet Comp Oncol*; 16(3):379–84.
61. Martínez A. (2001). Caracterización genética del cerdo Ibérico mediante marcadores moleculares. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba, España. pp1-174.
62. Merlo D, Rossi L, Pellegrino C. (2008). Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *J Vet Intern Med*. 22(4):976-984.
63. Misdorp W, Else R, Hellmen E, Lipscomb. (1999). Histological classification of mammary tumours of the dog and the cat. *International Histological Classification of Tumours of Domestic Animals*, 2nd series. Bulletin of the World Health Organization/American Registry of Pathology 18-25.

64. Misdorp W, Cotchin E, Hampe J, Jabara A, von Sandersleben, J. (1973). Canine malignant mammary tumours: III. Special types of carcinomas, malignant mixed tumours. *Vet Pathol* 10:241–256.
65. Misdorp W, Cotchin E, Hampe JF, Jabara AG, von Sandersleben J. (1972). Canine malignant mammary tumours: II. Adenocarcinomas, solid carcinomas and spindle cell carcinomas. *Vet Pathol* 9:447–470, 1972.
66. Mochizuki H, Kennedy K, Shapiro S, Breen M. (2015). BRAF Mutations in Canine Cancers. *PLoS ONE*. 10, 6.
67. Monlux A, Roszel J, MacVean D, Palmer T. (1977). Classification of epithelial canine mammary tumors in a defined population. *Vet Pathol* 14:194–217.
68. Montenegro M. (2012). Caracterización genética de los cerdos pampa Rocha en Uruguay. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas Subárea genética. Pedeciba.
69. Moulton J, Taylor D, Dorn C, Andersen A. (1979). Canine mammary tumors. *Pathol Vet* 7:289–320.
70. Munson L, Moresco A. (2007). Comparative pathology of mammary gland cancers in domestic and wild animals. *Breast Disease* 28:7-21.
71. Murrel T. (1991). Epidemiological and biochemical support for a theory on the cause and prevention of breast cancer. *Med Hypotheses* 36: 389-396.
72. McLeod D, Thrall D. (1989). The combination of surgery and radiation in the treatment of cancer. *Vet Surg* 18 (1): 1-6.
73. Nei M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York.

74. Nelson R, Couto G. (2010). Alteraciones del posparto y de las mamas. En: Medicina interna de pequeños animales, 4^o edición, ed. Elsevier, pp 944 - 974.
75. Nieto A, Perez-Alenza M, Del Castillo N, Tabanera E, Castano M, Pena L. (2003). BRCA1 expression in canine mammary dysplasias and tumours: relationship with prognostic variables. *J Comp Pathol.* 128(4):260-268.
76. Ochiat K, Ishiguro-Oonuma T, Yoshikawa Y, Udagawa C, Kato Y, Watanabe M, Bonkobara M, Morimatsu M, Toshinori. (2015). Polymorphisms of canine BRCA2 BRC repeats affecting interaction with RAD51. *Biomedical Research (Tokyo)* 36 (2) 155-158.
77. Ochiat K, Morimatsu M, Tomizawa N, Syuto B. (2001). Cloning and sequencing full length of canine Brca2 and Rad51 cDNA. *J Vet Med Sci* 63: 1103-1108.
78. Ogilvie G, Moore A. (2008). Neoplasia mamaria. En: Ogilvie GK., Moore A.S. Manejo del paciente canino oncológico. United States, Intermédica, pp 675 – 687.
79. Oliveira de Oliveira L, de Oliveira R, Loretto A, Rodrigues R, David Driemeier D. (2003). Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. *Acta Scientiae Veterinariae.* 31(2): 105- 110.
80. Owen L. (1979). A comparative study of canine and human breast cancer. *Invest Cell Pathol.* 2:257 – 275.
81. Ozmen O, Kul S, Risvanli A, Ozalp G, Sabuncu A, Kul O.(2017). Somatic SNPs of the BRCA2 gene at the fragments encoding RAD51 binding sites of canine mammary tumors. *Vet Comp Oncol.* Dec; 15(4):1479-1486.
82. Paoloni M, Khanna C. (2008). Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nat Rev Cancer* 8, 147-156.

83. Paoloni M, Khanna C. (2007). Comparative Oncology Today. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* November, 37 (6):1023-32.
84. Pérez Alenza M, Peña L, Del Castillo N, Nieto A. (2000). Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *J Small Animal Practice* 41:287-291.
85. Pérez Alenza M, Peña L, Nieto A, Castaño M. (1997). Clinical and pathological prognostic factors in canine mammary tumors. *Ann. Ist. Super. Sanità*, vol 33, n°4, pp 581-585.
86. Qiu H, Lin D. (2016). Roles of DNA mutation in the coding region and DNA methylation in the 5' flanking region of BRCA1 in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Medical Science*, 15-0557.
87. Qiu H, Sun W, Yang X, Jiang Q, Chen S, Lin D. (2015). Promoter mutation and reduced expression of BRCA1 in canine mammary tumors. *Research in veterinary science*, 103, 143-148.
88. Queiroga F, Raposo T, Carballo M, Prada J, Pires I. (2011). Canine mammary tumours a model to study human breast cancer. *Most recent findings. In vivo*. 25:455 – 465.
89. Ramón y Cajal S. (2000). *Carcinogénesis humana*. VI Simposium sobre oncogenes y cáncer. Madrid 10 y 11 de mayo.
90. 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.
91. Rivera P, von Euler H. (2011). Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors. *Vet Pathol* 48, 132-146.

92. Rivera P, Melin M, Biagi T, Fall T, Häggström J, Lindblad-Toh K, von Euler H. (2009). Mammary Tumor Development in Dogs Is Associated with BRCA1 and BRCA2. *Cancer Res* 69, 8770-8774.
93. Rutteman C. (1990). Hormones and mammary tumour disease in the female dog. *Anupdate. In Vivo* 4: 33-40.
94. Ruthanne C, Garret L. (2007). Tumores genitourinarios y de glándula mamaria. En: Ettinger, S. y Feldman, E. *Tratado de Medicina interna veterinaria, enfermedades del perro y el gato. 6º edición, vol. 1, Madrid, ed. Elsevier, pp 784 -789.*
95. Santos A, Lopes C, Ribeiro J, Martins L, Santos J, Amorim I, Matos A. (2013). Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. *BMC veterinary research*, 9(1), 1.
96. Simpson E, Zhao Y. (1996). Estrogen biosynthesis in adipose. Significance in breast cancer development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 784: 18-26.
97. Sobral R, Honda S, Katayama M, Brentani H, Brentani M, Patrão D, Folgueira M. (2008). Tumor slices as a model to evaluate doxorubicin in vitro treatment and expression of trios of genes PRSSI I, MTSS I, CLPTM I and PRSSI I, MTSS I, SMYD2 in canine mammary gland cancer. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 50: 27.
98. Short A, Kennedy L, Barnes A, Fretwell N, Jones C, Thomson W, Ollier W. (2007). Hardy–Weinberg Expectations in Canine Breeds: Implications for Genetic Studies, *Journal of Heredity*, Volume 98, Issue 5, Pages 445–451.
99. Somaia M, Abdelmegeed, Sulma Mohammed (2018). Canine mammary tumors as a model for human disease (Review) *Oncology Letter* 15: 8195-8205.
100. Sorenmo K, Rasotto R, Zappulli V, Goldschmidt M. (2011). Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Vet Pathol* 48:85–97.

101. Sugiura T, Matsuyama S, Akiyosi H, Takenaka S, Yamate J, Kuwamura M, Aoki M, Shimada T, Ohashi F, Kubo K (2007). Expression Patterns of the BRCA1 splicing variants in canine normal tissues and mammary gland tumors. *J.Vet. Med. Sci* 69(6):587-592.
102. Sorenmo K, Shofer F, Goldschmidt M. (2000). Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. *J. Vet. Int Med.* 14: 266-270.
103. Sun W, Yang X, Zhang D, Wang H, Huang J, Lin D.(2015). Relationship between three novel SNPs of BRCA1 and canine mammary tumors. *Volume 77 Issue 11 Pages* 1541-1543.
104. Thumser-Henner P, Nytko J, Rohrer Bley, C. (2020). Mutations of BRCA2 in canine mammary tumors and their targeting potential in clinical therapy. *BMC Vet Res* 16, 30.
105. Tsuchida S, Ikemoto S, Tagawa M. (2001). Microsatellite polymorphism in intron 14 of the canine BRCA1 gene. *J Vet Med Sci.* 63(4), 479-481.
106. Vail D, Thamm D, Liptak J. (2020). *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, 6a edición, cap.28 Tumors of the mammary gland ed. Elsevier, pp 604-625.
107. Vail D, MacEwen E. (2000). Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer investigation*, 18(8), 781–792.
108. Varol U, Kucukzeybek Y, Alacacioglu A, Somali I, Altun Z, Aktas S, Oktay M. (2018). BRCA genes: BRCA 1 and BRCA 2. *Journal of B.U.ON. : Official journal of the Balkan Union of Oncology*, 23(4), 862–866.
109. Von Euler, H. (2014) Tumores de las glándulas mamarias. En Dobson, J., Lascelles B. *Manual de Oncología de pequeños animales 3º edición*, ed. Lexus. pp. 351 365.

110. Wellek S. (2004). Tests for establishing compatibility of an observed genotype distribution with Hardy–Weinberg equilibrium in the case of a biallelic locus. *Biometrics* 60: 694-703.
111. Werner P, Werner J. (2009). Avaliação histopatológica. Dalek Cr. Ed. Oncología em cães e gatos. São Paulo: Roca, 2009, 121-34.
112. Yoshikawa Y, Morimatsu M, Ochiai K, Okuda K, Taoda T, Chikazawa S, Shimamura A, Omi T. (2012) Establishment of a PCR analysis method for canine BRCA2. *BMC. Research Notes* 5:173.
113. Yoshikawa Y, Morimatsu M, Ochiai K, Nagano M, Yamane Y, Tomizawa N. (2005)a; Insertion/deletion polymorphism in the BRCA2 nuclear localization signal. *Biomed Res*; 26 (3):109–16.
114. Yoshikawa Y, Morimatsu M, Ochiai K, Nagano M, Yamane Y, Tomizawa N (2005)b. Analysis of genetic variations in the exon 27 region of the canine BRCA2 locus. *J Vet Med Sci.* 2005; 67(10):1013–7.
115. Zatloukal J, Lorenzová J, Tichy F, Neâas A, Kecová H, Kohout P. (2005) Breed and Age as Risk Factors for Canine Mammary Tumours. *Acta Vet. Brno*, 74: 103-109. República Checa.
116. <http://www.ensembl.org/index.html>
117. <https://kimura.univ-montp2.fr/genetix/>

11) ANEXOS.

Anexo 1. Ficha utilizada en perras con tumores de mama.

PROTOCOLO PARA TUMORES MAMARIOS

Registro nº: _____

Propietario: _____ Telf.: _____

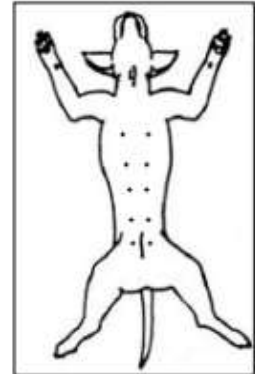
Nombre del paciente: _____ Edad: _____ Entera o Castrada: _____

Especie: _____ Raza: _____ Peso: _____

Número de tumores primarios: _____

Localización del tumor primario: D _____ I _____

Diámetro mayor individual: _____ Único: _____ Múltiple: _____



Tumor primario	Ta (no adherido)	Tb (adherido a piel)	Tc (adherido a músculo)
T0 (s/evidencia de tumor)			
T1 (<3cm)			
T2 (3-5 cm)			
T3 (>5 cm)			
T4 (Tumor de cualquier tamaño, carcinoma inflamatorio)			

Los tumores múltiples pueden ser clasificados independientemente.

* Invasión local de la piel con infección o trauma como causa.

N: Linfonodos regionales: (axilares e inguinales).

Método de evaluación

Linfonodo: INGUINAL _____ AXILAR _____	Na (adherido)	Nb (no adherido)
N0 (No evidencia)		
N1 (Unilateral)		
N2 (Bilateral)		

* (-) =Histológicamente negativo, (+) =Histológicamente positivo.

M: Metástasis lejana.

Método de evaluación

CLINICO _____ RADIOLOGICO _____ HISTOLOGICO _____

M0 (no evidencia)	
M1 (c/nódulos lejanos) (Especificar lugares)	

ETAPA-NIVEL				
ETAPA I	T1a,b, N0	T1a,b; N1a(-)	T1a,b; N2a(-)	M0
ETAPA II	T0 N1(+) M0	T1a,b	N1 (+)	T2a,b N0 ó N1a (+)
ETAPA III	Cualquier T cualquier N M0			
ETAPA IV	Cualquier T Cualquier N M1			

Clasificación Definitiva: T: N: M: Nivel:

INFORMACION COMPLEMENTARIA:

Ha parido alguna vez: Si _____ No _____

Edad al 1er parto: _____

Número de partos: _____

Numero de Cachorros por parto: _____

Ha recibido tratamiento hormonal: Si _____ No _____

Principio Activo Utilizado: _____

Diagnostico anatomopatológico: _____

Presencia de émbolos en vasos linfáticos: Sí _____ No _____

Tipo de crecimiento: Expansivo _____ Infiltrante _____

TRATAMIENTO

QUIRURGICO Sí _____ No _____

Descripción: _____

QUIMIOTERAPIA Sí _____ No _____

Principio activo utilizado: _____

Dosis: _____

Protocolo utilizado: _____

Fechas:

1ºdosis: _____

2ºdosis: _____

3ºdosis: _____

OTROS TRATAMIENTOS: _____

EVOLUCION:

Aparición de nuevos tumores: Sí No

Fecha: _____

Supervivencia en meses:

Respecto a la detección: _____

Respecto al tratamiento quirúrgico: _____

Respecto al final de la quimioterapia: _____

Motivo de la muerte: _____

Muerte relacionada con e/los tumores (metástasis, recidivas, etc...): Sí No

Necropsia:

Metástasis en pulmón: Sí No

Metástasis en hígado: Sí No

Metástasis en otros órganos: _____

OBSERVACIONES: _____

Anexo 2. Datos de perras con tumores de mama.

Caso	Edad (años)	Raza	Estadio	Grado	Histopatología
1	12	Labrador	III	III	Carcinoma inflamatorio
2	12	Labrador	I	III	Comedocarcinoma
3	9	Caniche	II	II	Carcinoma mixto
4	6	Caniche	I	II	Carcinoma mixto
5	8	Rotweiler	III	III	Carcinoma tubular simple
6	12	American Staffordshire terrier	III	III	Carcinoma túbulo papilar
8	10	Cruza	II	Benigno	Adenoma complejo
9	12	Cruza	V	III	Carcinoma complejo muy indiferenciado
10	10	Cimarrón	III	III	Carcinoma anaplásico
11	8	Cocker	I	III	Carcinoma solido
12	10	Cruza	III	III	Mioepitelioma maligno
14	6	Caniche	I	Benigno	Adenoma complejo con hiperplasia lobulillar intraductal
15	12	Caniche	I	Benigno	Tumor mixto benigno
16	12	Cimarrón	III	II	Carcinoma túbulo papilar
17	12	Bóxer	II	II	Carcinoma complejo
18	11	Pitbull	I	Benigno	Adenoma complejo
19	6	Cocker	III	II	Carcinoma tubular simple
20	8	Caniche	I	Benigno	Adenoma complejo multinodular
21	10	Caniche	III	III	Carcinoma complejo
22	8	Dogo	III	III	Carcinoma tubular simple
23	12	Pitbull	III	III	Carcinoma tubular simple

24	8	Ovejero Alemán	I	Benigno	Papiloma ductal simple
25	9	Labrador	II	Benigno	Adenoma complejo
26	8	Ovejero Alemán	II	Benigno	Adenoma complejo
27	10	Cimarrón	III	I	Carcinoma intraductal papilar
28	10	Chihuahua	I	II	Carcinoma complejo tubulopapilar
29	12	Cruza	I	Benigno	Adenoma complejo
30	11	Golden	I	Benigno	Tumor benigno mixto
31	10	Bóxer	II	Benigno	Adenoma complejo
32	10	Cruza	III	II	Carcinoma rico en lípidos
33	10	Boyero de Berna	I	III	Carcinoma solido
34	8	Cruza	V	III	Carcinoma quístico papilar

Las pacientes número 7 y 13 fueron sacadas del estudio porque eran hiperplasias mamarias

Anexo 3. Datos de perras control sin tumores.

Caso	Edad	Raza	Motivo de consulta
1	10	Cruza	Control
2	8	Cruza	Litiasis vesical
3	8	Border Collie	Control
4	6	Cruza	Convulsiones
5	6	Gran danés	Cardiomiopatía dilatada
6	7	Caniche	Enteritis
7	6	Border Collie	Convulsiones
8	8	Cruza	Insuficiencia renal crónica

9	12	Cruza	Insuficiencia renal crónica
10	8	Blood Haund	Dermatología
11	7	Cruza	Dermatología
12	8	Cruza	Control
13	12	Cruza	Insuficiencia renal crónica

Anexo 4. Descripción de características basales de perras con tumores mamarios.

Descripción de las características basales en 32 perras con tumores mamarios			
Característica	N° de casos	%	Media
Edad (años)		9,75 +/- 1,9 años	
6 - 7.	2	6,25	
8 - 9.	9	28,125	
10 - 11.	11	34,375	
12 - 13.	9	28,125	
Peso		22,5 +/- 13,3 kg	
< 10 kg	8	25	
10 - 20 kg	4	12,5	
20 - 30 kg	7	21,875	
>30kg	13	40,625	
Raza			
Puras	26	81,25	
Caniche	6	23,1	
Labrador	3	11,5	
Cimarrón	3	11,5	
Bóxer	2	7,7	
Ovejero alemán	2	7,7	
Cocker	2	7,7	
Pitbull	2	7,7	
American Stanford	1	3,8	
Boyero de Berna	1	3,8	
Golden retriever	1	3,8	
Rottweiler	1	3,8	
Chihuahua	1	3,8	
Dogo argentino	1	3,8	
Cruzas	6	18,75	
Estado reproductivo			
Entera	32	100	
Castrada	0	0	

Característica de los tumores			Benigno	Maligno
Localización				
Torácica craneal	1	3,125	0	1
Torácica caudal	4	12,5	2	2
Abdominal craneal	8	25	5	3
Abdominal caudal	8	25	3	5
Ingunial	11	34,375	1	10
Adherencia				
Ausente	32	100		
Presente	0	0		
Ulceración				
Ausente	28	87,5		
Presente	4	12,5		
Metástasis a distancia				
Ausente	30	93,75	11	19
Presente	2	6,25	0	2
Tamaño				
T1 < 3,0 cm	12	37,5	7	5
T2 3,0 - 5,0 cm	6	18,75	4	2
T3 > 5,0 cm	14	43,75	0	14
Diagnóstico				
Benigno	11	34,375		
Maligno	21	65,625		
Estadío clínico				
Estadío I	12	37,5		
Estadío II	6	18,75		
Estadío III	12	37,5		
Estadío IV	0	0		
Estadío V	2	6,25		
Grado histopatológico				
0(benigno)	11	34,375		
I (Bajo)	1	3,125		
II (Intermedio)	7	21,875		
III (Alto)	13	40,625		
Tipo de cirugía				
Mastectomía regional	24	75	10	14
Mastectomía total	7	21,8	1	6
Eutanasia	1	0,03	0	1

Anexo 5. Relación entre el grado histopatológico y el tipo tumoral maligno.

Relación entre el grado histológico y el tipo tumoral			
Tipo histológico	N° y % de casos		
	Grado I	Grado II	Grado III
Carcinoma inflamatorio.	-	-	1 (4,76%)
Comedocarcinoma	-	-	1 (4,76%)
Carcinoma mixto	-	2 (9,5%)	-
Carcinoma tubular simple	-	1 (4,76%)	3 (14,28%)
Carcinoma túbulo papilar	-	1 (4,76%)	1 (4,76%)
Carcinoma complejo	-	2 (9,5%)	2 (9,5%)
Carcinoma anaplásico	-	-	1 (4,76%)
Carcinoma sólido	-	-	2 (9,5%)
Mioepitelioma maligno.	-	-	1 (4,76%)
Carcinoma intraductal papilar	1 (4,76%)	-	-
Carcinoma rico en lípidos.	-	1 (4,76%)	-
Carcinoma quístico papilar	-	-	1 (4,76%)
Total	1 (4,76%)	7 (33,3%)	13 (61,84%)

Anexo 6. Resultados del Nanodrop perras con tumores.

	Concentración ng/ul	260/280	260/230
1	46,5	1,83	2,03
2	16,9	1,85	1,18
3	29,8	1,87	1,48
4	39,9	1,69	1,21
5	43,2	1,85	1,93
6	46,4	1,69	1,91
7	26,2	1,72	1,74
8	17,4	1,47	1,17
9	21,6	1,63	1,40
10	28,3	1,59	1,44
11	308,6	1,78	1,81
12	110	1,75	0,81
13	167,2	1,80	1,87
14	64,9	1,84	1,68
15	16,9	1,74	1,40
16	33	1,95	2,32
17	16	1,86	2,85
18	14,4	2,15	1,88
19	64,4	1,89	2,28
20	20	1,40	1,07
21	36	1,71	1,86
22	26,4	1,73	1,89
23	9,4	4,11	1,76

24	15,9	1,78	1,94
25	5	4,16	1,08
26	5,6	2,11	0,58
27	5,5	2,56	0,93
28	5	1,49	1,90
29	5,1	2,10	0,63
30	18,4	1,92	0,93
31	5,0	2,26	0,59
32	9,8	1,59	2,01
33	10,4	1,85	0,87
34	9,7	1,36	1,05

Anexo 7. Resultados del Nanodrop. Perras control.

	Concentración ug/dl	260/280	260/230
1	43,9	1,76	2,18
2	10,5	1,43	1,55
3	16,6	1,59	2,03
4	10,9	1,54	1,98
5	31,6	1,62	2,03
6	7,5	1,80	2,27
7	13,3	1,76	1,37
8	34,7	1,70	1,74
9	18,2	1,15	0,36
10	8,6	1,76	1,99
11	6,8	1,50	0,81
12	13,5	1,91	2 34
13	25	1,71	1,12

Anexo 8.

Resultados del genotipado para los 15 SNPs (rosado, perras con tumores; blanco perras control).

Sample ID	GS Barcode	EXON 11	EXON 11	EXON 11	EXON 11	EXON 11	EXON 11	EXON 11	EXON 11	EXON 11	EXON 11	EXON 22	EXON 23	EXON 23	EXON 27	EXON 27
1	560814-11450 A	AG	A	A	A	A	CA	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
2	560814-11450 A	AG	A	A	A	A	CA	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
3	560814-11451 A	AG	A	A	A	A	A	AG	G	AG	T	GAGA	AG	T	G	TG
4	560814-11451 A	G	A	A	A	A	A	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
5	560814-11451 A	AG	A	A	A	A	CA	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
6	560814-11451 A	AG	A	A	A	A	A	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
8	560814-11451 A	A	A	A	A	A	CA	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
9	560814-11451 A	A	A	A	A	A	CA	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
10	560814-11451 CA	A	A	A	A	A	A	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
11	560814-11451 A	G	A	A	A	A	A	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
12	560814-11451 A	A	A	A	A	A	C	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
14	560814-11451 A	A	A	A	A	A	CA	A	G	A	T	GAGA	AG	TC	G	TG
15	560814-11452 A	AG	A	A	A	A	A	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
16	560814-11452 A	AG	A	A	A	A	A	A	G	A	T	GAGA	AG	TC	G	TG
17	560814-11452 A	AG	A	A	A	A	CA	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
18	560814-11452 A	A	A	A	A	A	CA	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
19	560814-11452 A	AG	A	A	A	A	A	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
20	560814-11452 CA	A	A	A	A	A	CA	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
21	560814-11452 A	AG	A	A	A	A	A	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
22	560814-11452 A	G	A	A	A	A	A	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
23	560814-11452 A	A	A	A	A	A	CA	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
24	560814-11452 A	AG	A	A	A	A	A	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
25	560814-11453 A	A	A	A	A	A	C	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
26	560814-11453 A	A	A	A	A	A	CA	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
27	560814-11453 A	A	A	A	A	A	A	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
28	560814-11453 CA	A	A	A	A	A	CA	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
29	560814-11453 A	A	A	A	A	A	CA	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
30	560814-11453 A	G	A	A	A	A	A	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
31	560814-11453 A	AG	A	A	A	A	CA	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
32	560814-11453 A	G	A	A	A	A	A	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
33	560814-11453 A	AG	A	A	A	A	A	AG	G	AG	T	GAGA	AG	T	G	TG
34	560814-11453 A	G	A	A	A	A	A	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
1C	560814-11454 A	AG	A	A	A	A	A	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
2C	560814-11454 A	A	A	A	A	A	CA	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
3C	560814-11454 A	AG	A	A	A	A	CA	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
4C	560814-11454 A	A	A	A	A	A	CA	A	G	A	T	GAGA	AG	TC	G	TG
5C	560814-11454 A	G	A	A	A	A	A	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
6C	560814-11454 A	G	A	A	A	A	A	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
7C	560814-11454 A	A	A	A	A	A	A	G	G	G	T	GAGA	AG	T	G	TG
8C	560814-11454 A	AG	A	A	A	A	A	A	G	A	T	GAGA	AG	TC	G	TG
9C	560814-11454 A	AG	A	A	A	A	A	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
10C	560814-11454 CA	AG	A	A	A	A	A	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
11C	560814-11455 CA	A	A	A	A	A	A	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG
12C	560814-11455 A	A	A	A	A	A	CA	AG	G	AG	T	GAGA	AG	T	G	TG
13C	560814-11455 A	AG	A	A	A	A	CA	A	G	A	T	GAGA	AG	T	G	TG

Anexo 9. Análisis del dendrograma.

			AA	AB	BB	frA	frB	H	nGeno	eAA	eAB	eBB	p,value
EXON,11,,PARTE,2_A,C	A=A	C=B	40	5	0	0,94444444	0,05555556	0,10493827	45	40,1388889	4,72222222	0,13888889	1
EXON,11,,PARTE,2_A,G	A=A	G=B	18	19	8	0,61111111	0,38888889	0,47530864	45	16,8055556	21,3888889	6,80555556	0,92246721
EXON,11,,PARTE,2_A,G,dup	A=A	G=B	18	19	8	0,61111111	0,38888889	0,47530864	45	16,8055556	21,3888889	6,80555556	0,92246721
EXON,11,,PARTE,2_A,indel	A=A		45	0	0	1	0	0	45	45	0	0	1
EXON,11,,PARTE,_A,C1	A=A		45	0	0	1	0	0	45	45	0	0	1
EXON,11,,PARTE,_A,C2	A=A		45	0	0	1	0	0	45	45	0	0	1
EXON,11,,PARTE,_A,C3	A=A	C=B	24	19	2	0,74444444	0,25555556	0,38049383	45	24,9388889	17,1222222	2,93888889	0,8895096
EXON,11,,PARTE,_A,G1	A=A	G=B	41	3	1	0,94444444	0,05555556	0,10493827	45	40,1388889	4,72222222	0,13888889	0,71361207
EXON,11,,PARTE,_A,G1,dup	A=A	G=B	41	3	1	0,94444444	0,05555556	0,10493827	45	40,1388889	4,72222222	0,13888889	0,71361207
EXON,11,,PARTE,_A,G2		G=B	0	0	45	0	1	0	45	0	0	45	1
EXON,11,,PARTE,_A,G2,dup		G=B	0	0	45	0	1	0	45	0	0	45	1
EXON,11,,PARTE,_A,G3	A=A	G=B	41	3	1	0,94444444	0,05555556	0,10493827	45	40,1388889	4,72222222	0,13888889	0,71361207
EXON,11,,PARTE,_A,G3,dup	A=A	G=B	41	3	1	0,94444444	0,05555556	0,10493827	45	40,1388889	4,72222222	0,13888889	0,71361207
EXON,11,,PARTE,_C,T		T=B	0	0	45	0	1	0	45	0	0	45	1
EXON,11,,PARTE,_C,T,dup		T=B	0	0	45	0	1	0	45	0	0	45	1
EXON,22_GAGA,indel	A=A	G=B	0	45	0	0,5	0,5	0,5	45	11,25	22,5	11,25	5,23E-09
EXON,22_GAGA,indel,dup	A=A	G=B	0	45	0	0,5	0,5	0,5	45	11,25	22,5	11,25	5,23E-09
EXON,23_AG,indel	A=A	G=B	0	45	0	0,5	0,5	0,5	45	11,25	22,5	11,25	5,23E-09
EXON,23_C,T	A=C	T=B	0	4	41	0,04444444	0,95555556	0,08493827	45	0,08888889	3,82222222	41,08888889	1
EXON,27_A,G		G=B	0	0	45	0	1	0	45	0	0	45	1
EXON,27_A,G,dup		G=B	0	0	45	0	1	0	45	0	0	45	1
EXON,27_TG,indel	A=C	T=B	0	45	0	0,5	0,5	0,5	45	11,25	22,5	11,25	5,23E-09
EXON,27_TG,indel,dup	A=C	T=B	0	45	0	0,5	0,5	0,5	45	11,25	22,5	11,25	5,23E-09