



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Estudio histológico e inmunohistoquímico de las lesiones mamarias tempranas de caninas sin evidencias clínicas de tumor en Bogotá D.C.

Jahnier Andrés Caicedo Martínez

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Departamento de salud animal

Bogotá D.C., Colombia

2016

Estudio histológico e inmunohistoquímico de las lesiones mamarias tempranas de caninas sin evidencias clínicas de tumor en Bogotá D.C.

Jahnier Andrés Caicedo Martínez

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Salud Animal

Director:

DMV, Esp, DVM, Carlos Arturo Iregui Castro

Línea de Investigación:

Fisiopatología Veterinaria

Grupo de Investigación:

Patobiología Veterinaria

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Departamento de salud animal

Bogotá D.C., Colombia

2016

(Dedicatoria o lema)

A mi familia y amigos.

“He disecado muchos cadáveres de animales y de hombres, he disecado su cerebro, su corazón, su hígado, y no he encontrado por ninguna parte el alma, ni siquiera restos ni manifestaciones de la misma”

Rudolf Virchow

Agradecimientos

A Dios; porque aunque tenga muchos desafíos, confío plenamente en que él me ayuda y me guía por el camino que debo recorrer.

Al Dr. Carlos Arturo Iregui Castro, director de mi tesis y al profesor Benjamín Doncel Díaz por su paciencia y apoyo determinante para la realización de este trabajo y sus aportes en mi formación profesional y personal.

A la Dra. Mónica Paola Gómez Moreno, Profesional especializado, Dirección de Salud Pública, funcionaria del Centro de Zoonosis de Bogotá D.C. por permitirme llevar a cabo una parte de la toma de muestras de este trabajo de grado.

A mis padres Luis Caicedo y Andrea Martínez, mis hermanos Oswin y Helbert; y a mi esposa María Angélica Ávila y nuestro Bebe por su apoyo incondicional.

Resumen

Actualmente las lesiones tempranas mamarias se diagnostican con frecuencia como resultado del éxito de programas de educación y concienciación en mujeres. Establecer un modelo animal de estas lesiones tempranas se justifica ya que es un requisito previo para desarrollar ensayos clínicos en humanos y posteriormente probar tratamientos o programas preventivos. En esta investigación se caracterizaron histológicamente las LIEs en glándulas mamarias (GM) de 50 caninas enteras, de razas con presentación frecuente de neoplasias mamarias, sin masas palpables. A 37 hembras se tomaron biopsias de GM inguinal derecha. En las 13 restantes se tomaron las GM visibles postmortem (108 muestras). Las GM de biopsias no presentaron LIEs. En 19 GM (6 caninas) se observaron LIEs, siendo las más frecuentes adenosis (14 GM, 4 caninas) y el carcinoma in situ (12 GM, 3 caninas). Se encontraron LIEs de origen complejo: hiperplasia compleja y carcinoma complejo, que no habían sido descritas en patología veterinaria, pero que tienen su contraparte en tumores desarrollados. No se observó hiperplasia ductal atípica (HDA), lo que sugiere que HDA no sería una lesión previa en el desarrollo a formas malignas. También, se reitera la heterogeneidad morfológica en las GM de una misma canina y el carácter multifocal de estas lesiones por lo cual se propone la teoría del "sick lobe" como una ruta de carcinogénesis para estos tumores en hembras caninas. Se estudió histológicamente la expresión de galectina- 3 en estas 19 GM teniendo en cuenta el porcentaje de células positivas y la intensidad del color de la reacción. No hubo inmunomarcación para galectina- 3 en las adenosis, las hiperplasias ductales usuales, la hiperplasia lobular atípica, las lesiones de células columnares, el carcinoma complejo o las hiperplasias complejas. Un papiloma/adenoma con hiperplasia de acinos tuvo marcación multifocal en 11–50% de las células con moderada intensidad. Dos Ca in situ ambos del subtipo CLIS uno de grado nuclear intermedio y el otro de alto grado, tuvieron marcación en 10% de las células, pero uno tuvo intensidad baja y el otro intensidad moderada. Nuestros hallazgos sugieren que el rol de la galectina- 3 aparentemente es poco importante en la iniciación de las LIEs. Se describen los cambios en la morfología del estroma en estas 19 GM en las que se evaluó la membrana basal (PAS), densidad del estroma (TM) y el tipo de infiltrado leucocitario (HE). La membrana basal se observó engrosada en los carcinomas in situ (CIS) e interrumpida en los Carcinomas invasivos (CaI). Se observaron tres patrones de densidad del tejido conectivo, laxo (Hiperplasias complejas), denso (CIS y CaI) y mezcla (CaC). Se encontró que el infiltrado leucocitario que predomina son los linfocitos, las células plasmáticas y los macrófagos. Nuestros hallazgos sugieren que el estroma interactúa durante la progresión biológica de estas LIEs.

Palabras clave: Caninas, glándula mamaria, Lesiones intraepiteliales espontáneas de glándula mamaria, patología comparada.

Abstract

Currently the mammary lesions are diagnosed early often as a result of the success of education and awareness in women. Establish an animal model of these early lesions is justified because it is a prerequisite for developing human clinical trials and subsequently implement treatments or preventive programs. In this study, we characterized histologically IELs in mammary glands (MG) of 50 intact females without evident tumors. All dogs were from breeds with frequent presentation of mammary neoplasia. Thirty-seven canines were biopsied from right inguinal MG. In thirteen dogs were dissected visible MG during necropsy (108 samples). MG from biopsy had not IELs. Nineteen MG (6 dogs) had IELs, which more frequency of adenosis (14MG, 4 dogs) and ductal carcinoma in situ (DCIS) (12MG, 3 dogs). We found IELs from complex origin: complex hyperplasia and complex carcinoma. These have not described in veterinary pathology, but they have counterpart in developed tumors. We did not see atypical ductal hyperplasia (ADH), we suggest, ADH could not be a previous lesions to develop malignant tumors. We reiterate morphological heterogeneity of MG from the same dog and multifocal nature of these lesions, we proposed the theory of sick lobe of carcinogenesis for these tumors. We studied histologically the galectin-3 expression in these 19 GM considering the percentage of positive cells and intensity of color reaction. Not there was immunostaining for galectin-3 in the adenosis usual ductal hyperplasia, atypical lobular hyperplasia, columnar cells lesions, complex carcinoma or complex hyperplasias. Papilloma/ adenoma had multifocal staining of 11-50% of cells with moderate intensity. Two CLIS one of nuclear grade intermediate and the other of high nuclear grade dial had 10% of staining cells, but the intensity was moderate and in the other low. Our findings suggest that the role of galectin-3 appears to be unimportant in the initiation of LIEs. In this study, we studied histologically the changes in the morphology of GM stroma of these 19 GM where special the basement membrane (PAS), stromal density (TM) and type of leukocyte infiltration (HE). The thickened basement membrane was observed in the in situ carcinomas (CIS) and disrupted in the invasive carcinomas (Cal). Three patterns of connective density, loose (complex Hyperplasia), dense tissue (CIS and Cal) and mixed (complex Ca) were observed. It was found that the leukocyte infiltration lymphocytes are predominant, plasmatic cells and macrophages. Our findings suggest that stroma interacts during progression of these LIEs biology.

Keywords: Canine, mammary gland, intraepithelial spontaneous lesions of mammary gland, comparative pathology.

Contenido

	Pág.
Resumen	VII
Lista de figuras	XI
Lista de tablas	XV
Lista de Símbolos y abreviaturas	XVII
Introducción	1
1. Histología y carcinogénesis de la glándula mamaria de caninas, estado actual.	7
1.1 Introducción a la anatomía e histología de la glándula mamaria de caninas	7
1.2 Generalidades y carcinogénesis de neoplasias de glándula mamaria	13
1.3 Diagnóstico de las lesiones intraepiteliales	16
1.4 Inmunohistoquímica (IHQ) de glicoconjugados en patología mamaria de caninas.....	20
1.4.1 Lectinas.....	20
1.4.2 Empleo de lectinas en la detección de marcadores glicosilados	22
1.4.3 Importancia de la detección de los marcadores glicosilados en el cáncer de mama	22
1.5 Bibliografía.....	23
2. Histología de lesiones intraepiteliales de glándula mamaria en caninas sin signo clínico alguno de tumor	29
2.1 Resumen	29
2.2 Abstract	29
2.3 Introducción	30
2.4 Materiales y métodos.....	30
2.5 Resultados.....	31
2.5.1 Prevalencia puntual de LIEs en caninas de Bogotá D.C.....	31
2.5.2 Resultados de Hematoxilina-Eosina según tipo de LIEs.....	33
2.6 Discusión	53
2.7 Bibliografía.....	59
2.8 Recomendaciones	63
3. Caracterización del patrón de expresión inmunohistoquímica de Galectina- 3 en lesiones intraepiteliales de glándula mamaria en caninas sin signo clínico alguno de tumor	65
3.1 Resumen	65
3.2 Abstract	65

3.3	Introducción.....	66
3.4	Materiales y métodos	67
3.4.1	Descripción de las LIEs incluidas en el estudio para hacer la inmunomarcación de galectina- 3.	67
3.4.2	Protocolo de la prueba de detección inmunohistoquímica de galectina-3 (LPV-UN-2013)	68
3.5	Resultados	70
3.5.1	Caracterización de la expresión de galectina- 3 en LIEs de GM de caninas sin signos clínicos en Bogotá D.C.....	70
3.6	Discusión.....	72
3.7	Bibliografía	73
3.8	Recomendaciones.....	75
4.	Estudio histológico del estroma en lesiones intraepiteliales de glándula mamaria en caninas sin signo clínico alguno de tumor.....	77
4.1	Resumen.....	77
4.2	Abstract.....	77
4.3	Introducción.....	78
4.4	Materiales y métodos	79
4.4.1	Descripción de las LIEs incluidas en el estudio para hacer el estudio del estroma	79
4.4.2	Protocolo de la evaluación del estroma.....	80
4.4.3	Estadística	81
4.5	Resultados	81
4.5.1	Membrana basal	81
4.5.2	Tejido conectivo.....	83
4.5.3	Infiltrado leucocitario:	87
4.6	Discusión.....	90
4.7	Bibliografía	95
4.8	Recomendaciones.....	99
5.	Conclusiones	101
5.1	Conclusiones.....	101
A.	Anexo: Procedimientos para inmunohistoquímica de galectina-3.....	103
	Bibliografía	105

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Disposición de las glándulas mamarias en la perra, tomada de Patsikas et al. (2006).....	7
Figura 1-2: Lóbulo mamario. HE 100x.....	8
Figura 1-3: Anatomía de la glándula mamaria de caninas.....	9
Figura 1-4: Histología de la glándula mamaria de caninas. Técnica de inmunohistoquímica (IHQ) miosina cadena pesada, 200x	9
Figura 1-5: Histología de la glándula mamaria de caninas. Técnica de inmunohistoquímica (IHQ) miosina cadena pesada, 200x.....	10
Figura 1-6: Histología proestro prepubescentes. HE -100X.....	11
Figura 1-7: Histología proestro adultas. HE -100X.....	11
Figura 1-8: Histología estró. HE -100X.....	11
Figura 1-9: Histología diestro temprano. HE -100X.....	12
Figura 1-10: Histología diestro tardío HE. -100X.....	12
Figura 1-11: Histología anestro temprano HE. -100X.....	12
Figura 1-12: Histología anestro tardío HE. -100X.....	13
Figura 1-13: Etapas de la carcinogénesis en el seno (Kass et al., 2007).....	15
Figura 1-14: Posible evolución del cáncer de seno (Lopez-Garcia et al., 2010).....	16
Figura 1-15: Comparación de CDIS de bajo grado (DCIS), Hiperplasia Ductal Atípica (ADH), y la Hiperplasia Ductal Usual (EHUT).....	19
Figura 2-1: Localización de LIEs y Cal según glándula mamaria en 6 caninas sin signos clínicos de tumor en Bogotá D.C.....	32
Figura 2-2: Adenosis. HE. 40x.....	34
Figura 2-3: Adenosis. HE. 40x.....	34

Figura 2-4: Adenosis. HE. 400x.....	35
Figura 2-5: Hiperplasia ductal usual. HE. 100x.....	35
Figura 2-6: Hiperplasia ductal usual. HE. 200x.....	36
Figura 2-7: Lesión de células columnares. HE. 200x.....	37
Figura 2-8: Papiloma intraductal. HE. 40x.....	37
Figura 2-9: Papiloma intraductal. HE. 200x.....	38
Figura 2-10: Papiloma intraductal/adenoma. HE. 100x.....	39
Figura 2-11: Acercamiento a la base del papiloma/adenoma. HE. 400x.....	39
Figura 2-12: Hiperplasia lobulillar atípica. HE. 200x.....	40
Figura 2-13: Hiperplasia lobulillar atípica, detalle de la Fig. 2-12. HE. 400x.....	41
Figura 2-14: Hiperplasia compleja. HE. 200x.....	42
Figura 2-15: Hiperplasia compleja. IHQ miosina pesada. 100x.....	43
Figura 2-16: Hiperplasia compleja. IHQ queratina básica 5. 100x.....	44
Figura 2-17: Carcinoma lobular in situ, grado intermedio-“sick lobe”. HE. 40x.....	45
Figura 2-18: Carcinoma lobular in situ grado intermedio, “sick-lobe”, aproximación de la figura anterior en cuadrante superior izquierdo. HE. 200x.....	46
Figura 2-19: Carcinoma lobular in situ alto grado. HE. 400x.....	46
Figura 2-20: Carcinoma ductal papilar in situ, grado intermedio. HE. 200x.....	47
Figura 2-21: Carcinoma ductal papilar in situ, grado bajo. PAS. 200x.....	47
Figura 2-22: Carcinoma ductal micropapilar in situ, bajo grado. HE. 100x.....	48
Figura 2-23: Carcinoma ductal in situ sólido de grado bajo. HE. 4x.....	49
Figura 2-24: Carcinoma ductal in situ comedocarcinoma, grado alto. PAS. 200x.....	49
Figura 2-25: Carcinoma complejo intraductal de arreglo papilar. HE. 20x.....	50
Figura 2-26: Carcinoma complejo detalle de figura 2-25. HE. 400x.....	51
Figura 2-27: Carcinoma invasivo. HE. 200x.....	51
Figura 2-28: Carcinoma invasivo. Tricrómica de Masson. 400x.....	52
Figura 3-1: Próstata de humano, control positivo de tinción IHQ para la galectina- 3. IHQ 200x.....	69

Figura 3-2: Tiroides de humano, control negativo de tinción IHQ para la galectina- 3. IHQ 100x.....	69
Figura 3-3: Papiloma/adenoma con foco de hiperplasia de acinos. IHQ para galectina- 3. 400x.....	71
Figura 3-4: CLIS grado intermedio. IHQ para galectina- 3. IHQ 200x.....	71
Figura 4-1: CLIS grado intermedio. PAS. 400x.....	82
Figura 4-2: Carcinoma invasivo. PAS 1000x.....	82
Figura 4-3: Carcinoma complejo. Tricrómica de Masson. 40x.....	84
Figura 4-4: CDIS micropapilar de alto grado. Tricrómica de Masson. 40x.....	85
Figura 4-5: Hiperplasia ductal usual. Tricrómica de Masson. 200x.....	85
Figura 4-6: CDIS papilar grado intermedio. Tricrómica de Masson.100x.....	86
Figura 4-7: CLIS grado intermedio. PAS 400x.....	89
Figura 4-8: Cal. Foco de infiltrado linfoplasmocitario severo en la periferia de la lesión. HE. 200x.....	90

XIV Estudio histológico e inmunohistoquímico de las lesiones mamarias tempranas de caninas sin evidencias clínicas de tumor en Bogotá D.C.

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Cambios histológicos de la glándula mamaria canina durante el ciclo estral, técnica de HE (Santos et al., 2010).....	11
Tabla 1-2: Características para diferenciar entre HDU, HDA Y CDIS de bajo grado.(O'Malley et al., 2011).....	19
Tabla 1-3: Algunos antígenos carbohidratos asociados a células epiteliales de cáncer mamario en mujeres y hembras caninas.....	21
Tabla 2-1: Distribución detallada según tipo de LIEs, animal y GM.....	33
Tabla 2-2: Frecuencia de presentación de los subtipos arquitectónicos de CDIS y de CLIS en GM de caninas y su graduación (Antuofermo et al., 2007; Rosen, 2009; Goldschmidt et al., 2011).....	44
Tabla 3-1: Puntaje para el análisis semicuantitativo en la lectura de la IHQ para galectina- 3.....	70
Tabla 3-2: Inmunorreactividad a la marcación para galectina- 3 según tipo de LIEs.....	70
Tabla 4-1: Modificación en la membrana basal en LIEs y Cal.....	81
Tabla 4-2: Modificación en la membrana basal según tipo y grado de CLIS y CDIS.....	83
Tabla 4-3: Modificación del tejido conectivo según tipo de LIEs y Cal.....	84
Tabla 4-4: Modificación del tejido conectivo de los subtipos de carcinoma según su arreglo y grado nuclear.....	87
Tabla 4-5: Descripción de los tipos y distribución de infiltrado leucocitario según tipo de LIEs.....	88
Tabla 4-6: Descripción de los tipos y distribución de infiltrado inflamatorio para los Ca in situ, CaC Y Cal.....	88

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
Ca	Carcinoma
CaC	Carcinoma complejo
CCC	Cambio de células columnares
CIS	Carcinoma in situ
CDIS	Carcinoma ductal in situ
CLIS	Carcinoma lobular in situ
CaI	Carcinoma invasivo
CZ	Centro de Zoonosis de la ciudad de Bogotá D.C
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria
GM	Glándula mamaria
HC	Hiperplasia compleja
HCC	Hiperplasia de células columnares
HDU	Hiperplasia ductal usual
HLA	Hiperplasia lobular atípica
IHQ	Inmunohistoquímica
LCC	Lesiones de células columnares
LIEs	Lesiones intraepiteliales
LPV	Laboratorio de Patología Veterinaria
N/C	Relación Núcleo/citoplasma
OVH	Ovariohisterectomía
PID	Papiloma intraductal
TC	Tejido conectivo
MB	Membrana basal
VS	Vasos sanguíneos.

XVIII Estudio histológico e inmunohistoquímico de las lesiones mamarias tempranas
de caninas sin evidencias clínicas de tumor en Bogotá D.C.

Introducción

El cáncer mamario en las mujeres ha alcanzado niveles alarmantes y se considera un problema de salud pública en Colombia y en el mundo (Robles and Galanis, 2002; Parkin et al., 2005), es una de las primeras causas de cáncer con una incidencia de 1.15 millones de casos nuevos en el 2002, lo que representa el 23% de todos los tumores malignos. En América Latina y el Caribe, 300.000 mujeres mueren anualmente por esta enfermedad (83 muertes por día). La mortalidad por cáncer de mama en Colombia ha mostrado un aumento del 40% en las dos últimas décadas (Hernández et al., 2007).

Por su alta prevalencia, la neoplasias de mama se consideran el cáncer más importante en hembras caninas (Oliveira et al., 2010), representan cerca del 20% de todos los tumores (Misdorp, 2002) y la mayoría son de carácter maligno y de origen epitelial (Misdorp et al., 1999; Oliveira et al., 2010).

Recientemente se ha propuesto a las hembras caninas como modelo de investigación en aspectos como biología tumoral, diagnóstico, comportamiento, similitud histológica, terapéutica, entre otros, dada la similitud de algunas neoplasias mamarias en caninas y mujeres (Strandberg and Goodman, 1974; Kumaraguruparan et al., 2006; Uva et al., 2009).

Al comparar la casuística de los tumores mamarios según edad y tipo histológico entre los laboratorios de Patología Anatómica de las Facultades de Medicina Veterinaria y de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá D.C. Se encontró que los carcinomas, en sus diferentes presentaciones, son los tipos más frecuentes de tumores malignos mamarios en hembras caninas y en mujeres, y al equivaler las edades en ambas especies hay tendencia a que el tumor se presente en etapas tardías de la vida, entre otras coincidencias (Caicedo et al., 2012).

Los cánceres de mama en muchos aspectos tienen notables coincidencias entre las dos especies (Mulligan, 1963). Algunas de las razones que justifican la utilización de la especie canina como modelo de investigación de los tumores mamarios para las mujeres se apoyan en el hecho de que ambas especies están sometidas al mismo ambiente, exponiéndolas a factores de riesgo similares (Knapp and Waters, 1997). Las edades de presentación coinciden pero como el ciclo de vida de las caninas es más corto se facilita su observación en períodos de tiempo más breves (Uva et al., 2009). Adicionalmente los tumores caninos se desarrollan de manera espontánea a diferencia de otras especies animales -ratón principalmente- hasta ahora utilizadas en investigación de cáncer aplicable al humano, en las cuales los tumores mamarios deben ser inducidos experimentalmente con virus, algo desconocido en humanas y caninas.

Otras similitudes entre los tumores de ambas especies son la aparente dependencia de las neoplasias de mama de factores hormonales, la similitud histológica, el patrón de

metástasis con compromiso de ganglios linfáticos regionales y posteriormente de otros órganos como pulmón, cerebro y hueso, la expresión de marcadores hormonales como estrógeno, progesterona, y otros marcadores útiles en su clasificación (Gama et al., 2008; Sassi et al., 2010; Rivera and von Euler, 2011; Caicedo et al., 2012).

Recientemente, se han demostrado coincidencias en el desarrollo temprano de las lesiones carcinomatosas más comunes en ambas especies, las denominadas lesiones intraepiteliales (LIEs). Posiblemente la formación de algunos carcinomas mamarios pasa por ciertos estadios previos antes de la manifestación clínica de la lesión, algunos de los cuales son factores de riesgo precursores de las patologías neoplásicas. Además de las similitudes morfológicas en mujeres y caninas, las LIEs pueden ser positivas o negativas a estrógenos y la expresión de progesterona es significativamente baja en el carcinoma in situ de bajo grado (Mouser et al., 2010).

Actualmente estas LIEs mamarias se diagnostican con frecuencia como resultado del éxito de programas de educación y concienciación en mujeres. Establecer un modelo animal de estas LIEs se justifica ya que es un requisito previo para desarrollar ensayos clínicos en humanos y posteriormente probar tratamientos o programas preventivos (Antuofermo et al., 2007).

Algunas de estas LIEs como el carcinoma in situ pueden ser empleadas en el análisis de los primeros cambios genotípicos y fenotípicos que indiquen posibles rutas patogénicas a través de las cuales las células manifiestan sus propiedades invasivas tempranas. En las neoplasias mamarias humanas los cambios en las glicoproteínas son múltiples, por ejemplo, hay expresión de mucinas aberrantes (MUC1 y MUC4) en la membrana celular de células tumorales (Cazet et al., 2010); y los niveles de ARNm para muchos de los genes implicados en la glicosilación difieren significativamente entre el tejido normal y maligno de mama, lo que indica que la síntesis, la degradación y la adhesión mediada por glicanos puede alterarse drásticamente en el carcinoma de mama (Mukhopadhyay et al., 2011; Cazet et al., 2010; Potapenko et al., 2010).

En caninas también se ha demostrado la expresión de antígenos carbohidrato en tumores mamarios, entre ellos, los antígenos sialyl lea, T/Tn (Nowak et al., 2009) y galectina – 3 (Choi et al., 2004), pero no se han reportado estudios de expresión de antígenos carbohidrato en lesiones tempranas mamarias de caninas, lo que justifica estudiar su comportamiento, ya que las lesiones tempranas están implicadas en la progresión del cáncer (Hakomori, 2002).

El estudio del microambiente del estroma que rodea a los lobulillos y acinos glandulares en distintos tipos de cáncer ha cobrado especial relevancia. En el cáncer mamario, la matriz conectiva además de actuar como sostén, brinda información de retroalimentación al epitelio, por ejemplo, a partir de la síntesis de estímulos pro-oncogénicos como los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas de la matriz extracelular TIMP-1 Y TIMP-2, además, hay alteración en la deposición de colágeno I, III, V VII, disminución de la expresión de la laminina 1 y de la integrina $\alpha 6$ en las células mioepiteliales (Fata et al., 2003). Lo anterior muestra que durante el desarrollo mamario y la progresión del cáncer, la matriz extracelular se altera dinámicamente en su composición, volumen y orientación (Martins et al., 2002; Kass et al., 2007).

Por estas razones y dada la complejidad biológica de estas lesiones, se desarrolló este trabajo el cual busca describir, y comparar con la literatura existente, la morfología más

temprana posible del componente epitelial de los crecimientos anómalos de glándula mamaria de caninas sin historia ni signo clínico alguno de patología mamaria. Se estudiaron adicionalmente algunas de las características de los constituyentes glicosídicos de las células epiteliales con lesiones tempranas, para lo cual se empleó inmunohistoquímica para Galectina 3 en tejidos de glándula mamaria. Se estudiaron además, las relaciones que dichos crecimientos puedan tener con otras estructuras del estroma circundante, a saber: membrana basal, tejido conectivo e infiltración de leucocitos.

Bibliografía

Antuofermo, E., Miller, M.A., Pirino, S., Xie, J., Badve, S., Mohammed, S.I., 2007. Spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs - A model of breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 16, 2247-2256.

Caicedo, J.A., Iregui, C.A., Cabarcas, M.E., Acosta, B.J., 2012. Estudio comparativo de la frecuencia de tumores mamarios según sexo, edad y tipo histológico en caninos y humanos en los laboratorios de patología anatómica de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. *Revista Colombiana de Ciencia Animal* 5, 37-46.

Cazet, A., Julien, S., Bobowski, M., Burchell, J., Delannoy, P., 2010. Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. *Breast Cancer Research: BCR*, 12(3), 204.

Choi, Y.K., Hong, S.H., Kim, B.H., Kim, H.C., Woo, H.J., Kim, D.Y., 2004. Immunohistochemical expression of galectin-3 in canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology* 131, 242-245.

Fata, J.E., Werb, Z., Bissell, M.J., 2004. Regulation of mammary gland branching morphogenesis by the extracellular matrix and its remodeling enzymes. *Breast Cancer Res* 6(1), 1-11.

Gama, A., Alves, A., Schmitt, F., 2008. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Archiv* 453, 123-132.

Hakomori, S., 2002. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 10231.

Hernández, G., Herrán, S., Cantor, L.F., 2007. Análisis de las tendencias de mortalidad por cáncer de mama en Colombia y Bogotá, 1981-2000. *Rev Colomb Cancerol* 11 (1), 32-39.

Kass, L., Eler, J.T., Dembo, M., Weaver, V.M., 2007. Mammary epithelial cell: Influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumorigenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 39(11):1987-94.

Knapp, D.W., Waters, D.J. 1997. Naturally occurring cancer in pet dogs: important models for developing improved cancer therapy for humans. *Mol med today*, 3(1):8-11.

- Kumaraguruparan, R., Prathiba, D., Nagini, S., 2006. Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. *Research in Veterinary Science* 81, 218-224.
- Martins, A., Tamaso, E., Guerra, J., 2002. Retrospective review and systematic study of mammary tumors in dogs and characteristics of the extracellular matrix. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 39, 38-42.
- Misdorp, W., Else, R., Hellmen, E., Lipscomb, T., 1999. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. *Armed Forces Institute of Pathology*.
- Misdorp, W., 2002. Tumors of the mammary gland. In textbook of Tumors of Domestic Animals, 4th edit, DJ Meuten, Eds., Iowa State Press, Iowa, pp. 575-606.
- Mouser, P., Miller, M.A., Antuofermo, E., Badve, S.S., Mohammed, S.I., 2010. Prevalence and Classification of Spontaneous Mammary Intraepithelial Lesions in Dogs Without Clinical Mammary Disease. *Veterinary Pathology* 47, 275-284.
- Mukhopadhyay, P., Chakraborty, S., Ponnusamy, M.P., Lakshmanan, I., Jain, M., Batra, S.K., 2011. Mucins in the pathogenesis of breast cancer: Implications in diagnosis, prognosis and therapy. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* 1815, 224-240.
- Mulligan, R., 1963. Comparative pathology of human and canine cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 108, 642-690.
- Nowak, M., Madej, J., Dzielicki, P., Lopljuszynski, W., Rodo, A., Ugorski, M., 2009. Tumor-associated Carbohydrate Antigens: Sialyl Le(a) and T/Tn Antigens in Canine Mammary Tumors. *Veterinary Pathology* 46, 222-226.
- Oliveira, J.C., Kommers, G.D., Masuda, E.K., Marques, B., Figuera, R.A., Irigoyen, L.F., Barros, C.S.L., 2010. Retrospective study of 1,647 mammary gland tumors in dogs. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 30, 177-185.
- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P., 2005. Global cancer statistics, 2002. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians* 55, 74-108.
- Potapenko, I.O., Haakensen, V.D., Luders, T., Helland, A., Bukholm, I., Sorlie, T., Kristensen, V.N., Lingjaerde, O.C., Borresen-Dale, A.L. Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. *Molecular Oncology* 4, (2010): 98-118.
- Rivera, P., von Euler, H., 2011. Molecular Biological Aspects on Canine and Human Mammary Tumors. *Veterinary Pathology* 48, 132-146.
- Robles, S., Galanis, E., 2002. Breast cancer in Latin America and the Caribbean. *Revista Panamericana de Salud Pública* 11, 178-185.
- Sassi, F., Benazzi, C., Castellani, G., Sarli, G., 2010. Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *BMC Vet Res* 6, 5.

Strandberg, J., Goodman, D., 1974. Animal model of human disease: canine mammary neoplasia. *The American Journal of Pathology* 75, 225.

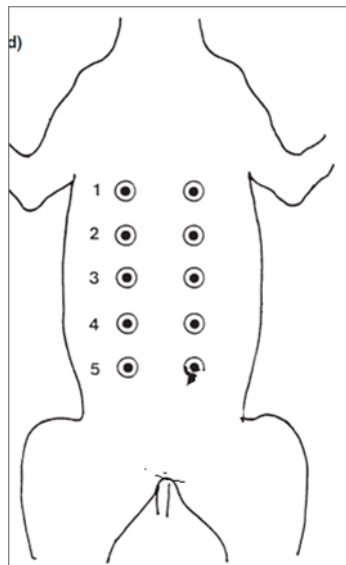
Uva, P., Aurisicchio, L., Watters, J., Loboda, A., Kulkarni, A., Castle, J., Palombo, F., Viti, V., Mesiti, G., Zappulli, V., 2009. Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BMC Genomics* 10, 135.

1. Histología y carcinogénesis de la glándula mamaria de caninas, estado actual.

1.1 Introducción a la anatomía e histología de la glándula mamaria de caninas

La glándula mamaria hace parte de la piel como una glándula sudorípara modificada. Para su estudio se considera parte del aparato reproductor femenino por su relación con los procesos reproductivos (McGeedy, 2006). Se encuentra únicamente en mamíferos y se presenta tanto en el macho como en la hembra, pero solo se desarrolla en la hembra al llegar a la madurez sexual. Inicia su función poco antes del parto, y deja de funcionar cuando el lactante deja de mamar (Sisson and Grossman, 2001).

Figura 1-1: Disposición de las glándulas mamarias en la perra, tomada de Patsikas et al. (2006)



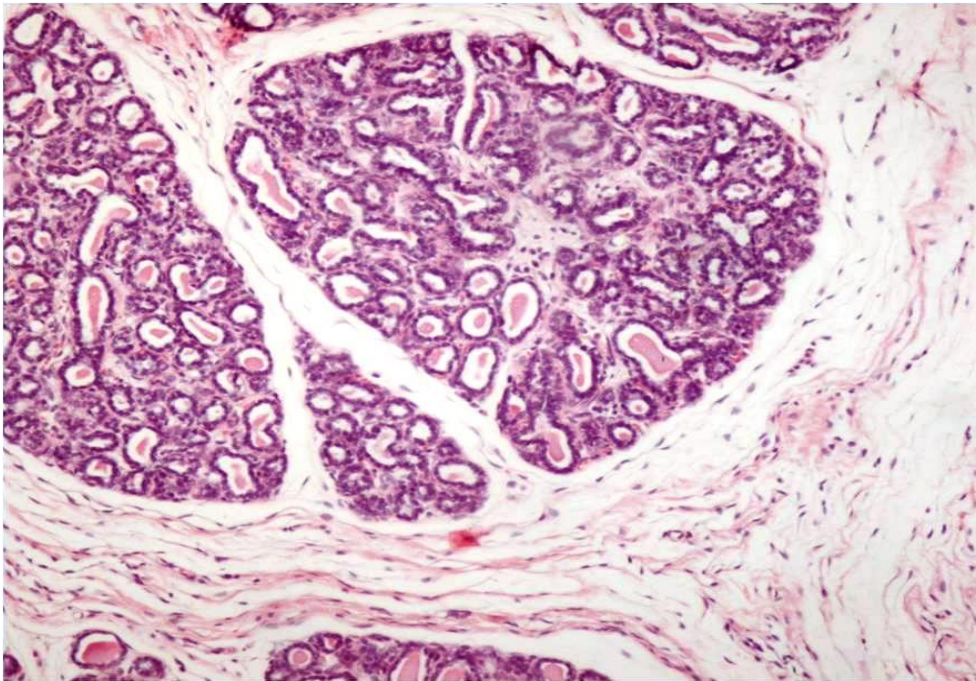
En la perra las glándulas mamarias se disponen a todo lo largo de la línea mamaria. La perra puede tener entre 8 y 10 glándulas (Figura 1-1)(Patsikas *et al.*, 2006):

1. Torácica 1 lado izquierdo (T1L) - Torácica 1 lado derecho (T1R);
2. Torácica 2 lado izquierdo (T2L) - Torácica 2 lado derecho (T2R);
3. Abdominal 1 lado izquierdo (A1L) - Abdominal 1 lado derecho (A1R);
4. Abdominal 2 lado izquierdo (A2L) - Abdominal 2 lado derecho (A2R);
5. Inguinal izquierda (IL) – Inguinal derecha (IR).

El parénquima de la glándula mamaria presenta una estructura ductal y acinar ramificada compleja (de tipo túbulo-acinar compuesta), la cual está rodeada por tejido conectivo con todos los constituyentes necesarios para su adecuado desarrollo e involución de acuerdo a la fase del ciclo; estas estructuras se mezclan en diferentes proporciones según la etapa del ciclo estral.

La porción secretora de la glándula mamaria está dividida por septos de tejido conectivo que separan a los lóbulos mamarios, los cuales, a su vez están divididos por un estroma intralobular formando varios lobulillos, estos en su interior contienen alvéolos que son las unidades encargadas de la secreción de la leche y pequeños ductos no secretores (Figura 1-2).

Figura 1-2: Lóbulo mamario. Este lóbulo tiene tres lobulillos llenos de acinos con secreción eosinofílica en la luz, HE 100x.



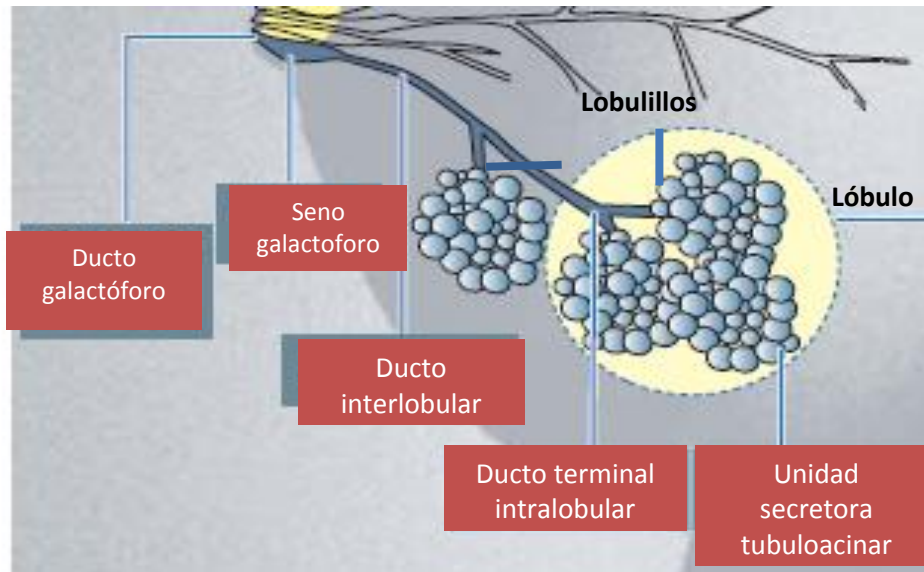
Las unidades secretoras o acinos y los ductos tienen tres tipos de células:

- Las células del epitelio luminal que producen la leche por secreción apocrina.
- Debajo una capa continua de células mioepiteliales las cuales al contraerse asisten para la eyección de la leche y mantienen la estructura normal del acino o del ducto y la membrana basal.
- Las células germinales o basales, las cuales están mezcladas entre las células epiteliales y las mioepiteliales.

Conectados con los acinos se encuentran pequeños conductos excretorios (juntos forman la unidad secretora tubuloacinar) que secretan la leche al ducto intralobular terminal. Esta porción ductal es rica en células germinales capaces de una marcada actividad de

proliferación para formar acinos y conductos excretores. A partir de este punto, entre más se separan de los lobulillos, los ductos aumentan su diámetro y son llamados ductos interlobulares, los cuales confluyen aproximadamente en nueve senos galactóforos y ductos galactóforos que se abren en la superficie del pezón (Figura 1-3) (Sisson and Grossman, 2001; Sorenmo *et al.*, 2011).

Figura 1-3: Anatomía de la glándula mamaria de caninas, imagen modificada de Kierszenbaum (2012).



La unidad funcional secretora de leche en la glándula mamaria es el alvéolo o acino. Posee una forma casi esférica en donde las células del epitelio luminal, las células germinales y las mioepiteliales están en constante cambio y crecimiento ductal y/o acinar (elongación y ramificación) (Sorenmo *et al.*, 2011). Las células luminales sintetizan y secretan las proteínas y lípidos de la leche durante la lactancia, las células mioepiteliales se contraen bajo la influencia de la oxitocina, ayudando así a la expulsión de la leche y las germinales, recambian el epitelio (Griffey *et al.*, 1993; Pereira *et al.*, 2013). Las células acinares secretoras varían de cúbicas a cilíndricas y tienen un número variable de gotas de grasa en su citoplasma que luego se acumulan en el lumen acinar. Las células mioepiteliales se ubican alrededor de los alvéolos en forma continua a manera de cesta y tienen forma de estrella (Sorenmo *et al.*, 2011) (Figuras 1-4 y 1-5).

Figura 1-4: Histología de la glándula mamaria de caninas. El anticuerpo permite observar la capa de células mioepiteliales de color café oscuro en ductos. Técnica de inmunohistoquímica (IHQ) miosina cadena pesada, 200x.

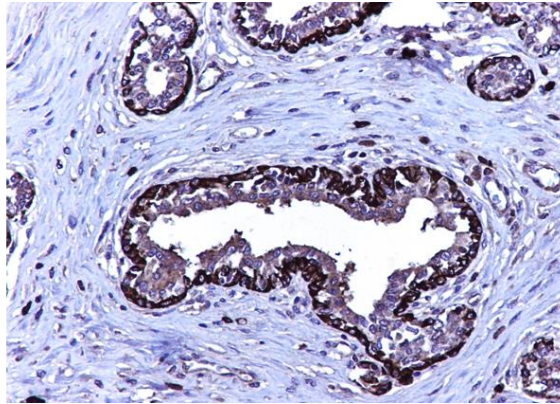
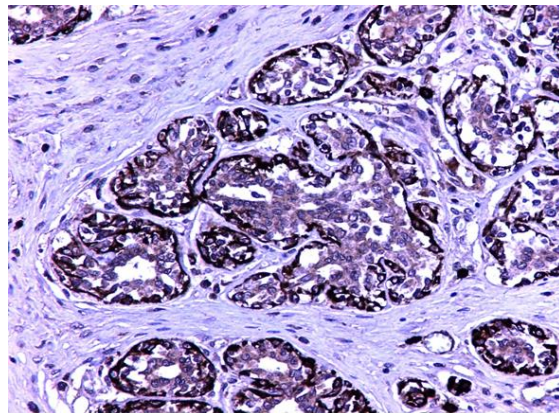


Figura 1-5: Histología de la glándula mamaria de caninas. El anticuerpo permite observar la capa de células mioepiteliales de color café oscuro tanto en acinos. Técnica de inmunohistoquímica (IHQ) miosina cadena pesada, 200x.



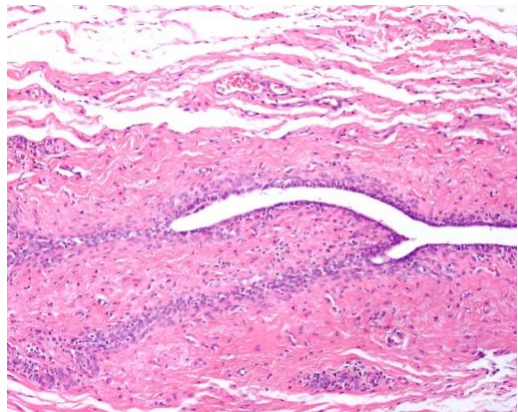
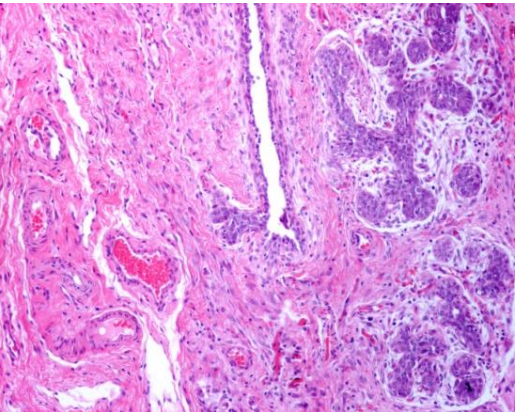
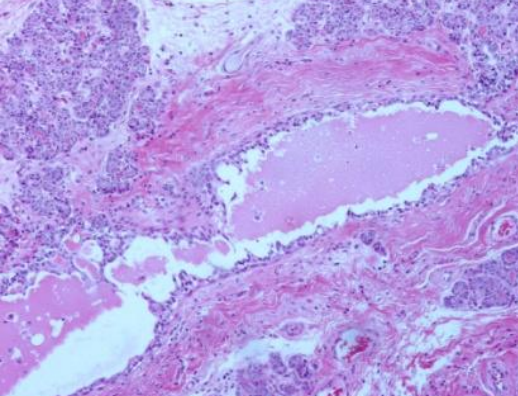
Las células epiteliales, basales o germinales y mioepiteliales descansan sobre la membrana basal continua, compuesta principalmente por colágeno tipo IV, laminina, nidogen, y el proteoglicano heparan sulfato (Sorenmo *et al.*, 2011). Todo el conjunto está rodeado por el estroma constituido por fibroblastos, matriz extracelular, vasos sanguíneos y linfáticos, adipocitos y escasos leucocitos (histiocitos, mastocitos y linfocitos) (Sorenmo *et al.*, 2011).

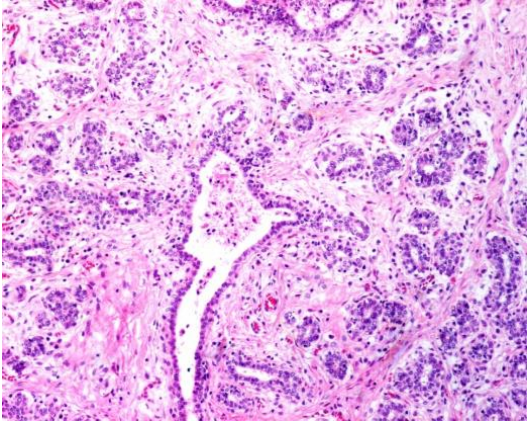
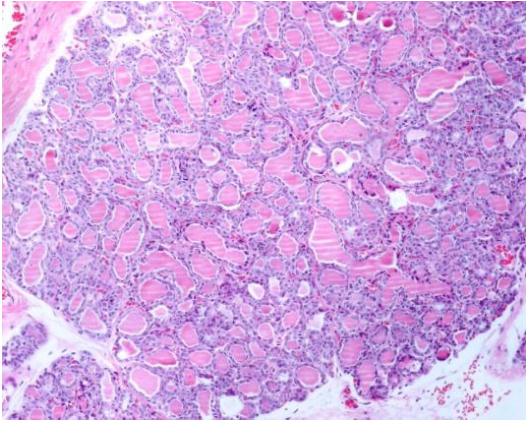
El tejido conectivo fibroso puede subdividirse en dos componentes: el componente intralobulillar rodea los conductos y acinos intralobulillares y está formado por fibras de colágeno finas rodeadas por una matriz extracelular más amplia (tejido conectivo laxo); mientras que el componente interlobular separa los lóbulos y tiene más fibras de colágeno y menos matriz extracelular (Sorenmo *et al.*, 2011). La cantidad de tejido mamario y adiposo es muy variable y es más abundante en las glándulas abdominales e inguinales que en las torácicas.

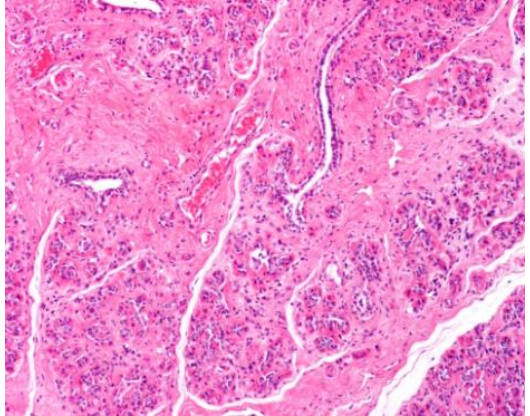
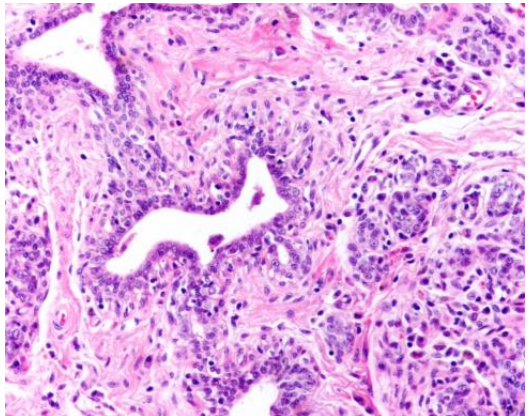
Este arreglo tridimensional es de suma importancia en la caracterización de lesiones tempranas de mama ya que la pérdida de la polaridad de los núcleos en células epiteliales afecta la distribución de las uniones celulares (Plachot *et al.*, 2009). Por esto se han caracterizado los cambios morfológicos de la glándula mamaria de caninas según

el estadio del ciclo estral, que se resumen en la tabla 1-1 y las figuras 1-6 a 1-12 (Rehm *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2010).

Tabla 1-1: Cambios histológicos de la glándula mamaria canina durante el ciclo estral, técnica de HE (Santos *et al.*, 2010):

FASE DEL CICLO	HALLAZGOS	HEMATOXILINA-EOSINA
Caninas pre púberes en la fase de proestro	Sólo grandes conductos (conductos interlobulares) cubiertos por una doble capa de células epiteliales y una sola capa de mioepiteliales, se encuentran dentro de un denso estroma interlobular de TC. Hay proyecciones laterales de la pared de los conductos, las cuales son el bulbo a partir del cual se forman los acinos, constan de células ajustadas con grandes núcleos ricos en eucromatina, 1-2 nucléolos prominentes y bordes poco definidos.	<p data-bbox="911 436 1435 495">Figura 1-6: Histología proestro prepúberes HE -100X.</p> 
Caninas adultas en la fase de proestro	La glándula está inactiva y se compone principalmente por conductos interlobulillares y ocasionalmente por pequeños lóbulos o lobulillos rodeados de grandes cantidades de TC interlobular denso e intralobular laxo. A veces hay estructuras acinares del ciclo estral anterior, recubiertas por células epiteliales vacuoladas aplanadas o cúbicas. Pueden estar presentes macrófagos con lipofuscina dentro de la luz de los alvéolos y del TC intralobular.	<p data-bbox="911 926 1435 984">Figura 1-7: Histología proestro adultas HE -100X</p> 
En el estro, cuando hay niveles de estrógenos altos.	Hay proliferación del epitelio ductal intralobular con formación de múltiples conductillos pequeños revestidos por un epitelio de varias capas inmersos en el TC de los lóbulos.	<p data-bbox="911 1444 1435 1474">Figura 1-8: Histología estro HE -100X</p> 

<p>En diestro temprano, cuando los niveles de progesterona son altos(Santos <i>et al.</i>, 2010).</p>	<p>Hay un mayor desarrollo de los conductos con la formación de lóbulos. El epitelio de revestimiento de estos conductos tiene varias capas. Las células tienen núcleos redondos alargados de cromatina laxa (eucromatina), 1-2 nucléolos prominentes y numerosas mitosis. Los fibroblastos en el estroma interlobular tienen núcleos más prominentes y pueden mostrar actividad mitótica, están inmersos en una matriz mucinosa que contiene numerosos vasos sanguíneos pequeños congestionados.</p>	<p>Figura 1-9: Histología diestro temprano HE - 100X</p> 
<p>En el diestro tardío (Santos <i>et al.</i>, 2010).</p>	<p>El desarrollo de la glándula ha llegado a su punto máximo con la formación de alvéolos secretores en el extremo de los conductos intralobulares. Los alvéolos se llenan con una secreción proteica brillante eosinofílica y son cubiertos por células que van de cuboideas a cilíndricas, las células mioepiteliales son alargadas y forman una capa continua alrededor de los ductos y una capa discontinua alrededor de los alvéolos. Los conductos intralobulares también tienen una secreción eosinofílica brillante en su luz y están revestidos por una capa única de epitelio bajo cuboide y una capa continua de mioepiteliales fusiformes. Hay una cantidad mínima de estroma intralobular alrededor de los alvéolos. El estroma interlobular está constituido por bandas de colágeno y fibras de reticulina que rodean los conductos llenos de secreción interlobular.</p>	<p>Figura 1-10: Histología diestro tardío HE - 100X.</p> 
<p>Anestro temprano(Santos <i>et al.</i>, 2010).</p>	<p>Se caracteriza porque los alvéolos contienen menor secreción; están revestidos por células epiteliales vacuoladas apoyadas en una membrana basal más prominente. Algunos lóbulos muestran cambios</p>	<p>Figura 1-11: Histología anestro temprano HE -100X</p>

	asociados con la regresión de la glándula mamaria, con una mayor cantidad de tejido conectivo intralobular y un infiltrado de linfocitos y células plasmáticas.	
En anestro tardío(Santos <i>et al.</i> , 2010).	Los cambios asociados con la regresión de la GM son más prominentes. Hay disminución del diámetro de la luz de conductos y los lóbulos involucionan. Las células epiteliales se muestran con núcleos picnóticos. En la luz del conducto hay concreciones eosinofílicas (cuerpos amiláceos). El intersticio es más abundante, las fibras de colágeno aparecen más compactas, y puede haber un infiltrado de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos que contienen lipofuscina. El estroma interlobular parece ser más abundante y compacto.	<p>Figura 1-12: Histología anestro tardío HE - 100X</p> 

La irrigación de las glándulas craneales en perras se da por ramas de la arteria torácica externa y ramas de las arterias intercostales; en la región abdominal, por ramas de la arteria epigástrica superficial craneal y caudal, y ramas parietales del abdomen que provienen de la arteria torácica interna (Sisson and Grossman, 2001).

1.2 Generalidades y carcinogénesis de neoplasias de glándula mamaria

Las neoplasias de glándula mamaria se pueden definir como masas de tamaño y forma variada que aparecen en cualquiera de las mamas y que son el sitio más común para la presentación de tumores en hembras caninas, constituyendo entre el 25 - 50% de los tumores en general y el 82% de los tumores del tracto reproductivo en esta especie (Misdorp, 2002).

Las perras no ovariectomizadas tienen un riesgo entre tres y siete veces mayor de incidencia de tumores de mama en comparación con las caninas sometidas a dicho procedimiento quirúrgico, por esto la ovariectomía ha demostrado ser eficaz para prevenir aparición de tumores mamarios(Sorenmo, 2003). El riesgo de cáncer de mama

es de aproximadamente 0,5% en las perras ovariectomizadas antes del primer estro, 8% para ovariectomizadas después del primer estro y de 26% para las caninas intervenidas después de dos o más ciclos (Sorenmo, 2003). Después de dos años y medio de edad, la cirugía tiene poco o ningún efecto en la presentación del tumor (Sorenmo, 2003). Sin embargo, algunos estudios proponen que puede existir algún tipo de protección si se esteriliza entre el cuarto y sexto celo (Sorenmo *et al.*, 2011). Con relación a las razas se propone que la Poodle, Cocker Spaniel y Dachshounds son las más afectadas tanto por tumores malignos como benignos (Zatloukal *et al.*, 2005).

Ya que el carcinoma mamario ocurre virtualmente en todas las especies de mamíferos, un análisis y comparación de la ocurrencia natural de esta enfermedad en diferentes especies ayudará a un mejor entendimiento de cómo se desarrollan este tipo de tumores en humanos (Schneider, 1970; Strandberg and Goodman, 1974; Antuofermo *et al.*, 2007). La patología comparada surge como punto de encuentro entre el patrón de estudio morfológico humano y el animal (Mulligan, 1963; Prier and Brodey, 1963). Su aplicación desde sus inicios se apoyó en el comportamiento natural de la enfermedad en caninos, felinos, ratones (Prier and Brodey, 1963; Misdorp and Weijer, 1980; Sierra, 2009). Estos modelos animales han sido ampliamente utilizados en la investigación del cáncer de seno durante muchos años e incluyen tumores espontáneos y tumores inducidos químicamente, entre otros (Clarke, 1996).

Tanto en mujeres como en caninas existen diversas hipótesis acerca de los posibles mecanismos que participan en la carcinogénesis de los tumores de glándula mamaria, entre ellos se encuentran: (Klopfleisch *et al.*, 2011)

- El crecimiento del tumor: Protooncogenes y oncogenes
- Pérdida de la inhibición de crecimiento: genes supresores de tumores
- Proliferación celular y pronóstico: PCNA, Ki67 y AgNOR
- Apoptosis: pérdida del switch de emergencia
- Reparación del ADN: falla en la calidad del ADN
- Moléculas de adhesión
- Angiogénesis

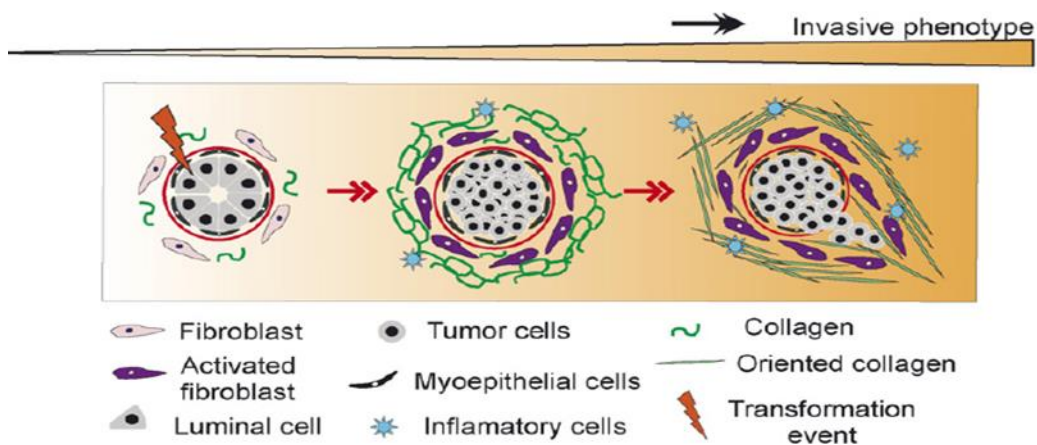
Se destaca la participación del gen supresor del crecimiento tumoral p53 (Lee and Kweon, 2002), las mutaciones de los genes de susceptibilidad del cáncer de seno (BRCA) (Rivera *et al.*, 2009), la expresión del factor de crecimiento epidérmico dos (HER2/*neu*-ERBB2) y disturbios hormonales. La hipótesis hormonal se basa en el hecho de que en tejido neoplásico se encontraron receptores para estrógenos, progesterona, hormona del crecimiento y prolactina, los cuales pueden afectar el genoma mamario.

También se están investigando las interacciones estroma-epitelio que regulan el desarrollo de la glándula mamaria y son críticas para la remodelación fisiológica del tejido (Kass *et al.*, 2007; Klopfleisch *et al.*, 2011). La matriz extracelular, que es un componente proteico del tejido conectivo, interviene en la regulación del crecimiento, la supervivencia, la migración y la diferenciación de las células epiteliales mamarias a través de un repertorio de receptores transmembrana, de los cuales los mejor caracterizados son las integrinas. Se sabe que las integrinas modulan el destino celular mediante la transducción recíproca de señales bioquímicas y biofísicas entre la célula

epitelial y la matriz extracelular, facilitando procesos tales como la morfogénesis glandular en la etapa embrionaria y durante la lactancia.

Durante el desarrollo del seno y la progresión del cáncer, la matriz extracelular se altera dinámicamente en su composición, volumen y orientación. Estas modificaciones influyen sobre la forma de la célula epitelial, modulan factores de crecimiento y respuestas hormonales para regular procesos incluyendo la morfogénesis de la ramificación de los túbulos y la diferenciación acinar. La transformación maligna también se asocia con la remodelación de la matriz con una esclerosis progresiva del tejido conectivo que puede estimular el crecimiento de las células epiteliales de la glándula mamaria, perturbar la organización del tejido del seno, y promover la invasión y la supervivencia de la célula epitelial (Figura 1-13).

Figura 1-13: Etapas de la carcinogénesis en el seno, de izquierda a derecha: conductos normales; Ca ductal *In situ*; y, carcinoma con fenotipo invasor. Se destacan los cambios desmoplásicos – representados por los fibroblastos activados y por las fibras de TC (verdes)- del estroma alrededor de la lesión (Kass *et al.*, 2007).



El tratamiento con progestágenos para evitar la aparición del estro y por lo tanto la concepción, incrementan el desarrollo de tumores, lo que no se ha podido establecer con claridad es si estimula con mayor frecuencia el crecimiento maligno o benigno (Sorenmo, 2003).

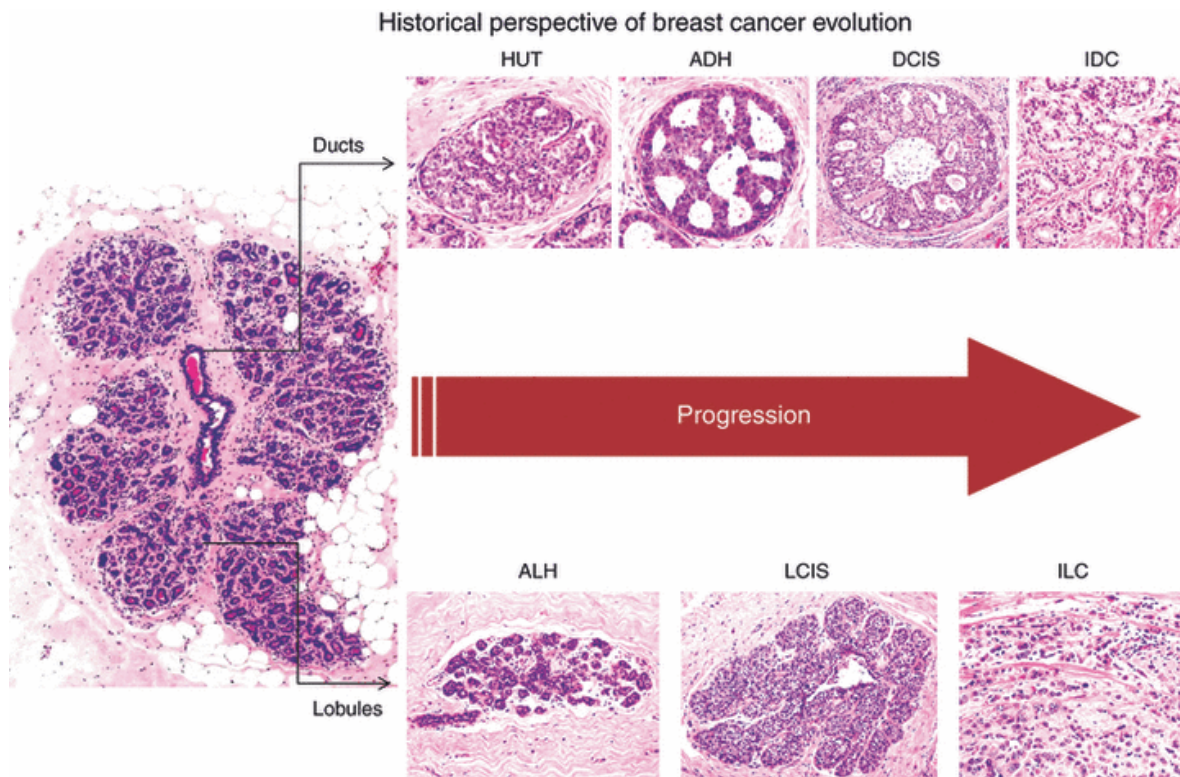
Otro factor de riesgo que ha sido documentado en caninas y mujeres es la alimentación. La obesidad en los primeros años de vida y previa al desarrollo de la neoplasia, favorece su aparición por alteración del equilibrio y funcionamiento hormonal. También se ha reportado que el consumo de una dieta casera rica en carne de bovino y porcino y escasa en vegetales en mujeres se asocia con una mayor presentación de estos tumores (Sorenmo, 2003; Tsubura *et al.*, 2005).

1.3 Diagnóstico de las lesiones intraepiteliales

Debido a la poca claridad de los criterios para diagnosticar lesiones y crecimientos anormales del epitelio ductal o acinar sin evidencia alguna de ruptura de la membrana basal (también llamadas lesiones intraepiteliales, LIES) en caninas (Antuofermo *et al.*, 2007), los investigadores de diversas regiones del mundo han utilizado criterios establecidos en patología mamaria humana (Mouser *et al.*, 2010). A continuación se muestra su definición, clasificación y criterios diagnósticos (Purcell and Norris, 1998; Antuofermo *et al.*, 2007; Mouser *et al.*, 2010; Pinder, 2010; Goldschmidt *et al.*, 2011).

Se parte del hecho de que estas lesiones tempranas se pueden originar de los lobulillos o los ductos de la GM (Lopez-Garcia *et al.*, 2010) (Figura 1-14).

Figura 1-14: Posible evolución del cáncer de seno, el cual se origina de los ductos o de los lobulillos. HUT (hiperplasia ductal usual) ADH (hiperplasia ductal atípica), DCIS (carcinoma ductal in situ), IDC (carcinoma ductal invasivo); y ALH (hiperplasia lobular atípica), CLIS (carcinoma lobular in situ), ILC (carcinoma lobular invasivo) (Lopez-Garcia *et al.*, 2010).



Adenosis: corresponde a la proliferación benigna de células epiteliales y mioepiteliales, con un incremento del número de acinos y ductos intralobulares. La atipia nuclear es nula y las figuras mitóticas generalmente están ausentes.

Adenosis esclerosante: cuando la adenosis se asocia con fibrosis o esclerosis del estroma con distorsión de la arquitectura lobular.

Papiloma intraductal: consiste en múltiples ramas de papilas derivadas de un segmento del ducto, contenidas dentro del lumen del mismo. Los papilomas tienen proliferación de células epiteliales y mioepiteliales, usualmente sin pleomorfismo ni atipia nuclear.

Papiloma esclerosante: además de lo anterior hay prominente esclerosis del estroma.

Hiperplasia ductal usual (HDU): afecta los ductos y se caracteriza por incremento de la celularidad del epitelio de revestimiento sin atipia (tres o más células arriba de la membrana basal). Se aprecia una población mixta de células mioepiteliales y epiteliales que con frecuencia obliteran la luz y ensanchan la estructura, también pueden formar fenestraciones irregulares en las cuales las células epiteliales pierden su polaridad. Los límites de las células pueden ser difíciles de distinguir.

Hiperplasia ductal atípica (HDA): cualitativamente es idéntica al carcinoma ductal in situ de grado bajo o intermedio, pero cuantitativamente es insuficiente para garantizar un diagnóstico como tal, ya que los cambios de hiperplasia ductal atípica se limitan a un diámetro que no excede los dos milímetros y ocupa solamente un ducto. Citológicamente la proliferación de células del epitelio está compuesta por una población atípica de células pequeñas o de tamaño medio, redondas, cúbicas o poligonales, hiper cromáticas, emergiendo focalmente dentro de áreas de hiperplasia usual. Las células atípicas se distribuyen formando espacios cribiformes (espacios pequeños geométricos con forma de puentes romanos). Pueden verse nucléolos únicos, las mitosis son infrecuentes. Las membranas citoplasmáticas son fácilmente distinguibles, con una buena demarcación célula – célula dentro de las áreas del epitelio hiperplásico.

Cambio de células columnares (CCC): se caracteriza porque las unidades ductales y/o los acinos presentan grados variables de dilatación, revestidas por una o dos capas de células epiteliales columnares o cilíndricas con núcleos uniformes, ovoides, regularmente orientados, perpendiculares a la membrana basal, con cromatina dispersa y nucléolo poco prominente. Las figuras de mitosis son raras. El borde luminal presenta signos de secreción apical y en la luz se observa secreción que puede estar calcificada (Ferreira *et al.*, 2010).

Hiperplasia de células columnares (HCC): es similar al CCC pero con estratificación celular superior a dos capas (fig. 2). En ocasiones pueden observarse pequeñas excrescencias micropapilares y material de secreción calcificado que forma cuerpos de psamoma (Ferreira *et al.*, 2010).

Cambio de células columnares e hiperplasia de células columnares con atipia epitelial plana (AEP). La nueva clasificación de la OMS para humanos ha propuesto esta denominación para las lesiones de células columnares con atipia (4). Las uniones ducto-lobulillares terminales están revestidas por células con núcleos que tienden a ser redondos más que alargados, que no se disponen perpendiculares a la membrana basal, con leve aumento de la relación N/C. Los nucléolos pueden ser levemente prominentes y las figuras de mitosis ocasionales. También puede observarse estratificación nuclear, con núcleos ovoides perpendiculares a la membrana basal, con leve atipia, similar a la observada en los adenomas de colon (1). El borde luminal de las células epiteliales suele presentarse a manera de hocico («apical snouts»). Las secreciones lumbinales pueden ser prominentes, con formación de calcificaciones laminadas tipo psamomma. La atipia

nuclear constituye el marcador de la atipia epitelial plana, con núcleos redondos, agrandados, monomorfos e hiper Cromáticos.

Ca ductal in situ (CDIS): Se diagnostica cuando la proliferación anormal de las células epiteliales está presente dentro de más de dos secciones del ducto o unidad ducto-acinar y su diámetro excede los 2 mm (si es menor se interpreta como hiperplasia ductal atípica), sin romper la membrana basal. Tanto la arquitectura como las células son atípicas, se pueden formar espacios cribriformes limitados por células epiteliales con desorden en su polaridad. El Ca ductal in situ tradicionalmente se ha clasificado de acuerdo a su patrón arquitectónico de crecimiento en cribriforme (tubular), papilar, micropapilar, sólido, y comedocarcinoma, este último caracterizado por la presencia de necrosis central. La graduación se establece principalmente por el pleomorfismo nuclear y/o presencia de necrosis, en un sistema de tres grados (bajo grado o 1, grado intermedio o 2 y alto grado o 3)(Lester *et al.*, 2009; Rosen, 2009).

Bajo grado o grado 1: Población uniforme de células, siempre con un núcleo pequeño, oval a redondo. El núcleo tiende a tener una membrana nuclear fina, cromatina difusa y nucléolo poco visible muy discreto. Las mitosis son poco frecuentes. En mujeres el patrón de crecimiento asociado usualmente es cribriforme, micropapilar o sólido.

Grado intermedio o grado 2: Compuesto por células que exhiben moderado grado de pleomorfismo nuclear, caracterizado por cariomegalia con un diámetro 1 - 2 veces mayor comparado con células epiteliales normales, las mitosis y apoptosis de células individuales son infrecuentes.

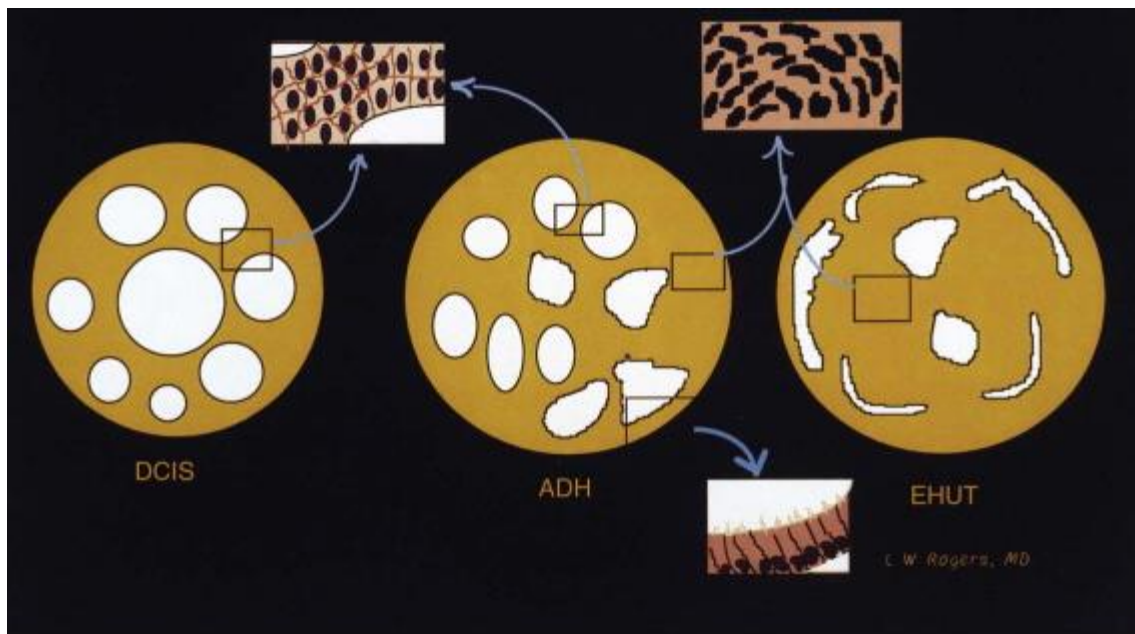
Alto grado o grado 3: Compuesto por células con núcleos polimórficos que siempre son grandes, diámetro nuclear >2.5 veces comparado con las células epiteliales ductales normales, membrana nuclear irregular, cromatina densa y prominente, múltiples nucléolos prominentes y frecuentes figuras mitóticas atípicas. Además se puede identificar apoptosis con micro calcificaciones amorfas y comedonecrosis, hallazgo que no es requisito para el diagnóstico. Los patrones arquitectónicos asociados son sólido, micropapilar, cribriforme y comedocarcinoma. El patrón cribriforme es común con Ca ductal in situ de bajo grado, mientras que el sólido con comedonecrosis, es una característica de Ca ductal in situ de alto grado.

Adicionalmente se tienen en cuenta los siguientes criterios para diferenciar entre HDU, HDA y CDIS de bajo grado (Tabla 1-2 y Figura 1-15) (O'Malley *et al.*, 2011).

Tabla 1-2: Características para diferenciar entre HDU, HDA Y CDIS de bajo grado.(O'Malley *et al.*, 2011)

	HDU	HDA	CDIS BAJO GRADO
TAMAÑO	Variable, raramente extenso y usualmente lóbulo céntrico	Usualmente confinado en una unidad ducto lobulillar o menor a 2 mm	Puede ser extenso
COMPOSICIÓN CELULAR	Variable	Población de células uniformes focales	Uniformes
ARQUITECTURA	Arreglo celular formando papilas irregulares	Patrones focales de CDIS	Micropapilar, papilar y sólido
LUMEN	Irregular, en forma de ranura, puede ser periférico, conectados en tres dimensiones	Espacios focalmente bien formados	Espacios bien definidos en toda la lesión (cribiforme)
NÚCLEO CELULAR	Distribuidos de manera desigual, con forma y tamaño variados	Usualmente hiper cromático, núcleos uniformes	Uniformemente espaciados

Figura 1-15: Comparación de CDIS de bajo grado (DCIS), Hiperplasia Ductal Atípica (ADH), y la Hiperplasia Ductal Usual (EHUT). Los lúmenes en CDIS son rígidos y bien formados. En la ADH, hay lúmenes definidos; sin embargo, también se observan algunos espacios poco definidos y en forma de ranura. En la HDU los lúmenes rígidos están ausentes y son comunes lúmenes mal formados. Las células de CDIS y HDA son paralelas a los lúmenes, son uniformes, y tienen bordes diferenciados. Las células de la HDU son perpendiculares a los lúmenes y tienen bordes poco diferenciados e incluso hay algo de solapamiento entre ellas.



1.4 Inmunohistoquímica (IHQ) de glicoconjugados en patología mamaria de caninas

Los glicoconjugados son compuestos formados por la unión entre mono, oligo o polisacáridos y lípidos (glicolípidos) o proteínas (glicoproteínas) (Mody *et al.*, 1995). Los azúcares que forman parte del glicoconjugado constituyen en conjunto el glicano. Los glicanos por sí mismos poseen diversas funciones como proveer estructura a la cubierta celular y a la matriz extracelular, y modificar algunas características de las proteínas tales como la solubilidad y la estabilidad.

La gran variedad de estructuras que pueden adoptar glicanos y su localización en la cara extracelular de las membranas, permite explicar por qué muchos de ellos son antigénicos e intervienen en funciones como adhesión a la membrana basal, tránsito de proteínas, comunicación intercelular, interacciones ligando-receptor (Nelson and Cox, 2005). También se les encuentra en el plasma sanguíneo unidos a proteínas y hormonas (Gabiús *et al.*, 2002; Mislovicova *et al.*, 2009).

La expresión de los glicoconjugados en la superficie celular se produce durante el desarrollo normal de las células y se relaciona con una serie de funciones fisiológicas importantes, como el reconocimiento de la célula, el crecimiento, la inhibición por contacto, y la diferenciación (Mody *et al.*, 1995).

1.4.1 Lectinas

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas de origen no inmune que se unen con alta afinidad y especificidad a los glicanos que forman los glicoconjugados (Mislovicova *et al.*, 2009). Las lectinas además tienen aplicaciones prácticas entre las que se incluyen: estudio de la estructura de las membranas celulares, detección de transformaciones neoplásicas de las células, purificación de glicoconjugados, estudios de citogenética, ensayos histoquímicos y enzimáticos, y la tipificación de grupos sanguíneos.

Durante la transformación neoplásica maligna (cáncer) siempre ocurren cambios importantes en la glicosilación de glicoproteínas que participan en procesos celulares como apoptosis, angiogénesis, crecimiento celular, uniones célula-célula y célula-matriz (Hakomori, 2002). Estos cambios determinan la aparición de tipos anormales de glicanos, algunos de ellos quedan expuestos en la superficie celular, resultando en la formación de antígenos asociados al cáncer (Hakomori, 2002). Las células cancerosas al ser autónomas expresan sus propios antígenos. El sistema inmune es capaz de reconocer algunos de estos antígenos y destruir así las células cancerosas. Sin embargo, estas células pueden eludir con éxito la inmunovigilancia, a través de algunos mecanismos que incluyen el enmascaramiento y/o modulación de antígenos de superficie. Una disminución en la membrana de glicoproteínas tipo glicanos permite a las células cancerosas enmascarar o perder epítopos antigénicos, y escapar de la respuesta inmune favoreciendo la progresión del tumor, invasión del estroma y metástasis (Liu *et al.*, 2013).

Algunos de estos antígenos carbohidratos de células epiteliales del cáncer de seno se han caracterizado en mujeres (Brockhausen, 2006) y pocos de ellos se han descrito en caninas, como se resume en la tabla 1-3.

Tabla 1-3: Algunos antígenos carbohidratos asociados a células epiteliales de cáncer mamario en mujeres y hembras caninas.

ANTIGENOS CARBOHIDRATOS ASOCIADOS A CELULAS EPITELIALES DE CANCER MAMARIO		
MUJERES		HEMBRAS CANINAS
Tn antigen	GalNAc α -Ser/Thr \uparrow	Si (Nowak <i>et al.</i> , 2009)
STn antigen	Sialyl α 2-6GalNAc α -Ser/Thr \uparrow	No se encontró reporte
Core 1, T antigen	Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr \uparrow	No se encontró reporte
Sialyl-T antigens	Sialyl α 2-3Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr \uparrow	No se encontró reporte
	Sialyl α 2-6(Gal β 1-3)GalNAc α -Ser/Thr \uparrow	No se encontró reporte
Core 2	GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc α -Ser/Thr $\uparrow\downarrow$	No se encontró reporte
Core 3	GlcNAc β 1-3GalNAc α -Ser/Thr \downarrow	No se encontró reporte
Core 4	GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-3)GalNAc α -Ser/Thr \downarrow	No se encontró reporte
Type 1 chain	[GlcNAc β 1-3 Gal β 1-3] n \downarrow	No se encontró reporte
Type 2 chain acetyllactosamines \uparrow	[GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4] n poly-N-	No se encontró reporte
Sialyl-Lewis ^a 3Gal- \uparrow	Sialyl α 2-3Gal β 1-3 (Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-	Si (Nowak <i>et al.</i> , 2009) ligando selectina E y P
SLe ^x 3Gal- \uparrow	Sialyl α 2-3Gal β 1-4 (Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-	Si (Nakagawa <i>et al.</i> , 2009; Pinho <i>et al.</i> , 2007)
Sialyl-dimeric Lewis x	Sialyl α 2-3Gal β 1-4 (Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3 \uparrow Gal β 1-4 (Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal-	No se encontró reporte

La flecha \uparrow indica que incrementa en cáncer, mientras que la flecha \downarrow indican que disminuye en cáncer. Fuc, fucosa; Gal, galactosa; GalNAc, N-acetilgalactosamina; GlcNAc, N-acetilglucosamina; sialyl, ácido sialico; SLe^x, Sialyl-Lewisx; STn, Sialyl-Tn.

Las lectinas son importantes en procesos celulares como reconocimiento célula-célula, interacciones con la matriz extracelular, la fertilización de los gametos, el desarrollo embrionario, crecimiento celular, señalización celular, migración y adhesión celular, apoptosis, inmunomodulación e inflamación, interacciones hospedador patógeno, plegamiento de glicoproteínas, inducción mitogénica y homeostasis. Además se ha descrito que la expresión de ciertas lectinas endógenas varía en células neoplásicas (Ghazarian *et al.*, 2011).

La galectina 3 se destaca por su participación en el empalme y corte del ARN, la regulación del crecimiento celular, adhesión celular, embriogénesis, protección contra apoptosis, angiogénesis y metástasis (Ghazarian *et al.*, 2011). Se ha descrito que la expresión de galectina 3 en carcinomas mamarios de mujeres y caninas es menor que en los adenomas (Castronovo *et al.*, 1996; Choi *et al.*, 2004). Esto sugiere que la disminución en la expresión de galectina 3 afecta las interacciones de las células malignas con sus vecinas y con el estroma, a través de sus ligandos correspondientes, promoviendo la progresión del tumor y empeorando el pronóstico clínico (Ghazarian *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2010). Además se ha encontrado que hay fuerte inmunorreactividad hacia galectina-3 en el cáncer de mama metastásico al cerebro

(Gallegos, 2013). En la revisión de literatura no se encontraron reportes en hembras caninas acerca de la expresión de galectina 3 en lesiones tempranas, pero se ha descrito que la galectina 3 no se expresa en glándula mamaria normal (Choi *et al.*, 2004).

1.4.2 Empleo de lectinas en la detección de marcadores glicosilados

Las lectinas poseen por lo menos dos sitios de reconocimiento para los carbohidratos, de ahí su capacidad para aglutinar células, aunque en la actualidad el término de lectina se ha aplicado a proteínas con un solo sitio de reconocimiento a carbohidratos, como es el caso de las selectinas.

Las lectinas se consideran valiosas herramientas en el campo de la genética, la biomedicina y la inmunología. Su utilidad se basa en la propiedad para enlazarse con varios tipos de glicoconjugados presentes en las superficies celulares y fluidos corporales, así como la actividad mitogénica que permite utilizarlas en estudios de proliferación de linfocitos. Actualmente se emplean lectinas para investigar el desarrollo del cáncer, por ejemplo, utilizando métodos de histoquímica se ha demostrado que las lectinas obtenidas de *Vicia villosa* (VVA)(Kawaguchi *et al.*, 2006), y la de *Helix pomatia* (HPA) (Brooks *et al.*, 2001), ambas con especificidad hacia GalNAc, pueden ser un factor pronóstico en el cáncer de mama.

1.4.3 Importancia de la detección de los marcadores glicosilados en el cáncer de mama

Las mucinas en humanos, como marcadores glicosilados, son de gran importancia para el diagnóstico del cáncer de mama, sin embargo, su detección se basa en el empleo de anticuerpos monoclonales que reconocen epítopes que, en algunas ocasiones, debido a las diferencias de glicosilación en estas moléculas, pueden dar resultados falsos negativos.

Las lectinas con especificidad para los antígenos Tn y TF, como las obtenidas de *Vicia villosa*, *Helix pomatia* y *Amaranthus leucocarpus*(Cazet *et al.*, 2010), podrían emplearse como herramientas alternativas en la detección de los marcadores glicosilados en cáncer de mama, reconociendo cambios desde sus fases iniciales, donde su diagnóstico histológico se vuelve difícil debido a que en esta etapa aún no se identifican claramente anomalías en las células que sugieran la presencia de cáncer.

1.5 Bibliografía

Antuofermo, E., Miller, M.A., Pirino, S., Xie, J., Badve, S., Mohammed, S.I., 2007. Spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs - A model of breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 16, 2247-2256.

Brockhausen, I., 2006. Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO reports* 7, 599-604.

Brooks, S., Hall, D., Buley, I., 2001. GalNAc glycoprotein expression by breast cell lines, primary breast cancer and normal breast epithelial membrane. *British journal of cancer* 85, 1014.

Caicedo, J.A., Iregui, C.A., Cabarcas, M.E., Acosta, B.J., 2012. Estudio comparativo de la frecuencia de tumores mamarios según sexo, edad y tipo histológico en caninos y humanos en los laboratorios de patología anatómica de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. *Revista Colombiana de Ciencia Animal* 5, 37-46.

Castronovo V., Van Den Brûle F.A., Jackers P., Clausse N., Liu F.T., Gillet C., Sobel M.E., 1996. Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer. *The Journal of Pathology* 179, 43-48.

Cazet, A., Julien, S., Bobowski, M., Burchell, J., Delannoy, P., 2010a. Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. *Breast Cancer Research: BCR*, 12(3), 204.

Cazet, A., Julien, S., Bobowski, M., Krzewinski-Recchi, M.A., Harduin-Lepers, A., Groux-Degroote, S., Delannoy, P., 2010b. Consequences of the expression of sialylated antigens in breast cancer. *Carbohydrate research* 345, 1377-1383.

Chen, G., Zou, Q., Yang, Z., 2010. Expression of galectin-3 and Sambucus nigra agglutinin and its clinicopathological significance in benign and malignant lesions of breast]. *Zhong nan da xue xue bao. Yi xue ban= Journal of Central South University. Medical sciences* 35, 584.

Choi, Y.K., Hong, S.H., Kim, B.H., Kim, H.C., Woo, H.J., Kim, D.Y., 2004. Immunohistochemical expression of galectin-3 in canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology* 131, 242-245.

Clarke, R., 1996. Animal models of breast cancer: their diversity and role in biomedical research. *Breast Cancer Res Treat* 39(1), 1-6.

Fata, J.E., Werb, Z., Bissell, M.J., 2004. Regulation of mammary gland branching morphogenesis by the extracellular matrix and its remodeling enzymes. *Breast Cancer Res* 6(1), 1-11.

Ferreira, E., Gobbi, H., Saraiva, B.S., Cassali, G.D., 2010. Columnar cell lesions of the canine mammary gland: pathological features and immunophenotypic analysis. *Bmc Cancer* 10, 7.

Gabius, H.J., Andre, S., Kaltner, H., Siebert, H.C., 2002. The sugar code: functional lectinomics. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1572, 165-177.

Gallegos, B., 2013. El papel de la galectina-3 en el desarrollo del cáncer de mama., in: Blanca Cuevas, E.P.C., Rocío Coutiño y Pedro Hernández Cruz. (Ed.), *Galectina tres en cáncer de mama*. *Revista De Educación Bioquímica: REB.* 32(1): 3-12.

Gama, A., Alves, A., Schmitt, F., 2008. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Archiv* 453, 123-132.

Ghazarian, H., Idoni, B., Oppenheimer, S.B., 2011. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochemica* 113, 236-247.

Goldschmidt, M., Pena, L., Rasotto, R., Zappulli, V., 2011. Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology Online* 48, 117-131.

Griffey, S., Madewell, B., Dairkee, S., Hunt, J., Naydan, D., Higgins, R., 1993. Immunohistochemical reactivity of basal and luminal epithelium-specific cytokeratin antibodies within normal and neoplastic canine mammary glands. *Vet Pathol* 30(2):155-61.

Hakomori, S., 2002. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 10231.

Hernández, G., Herrán, S., Cantor, L.F., 2007. Análisis de las tendencias de mortalidad por cáncer de mama en Colombia y Bogotá, 1981-2000. *Rev Colomb Cancerol* 11 (1), 32-39.

Hovey, R.C., Aimo, L., 2010. Diverse and Active Roles for Adipocytes During Mammary Gland Growth and Function. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 15, 279-290.

Kass, L., Erler, J.T., Dembo, M., Weaver, V.M., 2007. Mammary epithelial cell: Influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumorigenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 39(11):1987-94.

Kawaguchi, T., Takazawa, H., Imai, S., Morimoto, J., Watanabe, T., Kanno, M., Igarashi, S., 2006. Expression of *Vicia villosa* agglutinin (VVA)-binding glycoprotein in primary breast cancer cells in relation to lymphatic metastasis: is atypical MUC1 bearing Tn antigen a receptor of VVA?. *Breast cancer research and treatment* 98, 31-43.

Kierszenbaum, AL., 2011. Fertilization, placentation, and lactation (Mammary gland). In: Kierszenbaum, ed. *Histology and Cell Biology*. Elsevier / Mosby; 3rd edition. Philadelphia, USA, p. 676.

Klopfleisch, R., von Euler, H., Sarli, G., Pinho, S.S., Gartner, F., Gruber, A.D., 2011. Molecular Carcinogenesis of Canine Mammary Tumors: News From an Old Disease. *Veterinary Pathology* 48(1):98-116.

Knapp, D.W., Waters, D.J., 1997. Naturally occurring cancer in pet dogs: important models for developing improved cancer therapy for humans. *Mol Med Today* 3(1):8-11.

Kumaraguruparan, R., Prathiba, D., Nagini, S., 2006. Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. *Research in Veterinary Science* 81, 218-224.

Lee, C., Kweon, O., 2002. Mutations of p53 tumor suppressor gene in spontaneous canine mammary tumors. *Journal of veterinary science* 3, 321.

Lester, S.C., Bose, S., Chen, Y.-Y., Connolly, J.L., de Baca, M.E., Fitzgibbons, P.L., Hayes, D.F., Kleer, C., O'Malley, F.P., Page, D.L., 2009. Protocol for the examination of specimens from patients with ductal carcinoma in situ of the breast. *Archives of pathology & laboratory medicine* 133, 15-25.

Liu, X., Nie, H., Zhang, Y.B., Yao, Y.F., Maitikabili, A., Qu, Y.P., Shi, S.L., Chen, C.Y., Li, Y., 2013. Cell Surface-Specific N-Glycan Profiling in Breast Cancer. *PLoS One* 8(8), e72704.

Lopez-Garcia, M.A., Geyer, F.C., Lacroix-Triki, M., Marchió, C., Reis-Filho, J.S., 2010. Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways. *Histopathology* 57(2):171-92.

Martins, A., Tamaso, E., Guerra, J., 2002. Retrospective review and systematic study of mammary tumors in dogs and characteristics of the extracellular matrix. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 39, 38-42.

McGeady T.A., 2006. Male and Female Reproductive System. In: McGeady TA, Quinn A, Fitz-Patrick ES (eds). *Veterinary embryology*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, p 264.

Misdorp, W., Weijer, K., 1980. Animal model of human disease: breast cancer. *The American Journal of Pathology* 98, 573.

Misdorp, W., Else, R., Hellmen, E., Lipscomb, T., 1999. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. *Armed Forces Institute of Pathology*.

Misdorp, W., 2002. Tumors of the mammary gland. In textbook of Tumors of Domestic Animals, 4th edit, DJ Meuten, Eds., Iowa State Press, Iowa, pp. 575-606.

Mislovicova, D., Gemeiner, P., Kozarova, A., Kozar, T., 2009. Lectinomics I. Relevance of exogenous plant lectins in biomedical diagnostics. *Biologia* 64 (1), pp. 1-19.

Mody, R., Joshi, S.H., Chaney, W., 1995. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 33(1), 1-10. Review.

Mouser, P., Miller, M.A., Antuofermo, E., Badve, S.S., Mohammed, S.I., 2010. Prevalence and Classification of Spontaneous Mammary Intraepithelial Lesions in Dogs Without Clinical Mammary Disease. *Veterinary Pathology* 47, 275-284.

Mukhopadhyay, P., Chakraborty, S., Ponnusamy, M.P., Lakshmanan, I., Jain, M., Batra, S.K., 2011. Mucins in the pathogenesis of breast cancer: Implications in diagnosis, prognosis and therapy. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* 1815, 224-240.

Mulligan, R., 1963. Comparative pathology of human and canine cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 108, 642-690.

Nakagawa, T., Endo, Y., Watanabe, M., Mochizuki, M., Nishimura, R., Sugano, S., Sasaki, N., 2009. Adhesional function of canine mammary gland tumor cells expressing sialyl Lewis X. *Journal of Veterinary Medical Science* 71, 1225-1228.

Nelson, D and Cox, M, 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry* four edition. pp.521.

Nowak, M., Madej, J., Dzigiel, P., Lopljszynski, W., Rodo, A., Ugorski, M., 2009. Tumor-associated Carbohydrate Antigens: Sialyl Le(a) and T/Tn Antigens in Canine Mammary Tumors. *Veterinary Pathology* 46, 222-226.

O'Malley, F.P., Pinder, S.E., Mulligan, A.M., 2011. *Breast Pathology: A Volume in the Series: Foundations in Diagnostic Pathology (Expert Consult-Online)*. Elsevier Health Sciences.

Oliveira, J.C., Kommers, G.D., Masuda, E.K., Marques, B., Figuera, R.A., Irigoyen, L.F., Barros, C.S.L., 2010. Retrospective study of 1,647 mammary gland tumors in dogs. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 30, 177-185.

Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P., 2005. Global cancer statistics, 2002. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians* 55, 74-108.

Patsikas, M.N., Karayannopoulou, M., Kaldrymidoy, E., Papazoglou, L.G., Papadopoulou, P.L., Tzegas, S.I., Tziris, N.E., Kaitzis, D.G., Dimitriadis, A.S., Dessiris, A.K., 2006. The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: A lymphographic study. *Anat Histol Embryol*, 35(4):228-34.

Pereira, D., Vieira, A.F., Schmitt, F., Paredes, J., Gama, A., 2013. Targeting cancer stem cells in canine mammary cancer. *ESVP/ECVP Proceedings 2012. Journal of Comparative Pathology* 148(1): 49.

Pinder, S.E., 2010. Ductal carcinoma in situ (DCIS): pathological features, differential diagnosis, prognostic factors and specimen evaluation. *Modern Pathology* 23, S8-S13.

Pinho, S.S., Matos, A.J.F., Lopes, C., Marcos, N.T., Carvalheira, J., Reis, C.A., Gartner, F., 2007. Sialyl Lewis x expression in canine malignant mammary tumours: correlation with clinicopathological features and E-Cadherin expression. *BioMed Central cancer: BMC Cancer* 7:124.

Plachot, C., Chaboub, L.S., Adissu, H.A., Wang, L., Urazaev, A., Sturgis, J., Asem, E.K., Lelievre, S.A., 2009. Factors necessary to produce basoapical polarity in human glandular epithelium formed in conventional and high-throughput three-dimensional culture: example of the breast epithelium. *BMC Biol*, 7-77.

Potapenko, I.O., Haakensen, V.D., Luders, T., Helland, A., Bukholm, I., Sorlie, T., Kristensen, V.N., Lingjaerde, O.C., Borresen-Dale, A.L. Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. *Molecular Oncology* 4, (2010): 98-118.

Prier, J., Brodey, R. Canine neoplasia: A prototype for human cancer study*. *Bulletin of the World Health Organization* 29, (1963): 331-44. Review.

Purcell, C., Norris, H., 1998. Intraductal proliferations of the breast: a review of histologic criteria for atypical intraductal hyperplasia and ductal carcinoma in situ, including apocrine and papillary lesions. *Annals of Diagnostic Pathology* 2, 135-145.

Rehm, S., Stanislaus, D.J., Williams, A.M., 2007. Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. *Birth Defects Research Part B-Developmental and Reproductive Toxicology* 80, 233-245.

Rivera, P., Melin, M., Biagi, T., Fall, T., Haggstrom, J., Lindblad-Toh, K., von Euler, H., 2009. Mammary Tumor Development in Dogs Is Associated with BRCA1 and BRCA2. *Cancer Research* 69, 8770-8774.

Rivera, P., von Euler, H., 2011. Molecular Biological Aspects on Canine and Human Mammary Tumors. *Veterinary Pathology* 48, 132-146.

Robles, S., Galanis, E., 2002. Breast cancer in Latin America and the Caribbean. *Revista Panamericana de Salud Pública* 11, 178-185.

Rosen, P., 2009. Papilloma and related benign tumors. *Rosens Breast pathology.*, 3rd edition, Lippincot, Williams & Wilkins edits., Philadelphia (USA), 101-108.

Santos, M., Marcos, R., Faustino, A.M.R., 2010. Histological Study of Canine Mammary Gland During the Oestrous Cycle. *Reproduction in Domestic Animals* 45, E146-E154.

Sassi, F., Benazzi, C., Castellani, G., Sarli, G., 2010. Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *BMC Vet Res* 6, 5.

Schneider, R., 1970. Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer* 26(2), 419-26.

Sierra, A., 2009. Animal models of breast cancer for the study of pathogenesis and therapeutic insights. *Clin Transl Oncol* 11(11), 721-7.

Sisson, S., Grossman, J.D., 2001. Anatomía de los animales domésticos, Robert Getty. Quinta edición. Ed. Elsevier Masson, S.A. Barcelona, España. Tomo 1, 2290.

Sorenmo, K., 2003. Canine mammary gland tumors. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 33, 573.

Sorenmo, K.U., Rasotto, R., Zappulli, V., Goldschmidt, M.H., 2011. Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms. *Veterinary Pathology* 48, 85-97.

Strandberg, J., Goodman, D., 1974. Animal model of human disease: canine mammary neoplasia. *The American Journal of Pathology* 75, 225.

Tsubura, A., Uehara, N., Kiyozuka, Y., Shikata, N., 2005. Dietary factors modifying breast cancer risk and relation to time of intake. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 10, 87-100.

Uva, P., Aurisicchio, L., Watters, J., Loboda, A., Kulkarni, A., Castle, J., Palombo, F., Viti, V., Mesiti, G., Zappulli, V., 2009. Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BMC Genomics* 10, 135.

Zatloukal, J., Lorenzova, J., Tichy, F., Necas, A., Kecova, H., Kohout, P., 2005. Breed and age as risk factors for canine mammary tumours. *Acta Veterinaria Brno* 74, 103-109.

2. Histología de lesiones intraepiteliales de glándula mamaria en caninas sin signo clínico alguno de tumor.

2.1 Resumen

Las lesiones intraepiteliales (LIEs) son anomalías morfológicas locales que incrementan el riesgo de cáncer. La detección temprana de cáncer de seno permite la identificación de LIEs. En las caninas se ha propuesto las LIEs como modelo comparativo con humanos. El objetivo de este trabajo fue caracterizar histológicamente las LIEs en glándulas mamarias (GM) de 50 caninas enteras, de razas con frecuente presentación de neoplasias mamarias, sin masas palpables. A 37 hembras se les tomaron biopsias de GM inguinal derecha. En las 13 restantes se tomaron todas las GM visibles postmortem (108 muestras). Las GM de biopsias no presentaron LIEs. En 19 GM (6 caninas) se observaron LIEs, siendo las más frecuentes adenosis (14GM, 4 caninas) y carcinoma ductal *in situ* (CDIS) (12GM, 3 caninas). Se encontraron LIEs de origen complejo: hiperplasia compleja y carcinoma complejo, que no habían sido descritas en patología veterinaria, pero que tienen su contraparte en tumores desarrollados. No se observó hiperplasia ductal atípica (HDA), lo que sugiere que HDA no sería una lesión previa en el desarrollo a formas malignas. Finalmente, se reitera la heterogeneidad morfológica en las GM de una misma canina, lo que reduce el eventual carácter pronóstico de las LIEs en una sola biopsia.

2.2 Abstract

Intraepithelial lesions (IELs) are local outgrowths of the canine mammary gland associated with an increased risk of developing a malignant tumor at that site. Early detection of these lesions has improved the survival rate in women. IELs have been proposed in female canine as comparative model with human. The main objective of this work was to characterize histologically IELs in mammary glands (MG) of 50 intact females without evident tumors. All dogs were from breeds with frequent presentation of mammary neoplasia. Thirty-seven canines were biopsied from right inguinal MG. In thirteen females, visible normal MG during necropsy (108 samples) were dissected. MG from biopsy had not IELs. Nineteen MG (6 dogs) had IELs, being more frequent adenosis (14MG, 4 dogs) and ductal carcinoma *in situ* (DCIS) (12MG, 3 dogs). IELs from complex origin were found: complex hyperplasia and complex carcinoma; these have not been described in veterinary pathology, but have their counterparts in developed tumors. Not atypical ductal hyperplasia (ADH) was seen, we suggest, ADH would not be a previous lesions to

develop malignant tumors. Finally, we reiterate morphological heterogeneity of MG early lesions in the same dog; thereby reducing the prognostic value of IELs in only one biopsy.

2.3 Introducción

El cáncer mamario en las mujeres ha alcanzado niveles alarmantes y se considera un problema de salud pública en Colombia y en el mundo, (Robles and Galanis, 2002; Parkin et al., 2005) es una de las primeras causas de cáncer con una incidencia de 1.15 millones de casos nuevos en el 2002, lo que representa el 23% de todos los tumores malignos. En América Latina y el Caribe, 300.000 mujeres mueren anualmente por esta enfermedad (83 muertes por día). La mortalidad por cáncer de mama en Colombia ha mostrado un aumento del 40% en las dos últimas décadas (Hernández *et al.*, 2007).

Por su alta prevalencia, las neoplasias de mama se consideran el cáncer más importante en hembras caninas (Oliveira *et al.*, 2010), representan cerca del 20% de todos los tumores (Misdorp, 2002); la mayoría son de origen epitelial y de carácter maligno (Misdorp *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2010).

Al comparar la casuística de los tumores mamarios según edad y tipo histológico entre los laboratorios de Patología Anatómica de las Facultades de Medicina Veterinaria y de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá D.C. se encontró que los carcinomas, en sus diferentes presentaciones, son los tipos más frecuentes de tumores malignos mamarios en hembras caninas y en mujeres, y al equivaler las edades en ambas especies hay tendencia a que estos tumores se presenten en etapas tardías de la vida, entre otras coincidencias (Caicedo *et al.*, 2012).

Recientemente se han demostrado coincidencias en el desarrollo temprano de las lesiones carcinomatosas más comunes en ambas especies, las denominadas lesiones intraepiteliales (LIEs) (Antuofermo *et al.*, 2007), neoplasias intraepiteliales ductales y lobulares (Galimberti *et al.*, 2013) y enfermedades de seno limitrofes “borderline breast diseases” (Masood, 2010). Posiblemente, la formación de algunos carcinomas mamarios pasa por ciertos estadios previos –LIEs- antes de la manifestación clínica de la lesión, algunos de los cuales son factores de riesgo o precursores de las patologías neoplásicas (Lopez-Garcia *et al.*, 2010).

Por estas razones y dada la complejidad biológica de estas lesiones, se desarrolló este trabajo el cual busca describir, y comparar con la literatura existente, la morfología más temprana posible del componente epitelial de los crecimientos anómalos de glándula mamaria de caninas sin signo clínico alguno de patología mamaria.

2.4 Materiales y métodos

Se adelantó un estudio descriptivo de la histología de las lesiones epiteliales intraductales e intraacinares (intralobulares, según otros autores) no invasivas de glándulas mamarias (GM) de caninas, denominadas como lesiones intraepiteliales (LIEs) en la literatura internacional (Antuofermo *et al.*, 2007; Mouser *et al.*, 2010). El estudio se

realizó en 50 hembras de las razas Poodle, mestizas o criollas, Cocker, Pastor Alemán, Pinscher, Pequines, Labrador y Doberman, que según la casuística del laboratorio de Patología Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia (LPV, UN) han demostrado una mayor prevalencia de tumores mamarios (Caicedo *et al.*, 2012). Se incluyeron hembras reproductivamente enteras, con presentación de más de un celo y sin evidencia clínica alguna de tumor mamario. Las muestras se obtuvieron de dos fuentes: 1) toma de biopsia de la glándula mamaria inguinal derecha en hembras sometidas a anestesia general para cirugía de ovario histerectomía (OVH) en el Centro de Zoonosis de la ciudad de Bogotá D.C (CZ), los controles posquirúrgicos se llevaron a cabo en el mismo CZ y posteriormente los animales entraron en el programa de adopción; y, 2) toma de tejido mamario de todas las glándulas visibles, en caninas sometidas a necropsia por razones distintas a patología mamaria de la casuística del LPV de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional (FMVZ) UN y de hembras sometidas a eutanasia en el CZ, igualmente sin signo clínico evidente de enfermedad mamaria; estos cadáveres fueron incinerados. Estos procedimientos fueron practicados por Médicos Veterinarios calificados, entre el 14 de febrero y el 14 de diciembre de 2012, luego de aprobación del Comité de Bioética de la FMVZ, UN (2011) y del concepto a favor del Tribunal de Ética Profesional COMVEZCOL (2012).

Todas las muestras fueron procesadas siguiendo los protocolos de rutina de histotecnica de fijación en formalina al 3,7%, inclusión en parafina, corte (3-4 μ m), desparafinado, hidratación y tinción con hematoxilina y eosina. Para confirmar las lesiones complejas se utilizaron anticuerpos contra miosina pesada y queratina básica 5.

El estado fisiológico del ciclo de la glándula mamaria (GM) se estableció morfológicamente siguiendo los criterios definidos por Rem *et al.* (2007), Orfanou *et al.* (2010) y Santos *et al.* (2010).

Para el diagnóstico de las LIEs se siguieron los criterios propuestos por Antuofermo *et al.* (2007), los cuales fueron establecidos a partir de la interconsulta de casos de LIEs de GM en caninas con patólogos de humanos, también se usaron revisiones de patología mamaria de caninas (Goldschmidt *et al.*, 2011) y libros recientes de patologías de seno de mujeres (Rosen, 2009; O'Malley *et al.*, 2011; Tot, 2011; Dabbs, 2012). Para las lesiones columnares se utilizó la clasificación establecida para caninas por Ferreira *et al.* (2010). Para los carcinomas la graduación se estableció principalmente por el pleomorfismo nuclear y/o presencia de mitosis, en un sistema de tres grados: bajo grado o 1, grado intermedio o 2 y alto grado o 3 (Lester *et al.*, 2009; Rosen, 2009).

2.5 Resultados

2.5.1 Prevalencia puntual de LIEs en caninas de Bogotá D.C.

50 caninas incluidas en la investigación, 37 provenían del CZ sometidas a OVH, de cada una se tomó una biopsia incisional de GM inguinal derecha. A partir de 13 cadáveres (6 provenientes del LPV, UN y 7 del CZ) se extrajeron 108 tejidos correspondientes a todas las glándulas mamarias. En total se obtuvieron 145 tejidos de ambas fuentes, los cuales fueron el objeto de estudio.

Respecto a la raza, 47 fueron hembras mestizas o criollas, una Labrador, una Poodle y una Pastor Alemán.

Se encontraron LIEs en seis de los 13 cadáveres (5 caninas de raza Mestiza y una Pastor Alemán) y de ambas fuentes (Dos de la Universidad Nacional y cuatro del CZ), mientras que en ninguna de las hembras de las que se tomó biopsia se diagnosticaron LIEs.

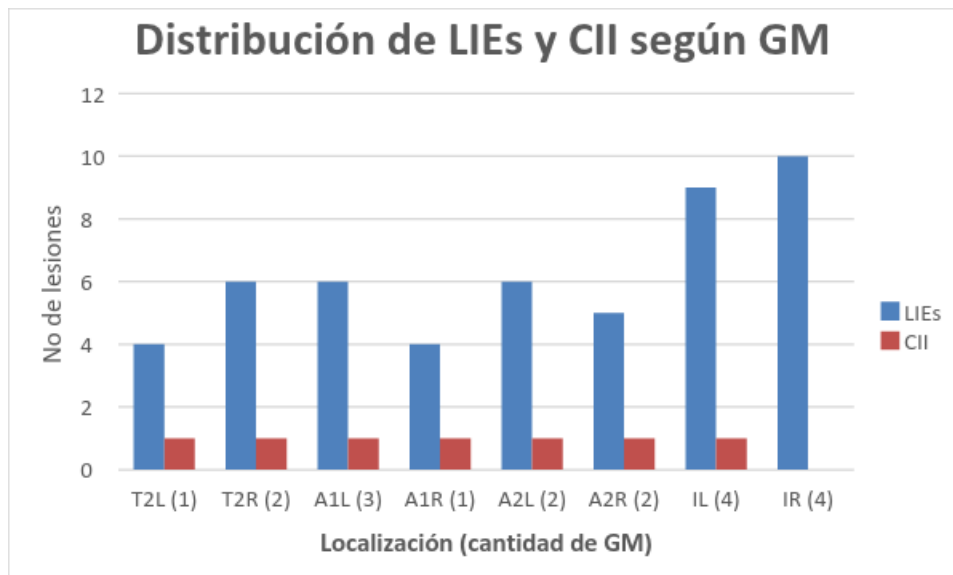
Se determinó la prevalencia puntual de las LIEs de forma separada para cada uno de los grupos experimentales debido a las características del muestreo (Granados, 1995). La prevalencia de LIEs en las caninas en las que se realizó biopsia fue del 0% (0/37), y del 46.15% (6/13) en las caninas de necropsia.

Referente al estadio reproductivo de las seis hembras en las que se encontraron LIEs: una estaba en estro, dos en diestro temprano, una en diestro tardío (gestante), una en anestro temprano, una en anestro tardío.

De las 108 GM obtenidas en el grupo de los trece animales muestreados en necropsia, solo seis hembras tuvieron lesiones en 19 GM; en ellas se diagnosticaron 50 LIEs y 7 carcinomas invasivos (Cal).

Las glándulas mamarias en las cuales se diagnosticaron LIEs y Cal se muestran en la Figura 2-1.

Figura 2-1: Localización de LIEs y Cal según glándula mamaria en 6 caninas sin signos clínicos de tumor en Bogotá D.C. Torácica 2 lado izquierdo (T2L); torácica 2 lado derecho (T2R); abdominal 1 lado izquierdo (A1L); abdominal 1 lado derecho (A1R); abdominal 2 lado izquierdo (A2L); abdominal 2 lado derecho (A2R); inguinal izquierda (IL); inguinal derecha (IR).



Se puede observar que 84% de las GM afectadas pertenecían a la región inguinal y abdominal, y solo el 16% eran de la región torácica.

2.5.2 Resultados de Hematoxilina-Eosina según tipo de LIEs

Se diagnosticaron 50 LIEs y 7 Cal en las 19 GM afectadas como se resume en la Tabla 2-1, que también muestra el número de lesiones por animal y por glándula.

Tabla 2-1: Distribución detallada según tipo de LIEs, animal y GM

INFORMACIÓN GENERAL		TIPO DE LIES								Cal
IDENTIFICACION DEL ANIMAL	GM	A	HDU	PID	HC	LCC	HLA	CIS	CaC	Cal
2	A1L	0	0	0	0	0	0	1	0	0
6	T2L	1	0	1	0	1	0	1	0	1
	T2R	1	1	0	0	0	0	1	1	1
	A1L	1	0	0	1	1	0	1	0	1
	A1R	1	0	0	0	1	0	1	1	1
	A2L	1	1	0	0	1	0	1	1	1
	A2R	1	0	0	0	0	0	1	1	1
	IL	1	0	1	0	0	0	1	1	1
	IR	1	0	1	0	0	0	1	0	0
7	T2R	0	0	0	0	0	0	1	1	0
	A1L	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	A2L	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	A2R	1	0	0	1	0	0	0	0	0
	IR	1	0	1	1	0	0	0	0	0
8	IL	1	1	0	0	0	0	1	0	0
	IR	1	1	0	0	0	0	1	0	0
16	IL	0	0	0	0	0	1	0	0	0
22	IL	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	IR	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Número Total=	57	14	5	4	4	4	1	12	6	7
Porcentaje (%)		24	9	7	7	7	2	21	11	12

Abreviaturas. A (adenosis), HDU (hiperplasia ductal usual), PID (papiloma intraductal), HC (hiperplasia compleja), LCC (lesiones de células columnares), HLA (hiperplasia lobular atípica), CIS (carcinomas in situ), CaC (carcinoma complejo), Cal (carcinoma invasivo). GM (glándula mamaria).

Las adenosis constituyeron el 24% de las LIEs, mientras que los Ca con el 21%, los CC con el 11% y los Cal con 12% combinados constituyeron el 45% de la casuística.

Adenosis: Se diagnosticaron 14 adenosis. Arquitectónica y citológicamente estas lesiones estuvieron de acuerdo a lo reportado (Antuofermo *et al.*, 2007): proliferaciones benignas de células epiteliales y mioepiteliales de los acinos glandulares (Figura 2-2).

Los acinos pueden tomar aspecto elongado y tortuoso, pero la mayoría de tuvieron lúmenes redondos, por lo general con contornos suaves no angulares (Figuras 2-3 y 2-4).

Figura 2-2: Adenosis. Lobulillo completo con proliferación benigna de las células epiteliales de los acinos delimitado por las flechas rojas. HE. 40x.

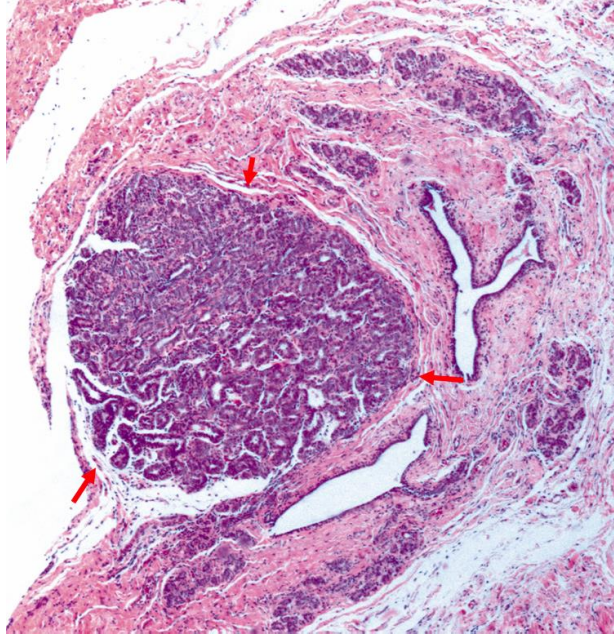


Figura 2-3: Adenosis. Se observa mayor densidad de acinos en el lobulillo afectado (A), en comparación con los acinos de los lobulillos circundantes normales (flechas verdes), pero con lúmenes dilatados. La cantidad de tejido conectivo varía en distintas regiones del lobulillo: en la parte inferior izquierda de la lesión se observa abundante tejido conectivo (TC), mientras que en otras partes en este aumento, solo se ven algunos trayectos más delgados (flecha negra), comparar con el tejido conectivo de acinos normales. HE. 40x.

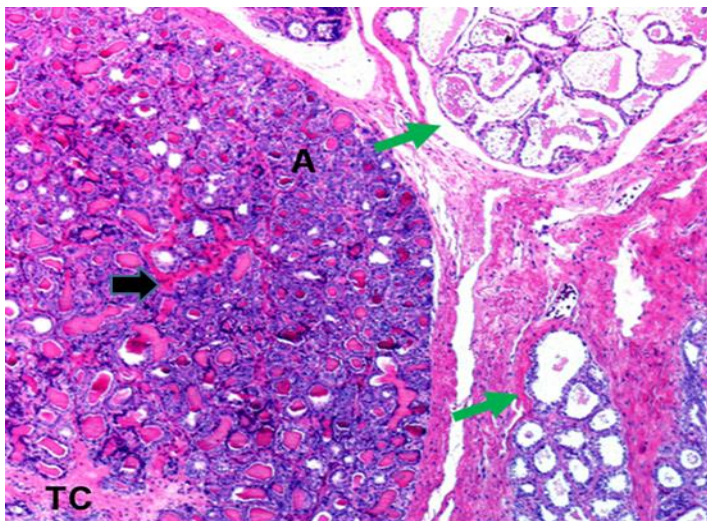
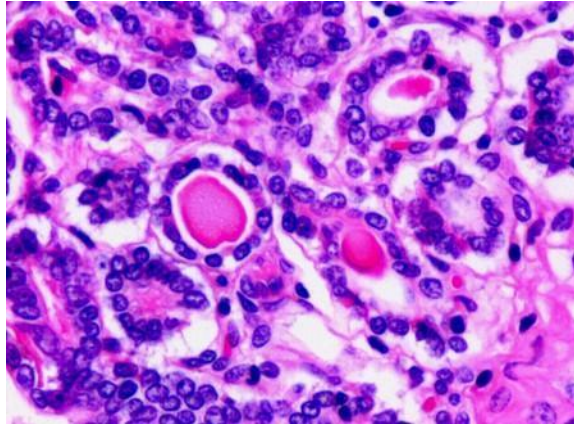


Figura 2-4: Adenosis. La mayoría de los acinos tienen lúmenes redondos u ovalados, por lo general con contornos suaves no angulares que contienen una secreción eosinofílica en la luz; los núcleos son de tamaños y formas uniformes, la cromatina es poco activa (heterocromatina), ni vesiculosa ni hiper cromática, localizada hacia la membrana; hay nucléolos pero son escasos y poco notorios. El estroma alrededor de los acinos individuales es escaso y los núcleos de las pocas células también son muy densos. HE. 400x.



Hiperplasia ductal usual (HDU): se diagnosticaron cinco de estas lesiones. La hiperplasia ductal puede estar limitada a uno o más ductos aislados entre sí, o puede involucrar múltiples grupos de ductos contiguos dentro de las ramificaciones de la unidad ducto-lobulillar. Cuantitativamente, hay un aumento en el número de células en cualquier conducto, el cual varía de un mínimo de tres capas a una proliferación que llena completamente el conducto ocluyendo su luz (Figura 2-5).

La cantidad, patrones de crecimiento y la distribución en la unidad ducto-lobulillar de las HDU son variables. Las células en hiperplasia ductal usual son heterogéneas, independiente de su cantidad. La proliferación celular a menudo tiene un aspecto sincitial porque los límites citoplasmáticos son difíciles de distinguir y hay un patrón de crecimiento que forma lúmenes irregulares, micropapilas o filas de células. El citoplasma es escaso, anfófilico o débilmente eosinófilo y homogéneo. El volumen citoplasmático de las células ductales hiperplásicas tiende a ser reducido en comparación con el de las células ductales normales. Los núcleos son redondos, ovoides o fusiformes con pleomorfismo mínimo a leve, dependiendo en parte del plano de corte. Las membranas nucleares son delicadas y el patrón de la cromatina es típicamente poco activa (heterocromatina). Los nucléolos son difíciles de percibir o discretos. Las figuras mitóticas son poco frecuentes o pueden estar ausentes (Figura 2-6).

Figura 2-5: Hiperplasia ductal usual. Múltiples unidades de proliferación en un ducto; las células epiteliales forman microproyecciones (flechas) dentro de la luz de algunos ductos con varias capas constituidas exclusivamente por epitelio sin árbol fibrovascular. La mayoría de los núcleos son de la misma forma –redondos- de tamaños casi iguales y actividad escasa de la cromatina, en la mayoría de los núcleos la cromatina esta densa en forma de heterocromatina, en pocos núcleos se ve un nucléolo escasamente evidente; el aspecto colapsable del lumen entre las proyecciones epiteliales (ya que la luz de los ductos esta pobremente definida) es característico de las HDU. Entre los ductos hay finos trayectos de tejido conectivo (flecha corta) con capilares poco notorios. HE. 100x.

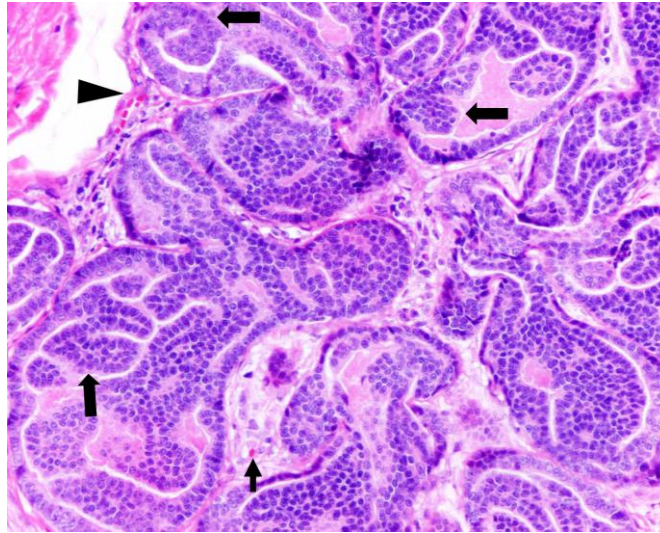
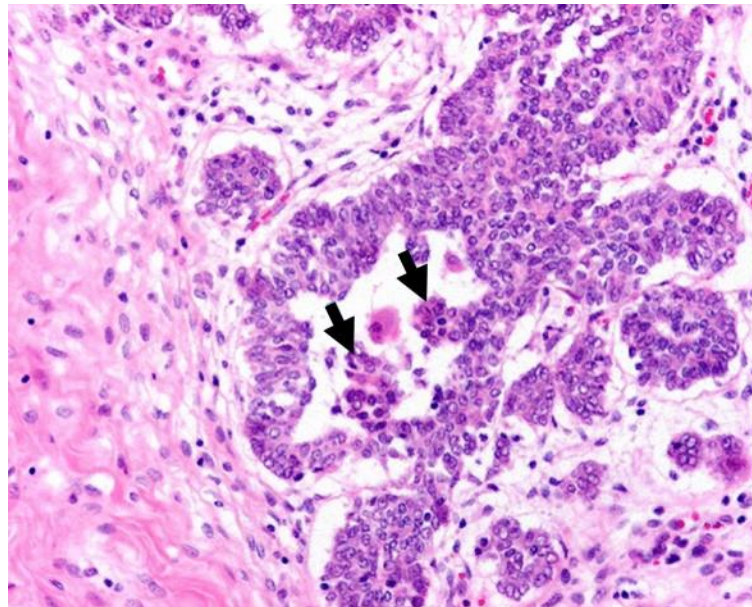


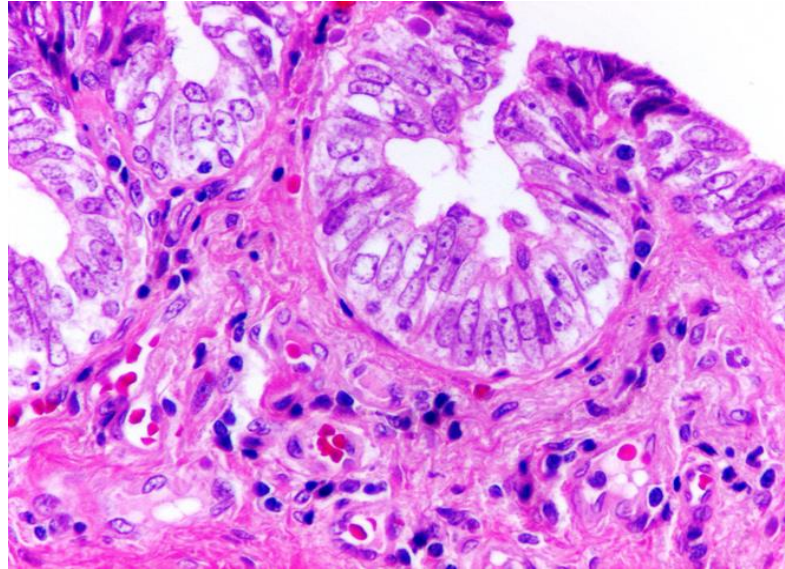
Figura 2-6: Hiperplasia ductal usual. Se observan capas de tres o más células en desorden que se sobreponen entre sí, hay pequeñas proyecciones a manera de micropapilas (flechas); los núcleos tienen leve variación en tamaño y forma, la cromatina es ligeramente vesiculosa – mayor cantidad en fase de eucromatina- pero se arregla suavemente sin formar agregados y los escasos nucléolos son discretos. El estroma es laxo y escaso, con un infiltrado leve de linfocitos y células plasmáticas. HE. 200x.



Lesión de células columnares (LCC): Se diagnosticaron cuatro lesiones de este tipo todas dentro de carcinomas ductales in situ (CDIS). Esta lesión se caracteriza por unidades ductolobulillares con grados variables de dilatación, revestidas por una o dos capas de células epiteliales columnares o cilíndricas con núcleos elongados u ovoides, que están orientados perpendiculares a la membrana basal, con cromatina vesiculosa y nucléolo (a veces dos) poco o moderadamente prominente. Las mitosis son raras. El

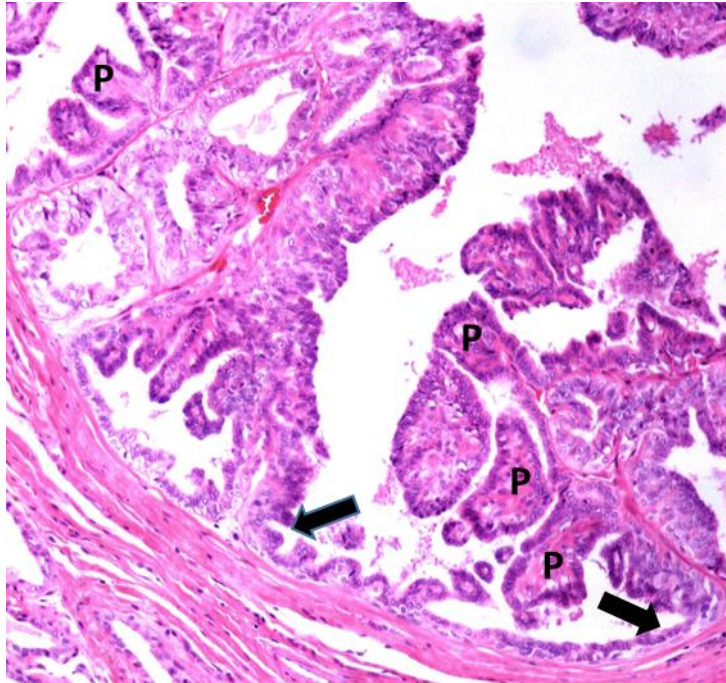
borde apical de las células forma proyecciones citoplasmáticas a manera de cúpulas de secreción («apical snouts») –secreción apocrina- y en la luz se observa secreción que puede estar calcificada (Figura 2-7).

Figura 2-7: Lesión de células columnares. Capa de células epiteliales columnares con núcleos uniformes, ovoides o alargados, perpendiculares a la membrana basal y ubicados a diferentes alturas; cromatina vesiculosa (eucromatina) y nucléolo(s) moderadamente prominente(s). Leve infiltrado disperso de leucocitos con predominio de células plasmáticas. El TC es denso. HE. 200x.



Papiloma intraductal: Se diagnosticaron cuatro papilomas intraductales (Figura 2-8), los cuales se ajustaron a lo descrito para esta lesión (Antuofermo *et al.*, 2007). Pueden ser solitarios pero también pueden aparecer como múltiples ramificaciones de un mismo ducto. La estructura básica consta de la proliferación del epitelio ductal soportado por un estroma fibrovascular el cual puede surgir de uno o de varios focos en la pared del conducto principal. Las células epiteliales son cúbicas a columnares sobrepuestas a una capa continua de células mioepiteliales elongadas con núcleos aplanados a lo largo de la membrana basal (Figura 2-9).

Figura 2-8: Papiloma intraductal. Múltiples subramificaciones papilares (P) contiguas que se desprenden de lo que en apariencia es el epitelio original (flechas) del ducto. El epitelio demuestra poca actividad y en general se puede predicar algo similar a lo descrito en HDU. El TC del estroma fibrovascular de las papilas es delgado, mientras que el que rodea el ducto es grueso y denso; los núcleos de las escasas células son densamente basofílicos (poca actividad). HE. 40x.



En los papilomas el estroma fibrovascular varía de bandas discretas delgadas que consisten en tubos capilares de paredes delgadas acompañados por fibrocitos (núcleos densamente basofílicos) y colágeno, a áreas densas de tejido conectivo. Incluidos en la matriz extracelular se pueden encontrar escasos linfocitos, macrófagos y células plasmáticas.

Los papilomas pueden ocluir la luz del ducto principal formando microlúmenes irregulares, áreas sólidas o combinaciones heterogéneas de estos dos patrones (Figura 2-10). En este estudio se observó que en la base de los papilomas se pueden encontrar múltiples acinos proliferantes (adenomas) mezclados con el árbol fibrovascular (Figura 2-11).

Figura 2-9: Papiloma intraductal. Las células epiteliales son cúbicas, un poco desordenadas en su polaridad (displasia), soportadas por un estroma fibrovascular. Este último consta de algunos núcleos densos de tejido conectivo (TC) del cual se derivan finos trayectos (flechas); los núcleos de las células son poco activos: la cromatina es densa (cabezas de flecha). HE. 200x.

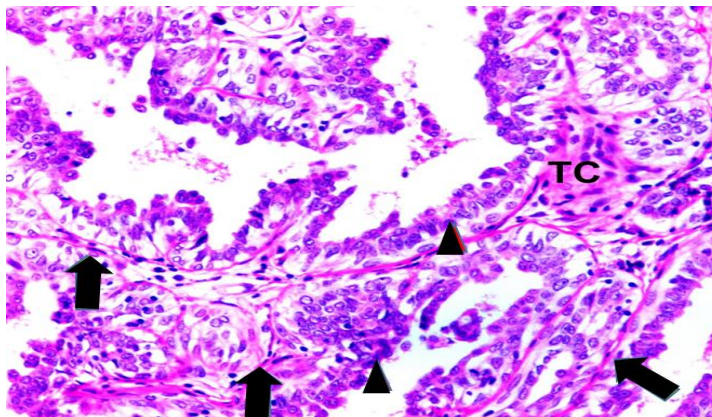


Figura 2-10: Papiloma intraductal/adenoma. En la base de la lesión (señalada con flechas) se encuentran múltiples acinos hiperplásicos mezclados con el árbol fibrovascular, el cual es más denso en la parte apical o más "papilomatosa". HE. 100x.

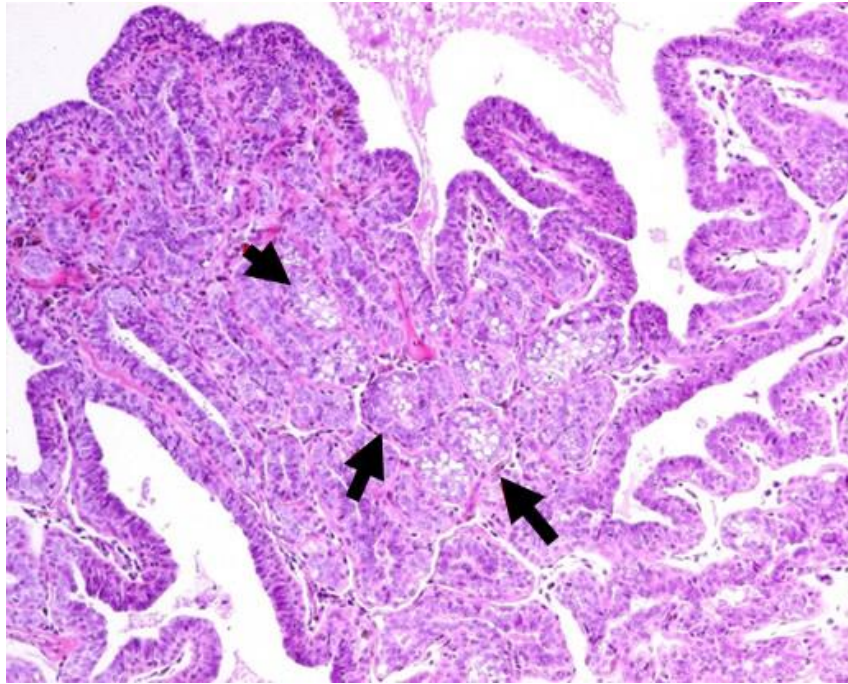
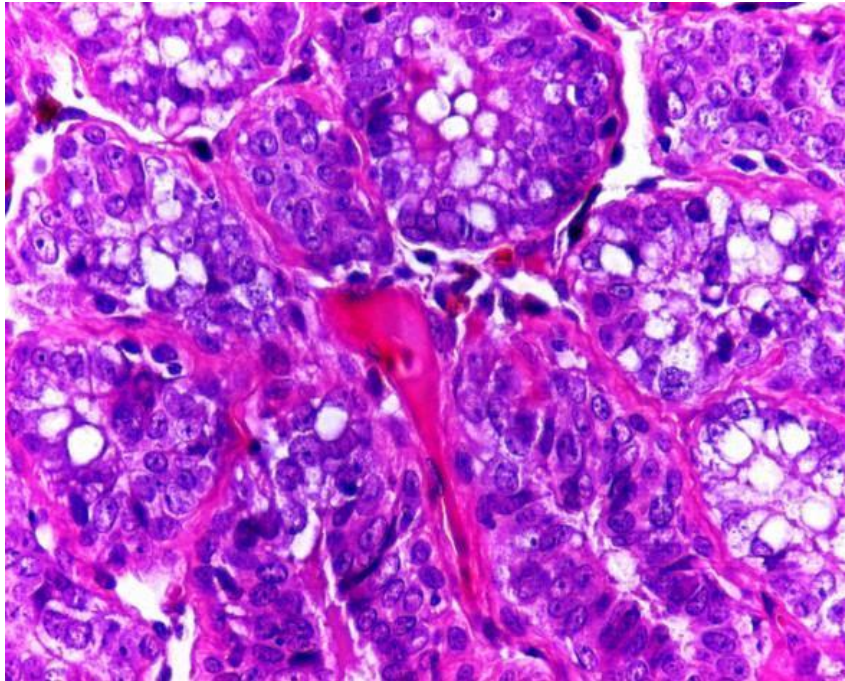
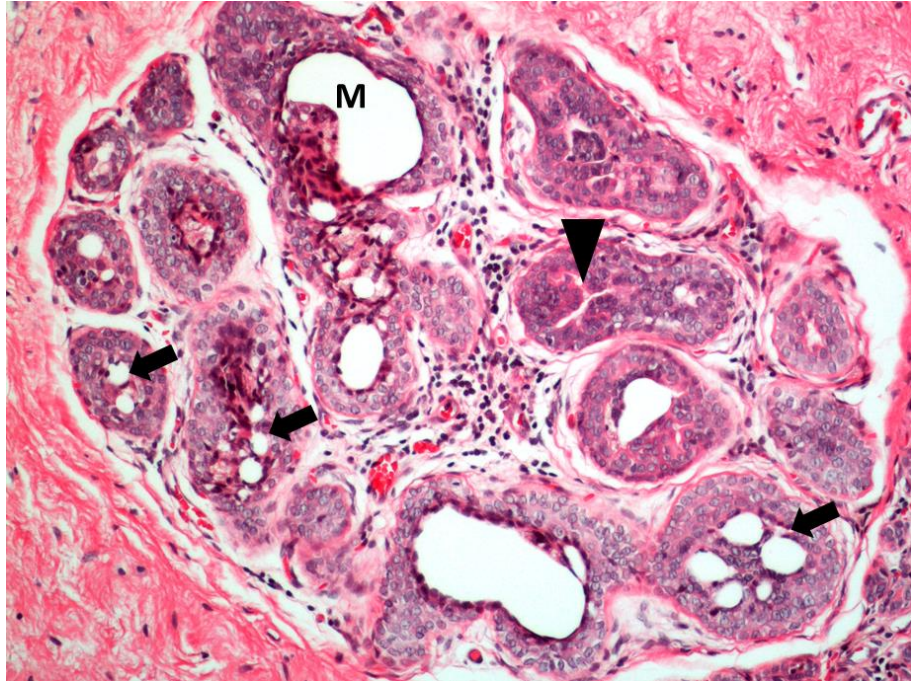


Figura 2-11: Acercamiento a la base del papiloma/adenoma. En la región de proliferación de los acinos, es evidente el incremento del número de núcleos por unidad de área y la leve displasia celular (representada por el moderado desorden en la orientación de los núcleos, ubicación a distintas alturas dentro del acino, "aglomeración" de ellos más en unos sitios del acino que en otros); con todo, los núcleos mantienen una morfología y tamaños similares a pesar de que su nucléolo es muy evidente, en la mayoría de ellos su cromatina está en forma de heterocromatina. El estroma fibrovascular es moderadamente grueso entre los acinos, los núcleos de las células del intersticio son poco activos con cromatina intensamente basofílica y algunas células con cromatina densa pueden ser linfocitos. HE. 400x.



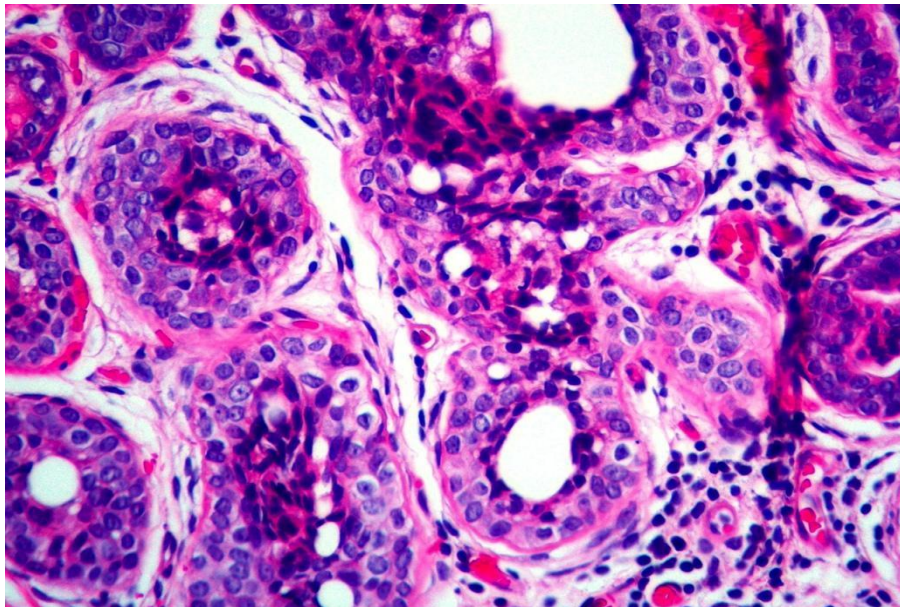
Hiperplasia lobular atípica (HLA): Se diagnosticó solo una lesión. En la HLA, la atipia puede implicar células individuales, grupos focales, o toda la población celular que llena un lobulillo de unidades túbulo-acinares de células atípicas. Aunque se parece a un Ca lobular in situ de grado bajo las células se limitan a un diámetro que no excede los dos milímetros y ocupa solamente una unidad ducto-lobulillar terminal. Las células atípicas se distribuyen formando estructuras cribiformes a manera de espacios pequeños geométricos con forma de puentes romanos o de orificios de un sacabocados y otras en forma de hendiduras irregulares “slit-like” con núcleos redondos a ovoides paralelos a los espacios y las células pierden la polaridad (Figura 2-12). En la HLA las células que proliferan tienen anisocitosis y pleomorfismo moderados (redondas, cúbicas o poligonales), y se observan varias mitosis.

Figura 2-12: Hiperplasia lobulillar atípica. Proliferación de células epiteliales que integran la unidad ducto-lobulillar, las células a veces llenan la luz de los acinos formando varias capas, y otras veces forman espacios cribiformes o de apariencia de “sacabocados” (flechas) y otros espacios luminare se arreglan a manera de hendiduras “slit-like” (cabeza de flecha) irregulares. Algunas células que se descaman con núcleos densamente cromáticos se encuentran en muerte (M) y muchos otros se disponen paralelos a la luz; los núcleos en este caso no muestran mucha variabilidad en tamaños ni formas. El tejido intersticial es laxo e infiltrado focalmente por una moderada cantidad principalmente de linfocitos. HE. 200x.



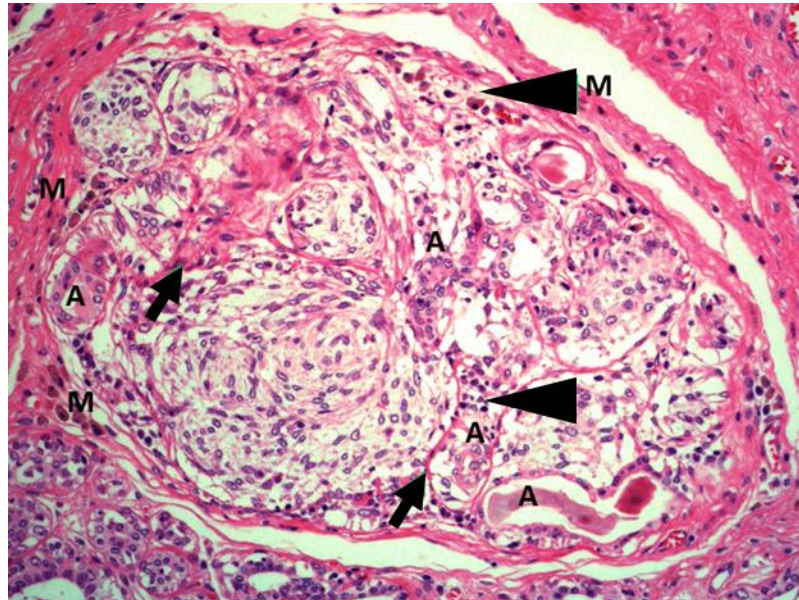
Otra característica de atipia la constituye la relación núcleo: citoplasma, la cual es aproximadamente 70-80%, la cromatina es laxa dándole al núcleo un aspecto ligeramente vesiculoso o translúcido y los nucléolos son discretos. (Figura 2-13).

Figura 2-13: Hiperplasia lobulillar atípica, detalle de la Fig. 2-12. Se aprecian mejor los detalles celulares; los núcleos son poco variables en forma, relación núcleo: citoplasma de aproximadamente 70-80%, hay varias capas de células con moderado desorden en su orientación; los nucléolos no son muy evidentes, la cromatina es moderadamente vesicular sin formar cúmulos. La actividad intersticial con laxitud de las fibras y escasa matriz, los núcleos de las células conectivas en esta región son hiper cromáticos, hay congestión e infiltrado linfoplasmocitario moderado entre los acinos. HE. 400x.



Hiperplasia compleja (HC): Se diagnosticaron 4 HC. Estas lesiones se caracterizaron por una proliferación de células de aspecto tanto mioepitelial como epitelial. Las células de aspecto mioepitelial mostraron su morfología típica: fusiformes a estrelladas con patrón de crecimiento expansivo, bien delimitado, que en pequeño aumento tiene aspecto "mixoide" claro y laxo, formando agregados o grupos de células que comprimen a las escasas células epiteliales en su interior. Las células mioepiteliales muestran un pleomorfismo de leve a moderado, no se distinguen los límites de las membranas citoplasmáticas, los citoplasmas son translúcidos, los núcleos tienen cromatina vesiculosa y nucléolos poco visibles (Figura 2-14), las células epiteliales se agrupan en acinos pero pueden estar comprimidas por las mioepiteliales.

Figura 2-14: Hiperplasia compleja. Proliferación de células mioepiteliales formando lobulillos de distinto tamaño. Esta lesión se caracteriza por el aspecto "mixoide" claro y laxo, células fusiformes o estrelladas con citoplasma claro y límites imprecisos formando una red. Los núcleos varían de redondeados a ligeramente ovalados y eventualmente fusiformes, en su mayoría tienen cromatina vesiculosa y nucléolo poco notorio. Algunos acinos de células epiteliales están atrapados (A) entre los lobulillos de las mioepiteliales. Dentro de la lesión el estroma es escaso, y forma un soporte fibrovascular (flechas); hay escasos y leves focos de infiltración linfocitaria (cabeza de flecha grande) y algunos macrófagos con pigmento en la periferia (cabeza de flecha y M). El estroma es denso en la periferia de la lesión. HE. 200x.



Esta lesión se marcó con IHQ, y se observó que la expresión de la miosina pesada dentro de la hiperplasia es menor que en las células mioepiteliales de los acinos vecinos (Figura 2-15). Igualmente, se hizo inmunomarcación para queratina básica 5 que mostró que las células epiteliales se tienden a agrupar en los bordes de los lúmenes microscópicos de la lesión (Figura 2-16).

Figura 2-15: Hiperplasia compleja. Las células mioepiteliales tienen marcación positiva lineal multifocal y en forma de delgados trayectos (flechas) para la cadena pesada de la miosina; es evidente que la expresión de esta molécula es menor tanto en extensión como en intensidad dentro de la lesión frente a los acinos vecinos "normales" (cabezas de flecha). IHQ miosina pesada. 100x.

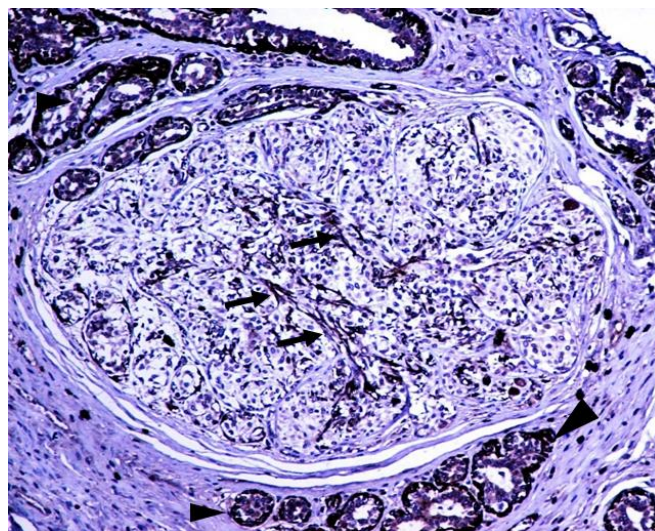
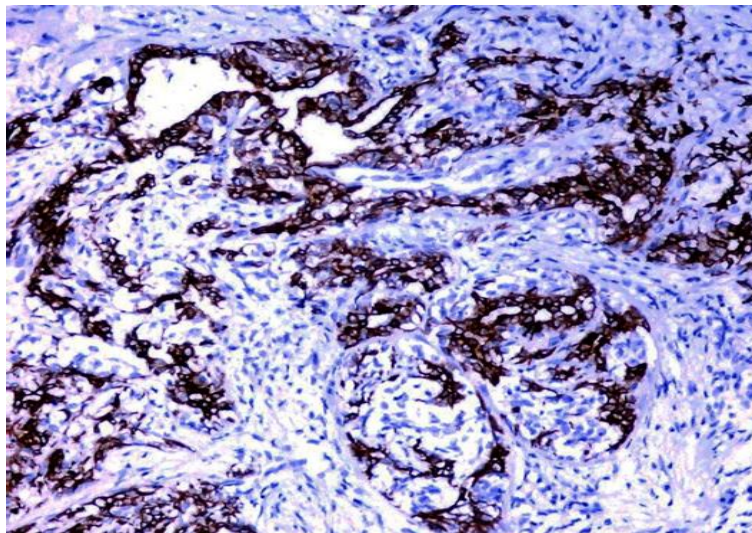


Figura 2-16: Hiperplasia compleja. Las células epiteliales tienen marcación positiva a queratina básica 5. Esta disposición de la marcación complementa en buena parte la distribución de la marcación de la figura anterior, en la cual los acinos son distorsionados y sus lúmenes se ven disminuidos por la compresión de las células mioepiteliales. IHQ queratina básica 5. 100x.



Carcinomas (Ca): en 12 glándulas mamarias se diagnosticaron carcinomas de dos tipos: *Carcinoma ductal in situ* (CDIS) y *Carcinoma lobular o lobulillar in situ* (CLIS). Dentro de cada GM se hizo un conteo de estas lesiones para además describir cada uno de sus diferentes patrones, en total se diagnosticaron 42 lesiones de este tipo. Estas alteraciones variaron desde grado nuclear bajo hasta alto. En la Tabla 2-2 se resumen los subtipos según arreglo arquitectónico y grado nuclear.

Tabla 2-2: Frecuencia de presentación de los subtipos arquitectónicos de CDIS y de CLIS en GM de caninas y su graduación (Antuofermo et al., 2007; Rosen, 2009; Goldschmidt et al., 2011).

DIAGNÓSTICO	N° LESIONES (n♀)	N° CASOS	GRADO
CLIS	17 (2)	7	I
		9	II
		1	III
CDIS PAPILAR	7 (2)	0	I
		5	II
		2	III
CDIS MICROPAPILAR	8 (2)	5	I
		2	II
		1	III
CDIS SOLIDO	5 (1)	1	I
		2	II
		2	III

CDIS COMEDOCARCINOM A	5 (2)	0	I
		0	II
		5	III

Grado. Bajo (I), intermedio, (II) y alto (III). n♀: Número de hembras con esta lesión. N° de lesiones: número de lesiones en total.

Carcinoma lobular in situ (CLIS): se diagnosticaron 17 de estas lesiones. Se caracterizan por la proliferación de células epiteliales en los acinos y ductos terminales de los lobulillos mamarios, estos crecimientos están distanciados de los ductos interlobulares, aunque pueden comprometer ductos intralobulares. Los acinos y los ductos están revestidos por varias capas de células con pleomorfismo leve o moderado. El grado nuclear fue en la mayoría intermedio o bajo, solo se presentó un caso con alto grado nuclear. El estroma que rodea estos túbulos puede ser escaso o mostrar fibrosis moderada (Figuras 2-17 - 2-19).

Figura 2-17: Carcinoma lobular in situ, grado intermedio-“sick lobe”. Es evidente la mayor densidad celular y nuclear (mayor basofilia) de los acinos carcinomatosos –la mayor parte del cuadrante superior izquierdo (Flechas), inferior izquierda y en la parte de izquierda central - frente a algunos acinos todavía de apariencia normal (N)) en el cuadrante intermedio derecho; otros lobulillos con apariencia normal (n). La proliferación se da en el área que corresponde a los acinos; a primera vista no hay compromiso de los ductos interlobulares (D). Entre los acinos afectados se encuentra leve cantidad de tejido conectivo denso, el cual es más abundante entre lobulillos. Es de resaltar el origen “casi espontáneo” de la parte carcinomatosa frente a la parte de todavía de apariencia “normal” HE. 40x.

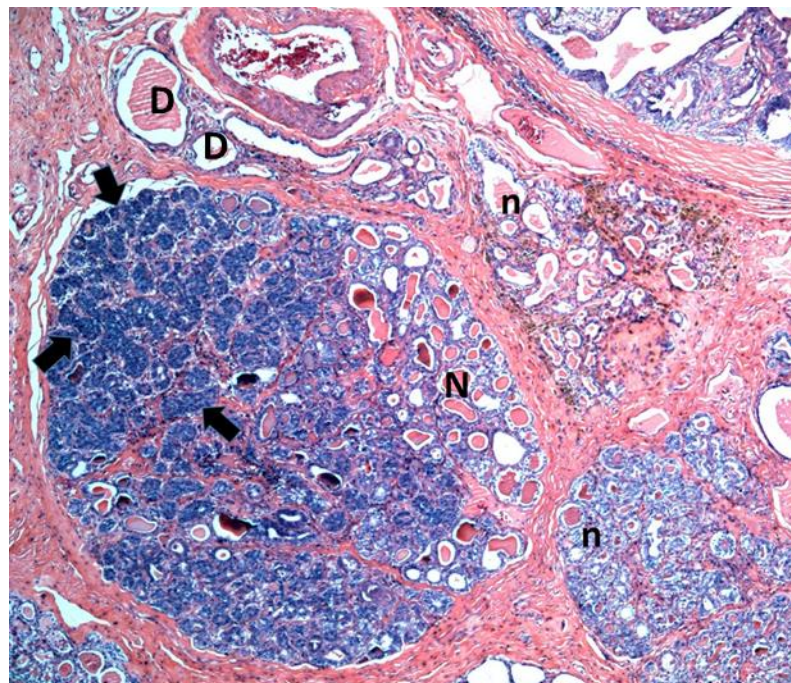


Figura 2-18: Carcinoma lobular in situ grado intermedio, “sick-lobe”, aproximación de la figura anterior en cuadrante superior izquierdo. Se resalta la displasia -orientación desordenada de las células más evidente por los núcleos-, núcleos de diferentes tamaños (algunos núcleos alcanzan entre 2 a 3 veces el tamaño de núcleos de los acinos vecinos todavía aparentemente sanos (N); la cromatina es laxa – menos intensa que la de los núcleos normales, algunos núcleos con 2 nucléolos prominentes; algunas células de aspecto maligno se desprenden del conjunto del revestimiento acinar. Se debe destacar el infiltrado mixto de linfocitos, plasmáticas particularmente en el “frente de avance” de la lesión maligna; también hay macrófagos algunos con pigmentos. Se aprecia de mejor manera la transición nítida de la parte carcinomatosa de la de apariencia normal, separadas casi que exclusivamente por una banda delgada de leucocitos (L) sin evidencias de transición morfológica alguna. HE. 200x.

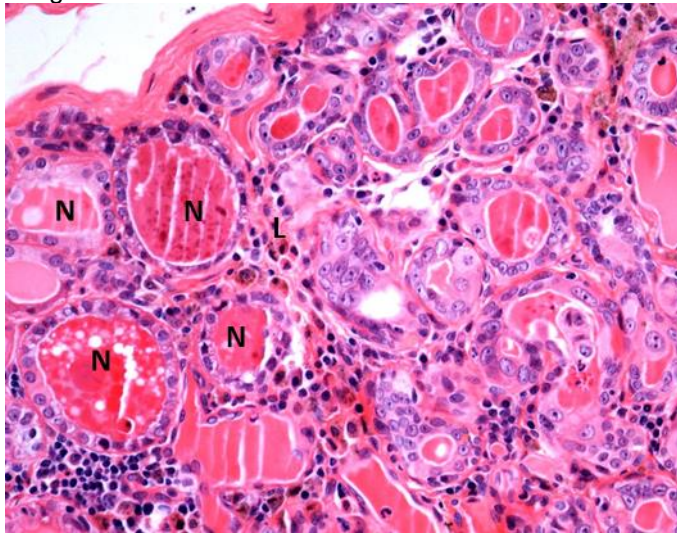
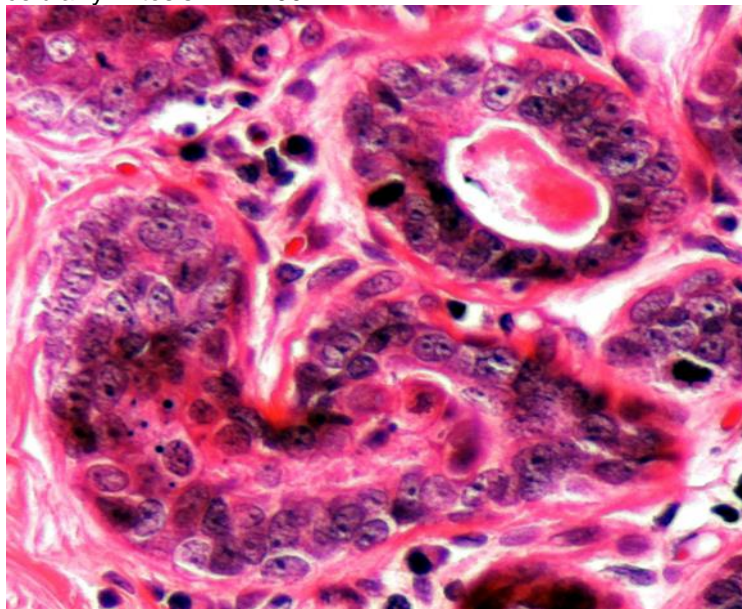


Figura 2-19: Carcinoma lobular in situ alto grado. Pleomorfismo celular moderado, núcleos prominentes (aproximadamente 2 a 3 veces el tamaño de un linfocito), nucléolos prominentes y múltiples, muerte celular y mitosis. HE. 400x.



Carcinoma ductal papilar in situ: se diagnosticaron siete de ellos. Resulta del crecimiento de las células epiteliales de los ductos intra e interlobulillares que se proyectan hacia la luz soportados en tallos fibrovasculares de grosor variable. Están en el interior de un conducto dilatado y se unen a menudo a más de un sitio de la pared o pueden surgir varios de puntos distintos del epitelio ductal al igual que en el caso de los papilomas benignos. El grado nuclear en la mayoría fue intermedio (n=5) y alto (n=2) (Figuras 2-20 y 2-21).

Figura 2-20: Carcinoma ductal papilar in situ, grado intermedio. La luz del ducto esta dilatada, las papilas están soportadas por un estroma fibrovascular moderado (Flecha), el epitelio muestra displasia, núcleos de cromatina vesiculosa con nucléolos prominentes, las células más superficiales tienen citoplasmas más intensos y grupos de células en proceso de muerte que se descaman a la luz. HE. 200x.

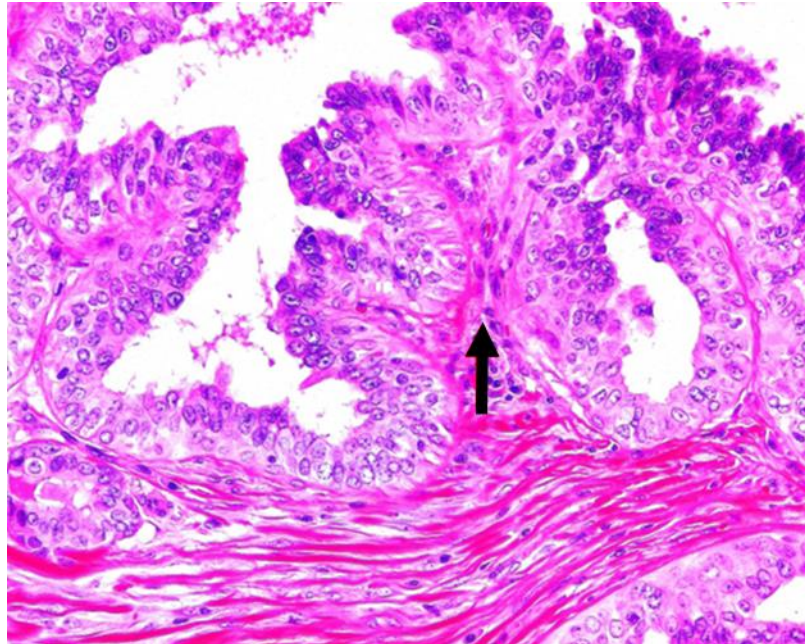
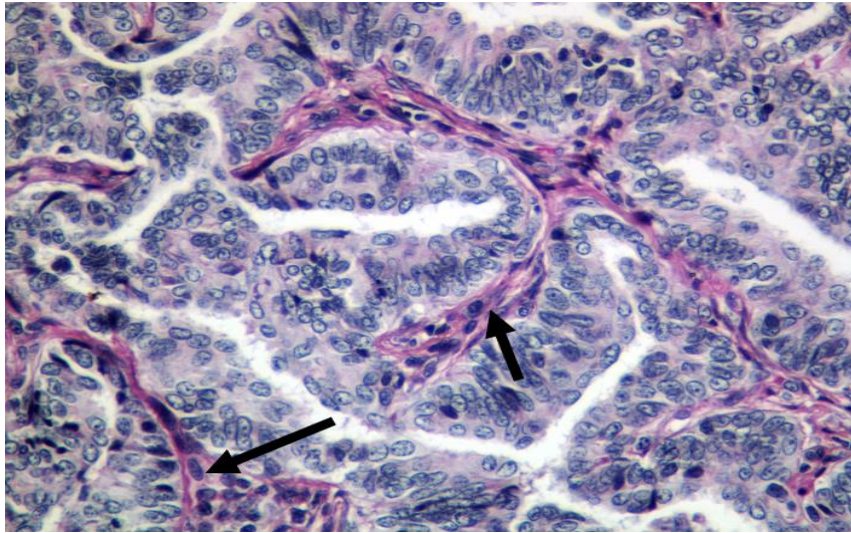
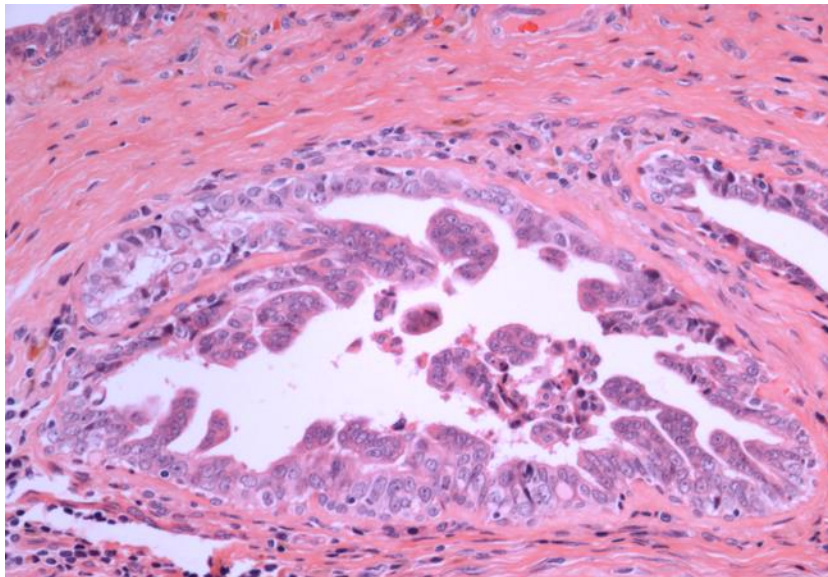


Figura 2-21: Carcinoma ductal papilar in situ, grado bajo. Varias capas de células epiteliales se sobreponen entre sí en desorden (displasia), los núcleos también se amontonan desordenadamente y se proyectan en distintas direcciones, algunos francamente horizontales transversales a los de orientación perpendicular; en la mayoría de núcleos la cromatina es laxa (vesiculosa, en fase de eucromatina) y los nucléolos son discretos. El tallo fibrovascular es más grueso que en el caso del papiloma intraductal (comparar Figura 2-8), con núcleos fusiformes intensamente teñidos (Flechas) PAS.200x.



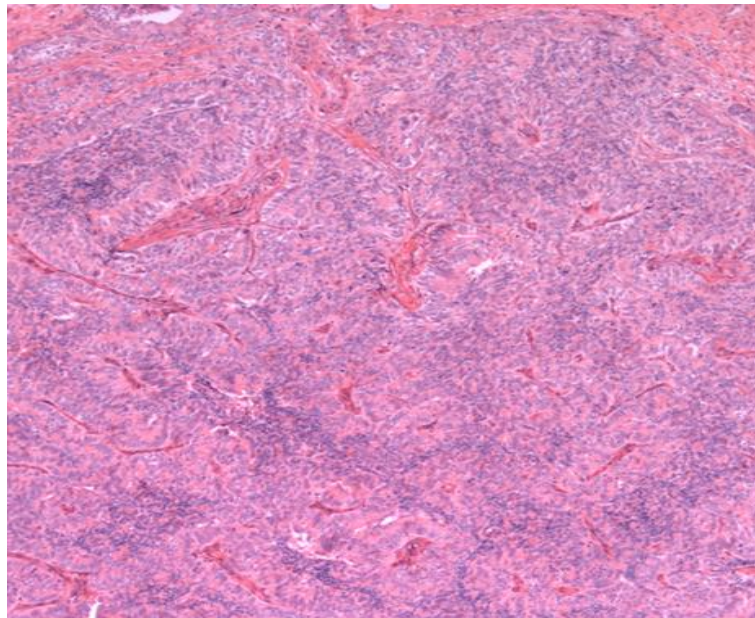
Carcinoma ductal micropapilar in situ: se diagnosticaron ocho de estas alteraciones. El CDIS micropapilar dentro del ducto tiende a ser multifocal. Consta de conductos revestidos por capas de células epiteliales que dan lugar a micropapilas que se proyectan al lumen del conducto sin un estroma o tallo fibrovascular que las soporte y las células son relativamente uniformes (Figuras 2-22). Predominaron los grados nucleares bajos (63%) e intermedios (25%). Una de estas lesiones presentó diferenciación escamosa (láminas de queratina con células indiferenciadas).

Figura 2-22: Carcinoma ductal micropapilar in situ, bajo grado. Un ducto dilatado con proyecciones de células epiteliales que forman micropapilas y se orientan en distintas direcciones, sin un estroma que las soporte. El estroma periductal muestra severo aumento del colágeno. HE. 100x.



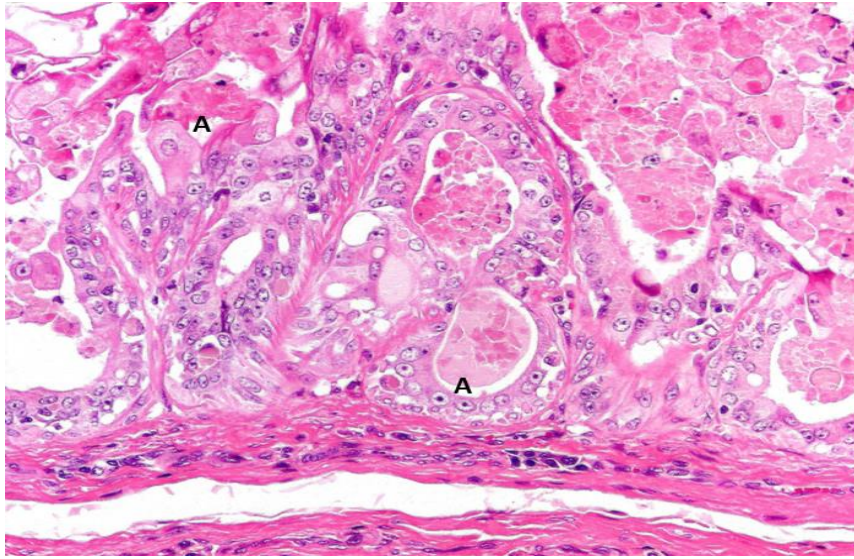
Carcinoma ductal in situ sólido: se diagnosticaron cinco. Está formado por células epiteliales que llenan la mayor parte o la totalidad de la luz de los conductos y acinos sin dejar microlúmenes o estructuras papilares. Hay muerte celular leve multifocal. Los núcleos mostraron un grado alto (40%), intermedio (40%) y 20% fueron de bajo grado (Figura 2-23).

Figura 2-23: Carcinoma ductal in situ sólido de grado bajo. Las células ocupan totalmente la luz de los ductos, muestran severo desorden en sus direcciones y se amontonan irregularmente en algunos focos, el pleomorfismo es moderado. HE. 4x.



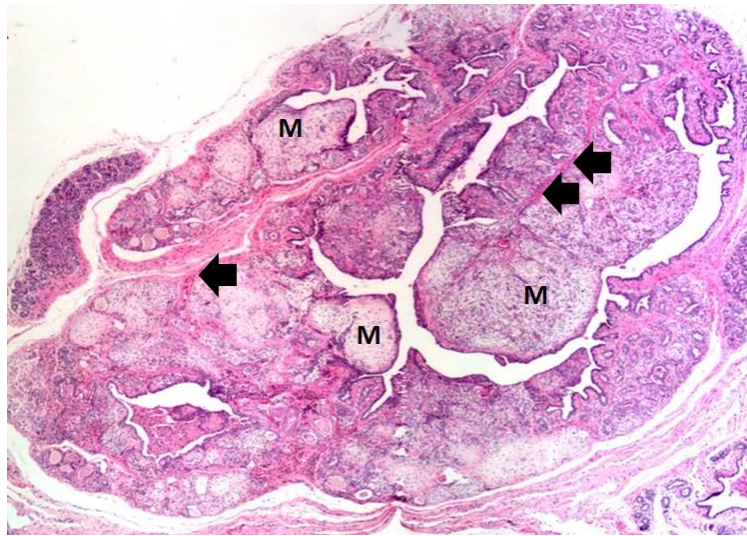
Carcinoma ductal in situ Comedocarcinoma: se diagnosticaron cinco lesiones de este tipo. Se caracteriza por un patrón de crecimiento en el que hay células epiteliales necróticas en el centro de los conductos involucrados y las células viables circundantes tienen citoplasmas que pueden contener vacuolas y varían de tonalidad (translúcidos, rosa pálido o hiper cromáticos eosinofílicos). Los núcleos además de disponerse en distintas direcciones están a diferentes alturas dentro de la capa epitelial, el pleomorfismo es moderado a severo y muestran un grado nuclear III (100%). El núcleo de las células afectadas es dos o más veces mayor que el núcleo de las células normales vecinas; los nucléolos son claramente evidentes. Las mitosis son típicamente frecuentes (Figuras 2-24).

Figura 2-24: Carcinoma ductal in situ comedocarcinoma, grado alto. En los citoplasmas de las células descamadas hay cúmulos de proteína. Los núcleos son bastante grandes con moderado desorden en su orientación y altura dentro de la capa epitelial; cromatina severa/ vesiculosa, la mayor parte de los nucléolos son muy evidentes; las células muertas se descaman al lumen ductal; hay células epiteliales atípicas (A). PAS. 200x.



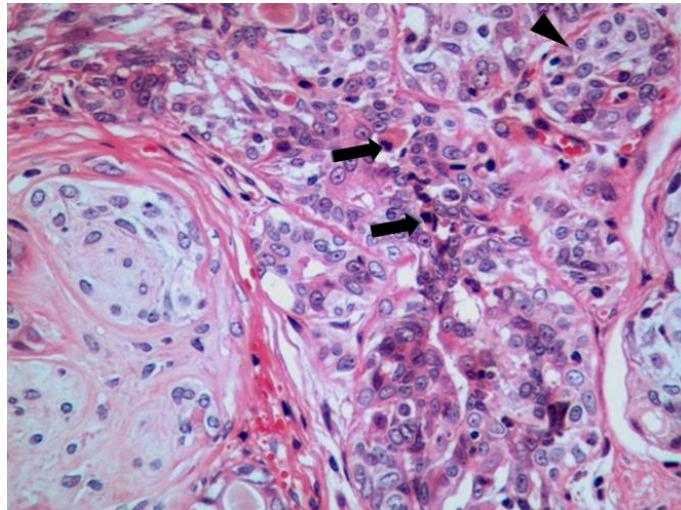
Carcinoma complejo: se diagnosticaron seis lesiones de este tipo caracterizadas por múltiples focos de proliferación de células epiteliales malignas y mioepiteliales benignas. El componente epitelial tuvo un comportamiento invasivo. El componente mioepitelial mostró un patrón de crecimiento expansivo y un arreglo sólido o papilar intraductal con aspecto “mixoide” claro, este último se arregló con formación de varios núcleos o agregados celulares con citoplasmas claros a manera de nódulos, que conformaron la mayor parte de la lesión, la parte carcinomatosa fue menos voluminosa (Figura 2-25).

Figura 2-25: Carcinoma complejo intraductal de arreglo papilar. Múltiples focos de proliferación de células epiteliales y mioepiteliales que se proyectan dentro de un ducto, estas últimas tienen un patrón de crecimiento expansivo, arreglo sólido con aspecto “mixoide” (M) claro. Hay pocos focos de crecimiento epitelial (Cabeza de flecha). Existe un abundante soporte de tejido conectivo que se ramifica principalmente acompañando a la parte mioepitelial (Flechas). HE. 20x.



El fenotipo maligno de las células epiteliales solo pudo ser apreciado en el mayor aumento (Figura 2-26). Estas células se caracterizaron por un pleomorfismo moderado y citoplasmas claros o eosinofílicos pálidos con límites poco distinguibles. Los núcleos eran redondos a ovalados con una variación de tamaño y forma moderados. La cromatina por lo general era vesiculosa, con tendencia a marginarse hacia la membrana nuclear y en pocas ocasiones se organizó en grumos pequeños. Casi todas las células mostraron un nucléolo notorio, y algunas células al azar presentaron muerte en el interior de la lesión (Figura 2-26).

Figura 2-26: Carcinoma complejo detalle de figura 2-25. Células epiteliales que se encuentran desordenadas arquitectónicamente, en algunos acinos forman varias capas (Cabeza de flecha), hay abundantes células muertas (Flechas); los núcleos apuntan igualmente en distintas direcciones, muestran un pleomorfismo y anisocariosis moderadas; la cromatina es laxa con mayor concentración hacia la membrana, los nucléolos son moderadamente evidentes. HE. 400x.



Carcinoma invasivo: se diagnosticaron siete Cal. Las lesiones todavía eran pequeñas, completamente delimitables en un campo de 40x con diferentes patrones arquitectónicos como formación de ductos y áreas sólidas, entre otras. Las células mostraron pleomorfismo moderado a severo, las que estaban invadiendo el estroma tenían aspecto fusiforme con núcleos fusiformes (Figura 2-27). El pleomorfismo nuclear era moderado, la cromatina vesiculosa, y con abundantes mitosis, algunas de ellas atípicas. Se observaron múltiples focos de necrosis, adicionalmente alrededor de la neoplasia se encontró infiltrado mixto severo con predominio de linfocitos, plasmáticas, macrófagos (Figura 2-27 y 2-28).

Figura 2-27: Carcinoma invasivo. Las células tumorales rompen la membrana basal (Flechas) e invaden el estroma anexo, el revestimiento del deforme acino tiene varias capas de células epiteliales con moderada displasia, de límites imprecisos; núcleos con pleomorfismo moderado, en tamaño y forma igualmente en moderado desorden; nucléolos escasamente visibles. El grupo de células que parece “fluir” de la parte superior del acino hacia el inferior –justo en nivel con el sitio de la ruptura de la MB- tiene una ligera apariencia fusiforme (Cabezas de flechas) En la periferia de la lesión se aprecia un infiltrado linfoplasmocitario severo. HE. 200x.

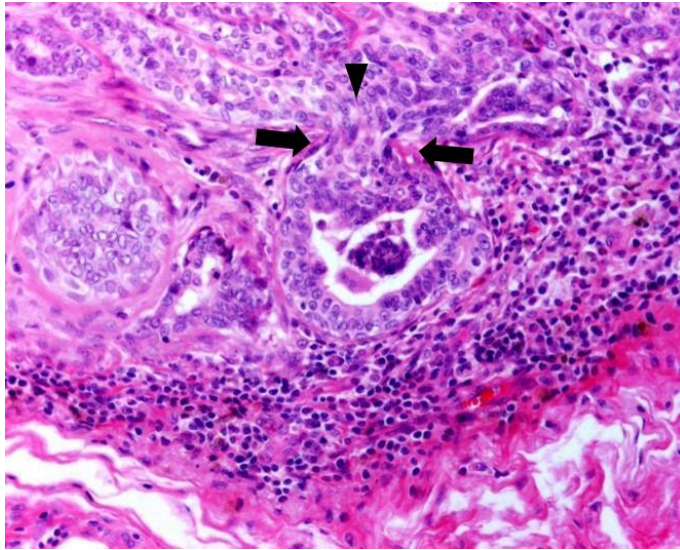
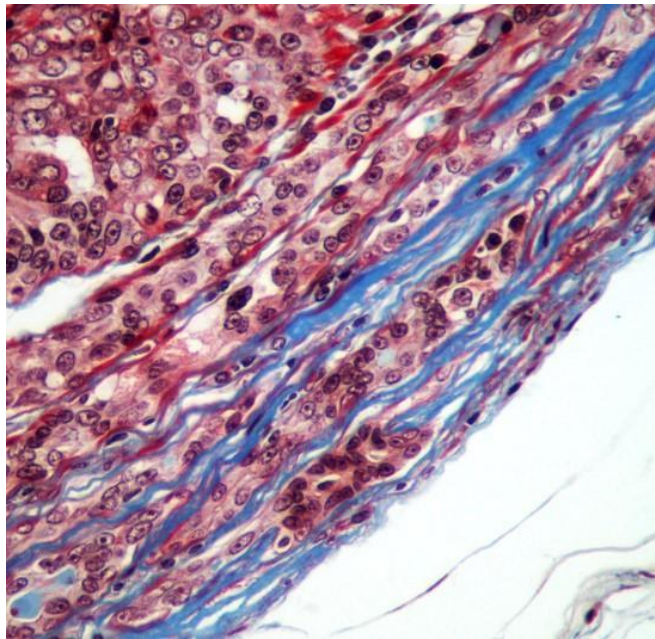


Figura 2-28: Carcinoma invasivo. La lesión tiene arreglo sólido y se aprecia cómo las células epiteliales invaden en fila el estroma. Tricrómica de Masson. 400x.



Todas las lesiones pre e invasivas tenían disminución o pérdida de las células mioepiteliales al marcarlas con IHQ de miosina pesada.

2.6 Discusión

La similitud de los tumores mamarios de la especie canina y la humana en aspectos como su aparente dependencia de factores hormonales, la coincidencia de la frecuencia de presentación a edades biológicas similares, las semejanzas histológicas, parecen justificar la utilización de algunas de las neoplasias caninas como modelo de investigación en distintos aspectos como la biología, la epidemiología, la terapéutica, etc. con aplicación a la mujer y por esto es indicado llevar a cabo investigaciones comparadas (Antuofermo et al., 2007; Cadieu and Ostrander, 2007; Uva et al., 2009). Más recientemente, con la introducción de los métodos tempranos –mamografía- de diagnóstico de las lesiones tempranas de la GM, se ha demostrado su importancia en la prevención y disminución de la mortalidad de los tumores mamarios en la mujer; en el mismo sentido, estudios recientes de LIEs en perras (Antuofermo et al., 2007; Mouser et al., 2010) han extendido las observaciones de coincidencias morfológicas de estas lesiones con las mujeres, lo que hace aún más útil la implementación de esta especie como modelo de investigación para el caso humano (Grizzle et al., 2010).

Los objetivos de este estudio fueron: 1) Determinar la prevalencia puntual de las lesiones mamarias tempranas en una población definida de caninas sin signos clínicos de tumor mamario. 2) Clasificar por hematoxilina-eosina (H&E) las lesiones mamarias tempranas en dicha especie. 3) Determinar si la clasificación actual es la definitiva, y 4) Comparar estos hallazgos con estudios similares en mujeres.

En este estudio no se detectaron LIEs en las caninas del CZ a las cuales se les tomó una biopsia incisional de la glándula inguinal derecha, ubicación que se reporta como la más frecuente en esta especie, hallazgo que se ratifica en este trabajo en las hembras obtenidas en necropsia en las que estas lesiones tuvieron mayor prevalencia en la citada localización; este hecho señala la inconveniencia de la biopsia incisional como la practicada en esta investigación como posible método diagnóstico de lesiones tempranas.

Pero como se deduce de la amplia diversidad morfológica de LIEs en este trabajo así como de la multifocalidad dentro y entre GM estas lesiones, se debe entender que aun las biopsias excisionales estarán sometidas a las mismas imprecisiones diagnósticas que las incisionales. Para evitar estos sesgos, parece adecuado recomendar que para estudios de investigación como el acá adelantado como para la práctica clínica, la toma de muestras debiera estar siempre acompañada de imágenes diagnósticas de todas las GM de cada individuo (Mohammed et al., 2011). Esto es importante ya que agrega más criterios a tener en cuenta para hacer procedimientos estandarizados de estudios pronósticos de esta enfermedad en caninas (Matos *et al.*, 2012).

La prevalencia por histopatología de las LIEs en caninas de las cuales se tomaron todas las GM post mortem fue de 46.15% similar a lo descrito por Warner (1977) y Mouser et al. (2010), esto indica que aproximadamente una de cada dos caninas tiene por lo menos una LIEs y que de este porcentaje a su vez el 45,6% de ellas tienen una apariencia maligna aunque todavía no invasiva (CIS) o abiertamente invasiva; estos datos concuerdan con los reportados por distintos autores para tumores clínicamente evidentes de carácter maligno (Sorenmo, 2003), pero no concuerda la relación de benignos vs malignos con los datos del estudio de Mouser et al. (2010) en el que un porcentaje

bastante mayor de las lesiones era benigno. La divergencia entre el último estudio y este trabajo eventualmente pudiera explicarse con base en las razas tomadas en cada uno de ellos; mientras que en el caso de los citados autores las caninas fueron en su mayoría coonhounds y foxhounds las cuales no se reportan como de alta frecuencia de presentación de tumores mamarios, en nuestro caso, se privilegiaron razas con alta frecuencia de presentación en nuestro medio y en otros lugares. Estos resultados podrían sugerir que además de diferencias de razas, la morfología de las LIEs pudiera ser un factor pronóstico para el desarrollo de tumores. Al igual que en el caso de Antuofermo et al. (2007) y de Mouser et al. (2010), también se comprobó en esta investigación que una GM puede tener más de un tipo de LIE (Tabla 2-1).

Una vez más, se ratifica la predilección de las caninas mestizas en nuestro medio a sufrir neoplasias mamarias (Caicedo *et al.*, 2012); fueron hembras de esta condición racial las que tuvieron mayor cantidad de LIEs en contraste con otros estudios en los que hembras de razas puras parecen tener mayor predisposición a estas patologías (Sorenmo et al., 2011); si bien los hallazgos de esta investigación podrían sugerir que la presentación de tumores no necesariamente está relacionada con la pureza de la raza, también se han informado diferencias significativas en la frecuencia de presentación del tumor mamario en caninas de razas puras, en especial la Shih Tzu que sufren tumores mamarios malignos en edades jóvenes y sobreexpresan BRCA1, un gen que participa en la carcinogénesis del cáncer de seno y de los tumores mamarios, frente a razas como Maltes, Yorkshire terrier y Poodle que aunque sufren el cáncer no sobreexpresan BRCA1 (Im *et al.*, 2013). Es pertinente la pregunta de si las diferencias entre estudios respecto de las razas se deben a sesgos en la forma de muestreo o en verdad son reales, o también si se podría sugerir que en caninas hay factores de riesgo genético y hormonales para la presentación de estas neoplasias similar a lo descrito en mujeres (Dabbs, 2012).

Respecto de la clasificación de las LIEs en mujeres existe considerable desacuerdo de los patólogos de humanos según opinión de Antuofermo et al. (2007) y Masood and Rosa. (2011). En veterinaria el consenso es aún menor y aunque las LIEs han sido reportadas y se han clasificado de acuerdo con los criterios utilizados por patólogos de humanos, hay pocos estudios que se ocupen de las LIES de caninas o que comparen estas lesiones con las de humanos (Donnay et al., 1996; Mouser et al., 2010; Mohammed et al., 2011); aún más, salvo los estudios de Mouser et al. (2010) en el que ninguna de las caninas tenía signos y el de Mohammed et al. (2011) en el que algunas de las hembras muestreadas no tenían tumores mamarios, los otros estudios han sido hecho con animales que ya presentaban tumores clínicos; obviamente esto dificulta las comparaciones.

Con base en los resultados de este capítulo y los del capítulo cuatro, en nuestra opinión se debiera revisar o por lo menos precisar de mejor forma el término de LIEs para estas alteraciones; consideramos que se debieran incluir los siguientes criterios para valorar tales lesiones: 1. Que no especifica el origen anatómico de la lesión (Ductal o lobular). 2. Que son arreglos epiteliales que no necesariamente se manifiestan clínicamente o progresan a cáncer. 3. Al emplear el término intraepitelial sugiere que es independiente de su entorno inmediato como las células mioepiteliales o de su microambiente (como se ha dado en llamar al estroma), cuando hallazgos recientes y los propios del capítulo cuatro demuestran claramente que dichas lesiones desde su temprano desarrollo están acompañadas de cambios significativos de las células mioepiteliales y de su

sin signo clínico alguno de tumor.

microambiente. Nuevos conceptos en el desarrollo y evolución de cáncer demuestran cómo las células mioepiteliales, la membrana basal, la cantidad de tejido conectivo y el infiltrado de leucocitos estarían jugando un papel determinante en el curso biológico de la lesión. 4. Puesto que no se ha demostrado que todas las LIEs evolucionen a formas malignas, pareciera más prudente dejar este nombre, si se deja, para aquellas con mayor significado de potencial maligno que para aquellas que no lo tienen, el vocablo lesiones proliferativas intraductales (LPI) de glándula mamaria limita el término al sistema lobular y tubular (Costarelli *et al.*, 2012).

La presencia de LIEs en este estudio fue más frecuente en las glándulas abdominales e inguinales que en las torácicas, esto refleja en gran medida lo que sucede con los tumores malignos o benignos una vez ellos son manifiestos (Sleeckx *et al.*, 2011), y demuestra una buena correlación no solo en la localización de las LIEs y los tumores evidentes sino en el porcentaje de prevalencia de las primeras y los últimos, resultados similares son descritos por Mouser *et al.* (2010); aun no es clara la razón para la predilección de las glándulas abdominales e inguinales como sitio de ubicación de las patologías neoplásicas en la especie canina, aunque se propone que estaría relacionada con el aumento de tejido mamario en estas glándulas y su respuesta proliferativa a los niveles de estrógenos (Queiroga and Lopes, 2002).

La lesión más común en este trabajo fue la adenosis con un 25% de frecuencia, sin embargo, solo la hembra No 22 tuvo ésta como única lesión, en la hembra No 6 además de abundantes adenosis igualmente fueron numerosas las lesiones de morfología maligna pero no invasivas y aquellas abiertamente neoplásicas; ahora bien, si se mira en términos de prevalencia dentro esta escasa población de la muestra (seis caninas) el número de caninas con lesiones malignas pero no invasivas o claramente neoplásicas fue el doble frente a las dos que tuvieron como única lesión adenosis (hembra No 22) o HLA (Canina No 16). Esto indica que el 66% de la población de este trabajo tiene lesiones problemáticas desde sus inicios, cifra evidentemente superior al 52% obtenido en el trabajo de Mouser *et al.* (2010).

Mouser *et al.* (2010) reportan mayor frecuencia de HU (45%), CDIS (29,6%), HDA (13%), adenoma complejo (11,1). Mientras que para esta investigación las LIEs más frecuentes fueron las adenosis (25%) y los CIS (21%), las Cal (12%) y los Ca complejos (11%). Seguramente esta diferencia se debe a que Mouser *et al.* (2010) no incluyeron en su conteo la adenosis, la adenosis esclerosante, y la hiperplasia lobular puesto que en el caso de estos autores las GM estaban en distintas etapas de hiperplasia fisiológica o atrofia (es decir, pseudolactación, lactancia, o involución) ellos no tomaron en cuenta que la GM de caninas pueden presentar más de tres estratos de células epiteliales en condiciones fisiológicas (Rehm *et al.*, 2007; Orfanou *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010; Sorenmo *et al.*, 2011) ya que se basó en la clasificación de las lesiones intraepiteliales para mujeres propuesta por Rosen (2001).

La presencia de las lesiones columnares en glándula mamaria de caninas esta descrita en el interior de carcinomas invasivos (28.4%), CDIS (29.8%), tumores benignos (31.4%) y tejido normal (10.4%) por el grupo de Ferreira *et al.* (2010), quienes también realizaron marcaje con inmunohistoquímica y sus LCC marcaron positivo a estrógenos, progesterona y E-cadherina pero negativas a citoqueratina 34bE-12, HER-2 y P53, reportan que la tasa de proliferación medida con Ki-67 es más alta que en el tejido

normal y concluyen que estas lesiones son fenotípicamente similares a las del cáncer de seno de mujeres. En nuestro estudio todas las lesiones columnares estuvieron contenidas en CDIS; y, en mujeres se considera que las lesiones columnares son un marcador de la presencia de atipia en el seno, incrementando levemente el riesgo de progresar a cáncer de mama de una a dos veces (Dabbs, 2012).

Si se agrupan todas las lesiones de aspecto maligno pero no invasivas y aquellas declaradamente neoplásicas: CIS 21%, Ca complejos (11%) y Cal (12%), la cifra alcanza el 44%, es decir, el 66% de la población tendría casi el 50% de probabilidades de tener una lesión comprometedoras desde sus comienzos. Aunque el estudio de Mouser et al. (2010) se orientó a la detección de LIEs para lo cual se tomaron animales sin signos clínicos, diagnosticaron varios “tumores benignos” como adenoma simple, adenoma complejo, tumor mixto benigno, adenoma basaloide, papiloma ductal y papiloma esclerosante de los cuales en este estudio solo se diagnosticó el papiloma ductal. No entendemos porque los citados autores denominan “tumores benignos” a lesiones que aún no se manifiestan clínicamente que fue el criterio principal usado por ellos para definir LIEs, según nuestro entendimiento del concepto de LIEs, además de su delimitación histológica por la membrana basal (Antuofermo et al., 2007; Masood, 2010), se refiere al hecho que aún no se manifiestan clínicamente.

En este estudio no se observó HDA, solo se demostró una HLA, en tanto que Antuofermo et al. (2007) y Mouser et al. (2010) la encontraron en un 4,67 y en un 13%, respectivamente, mientras que en las tres los CDIS fueron del 21, 48,33 y 35,8%, respectivamente; con base en las importantes diferencias entre los porcentajes de las HDA y los CIS en los tres trabajos citados, en nuestra opinión, no parece prudente postular una evolución similar de las LIEs desde estadios benignos a otros pre y abiertamente malignos en contraste con lo que se propone en las LIEs de mujeres en quienes la HDA sería un paso previo en la evolución hacia lesiones malignas. Algunos hallazgos de esta investigación, por el contrario, parecen soportar más la hipótesis de que las lesiones espontáneas malignas tienen un carácter maligno desde sus inicios (Man et al., 2011); no parece probable que lesiones con alta prevalencia como los Ca de distinta morfología puedan derivarse de alteraciones benignas con mucha menor prevalencia inexistentes en este trabajo; como hallazgo importante, no se observó relación espacial directa entre las lesiones preinvasivas de riesgo bajo e intermedio (Adenosis, HDU, HLA, LCC, HC); y, las lesiones de alto riesgo (CIS, Cal, CaC), en abierta contraposición con el reporte de Ferreira et al. (2012) quienes concluyen que habría una relación de ubicación directa entre la hiperplasia ductal atípica y los carcinomas mamarios in situ e invasivos, esto a pesar de que en los CDIS el número de las lesiones atípicas en la Tabla uno del trabajo de Ferreira et al. (2012) fue igual a las hiperplasias usuales e incluso estas últimas estuvieron en mayor número que las atípicas. Aparte del hecho de que estos autores utilizaron como criterios de inclusión para diagnosticar las distintas LIEs la clasificación de la OMS en veterinaria de tumores de caninas (Misdorp et al., 1999) y la clasificación de Rosen, (1999) para células columnares de mujeres, se debe tener en cuenta que la evaluación de las LIEs en tumores manifiestos, parece prestarse a distorsiones entre otras cosas, dada la ausencia de criterios sólidos para separar claramente una lesión tumoral declarada y una alteración periférica que eventualmente pudiera ser una extensión de la primera. Todavía más, y como se verá más adelante, hay evidencias morfológicas claras de identidad de las lesiones de apariencia de alto riesgo, por lo menos, desde sus orígenes.

De las 209 lesiones diagnosticadas en el trabajo de Mouser et al. (2010) las de mayor prevalencia fueron las HDU con 51%, una cifra muy por encima del 9% obtenido en este estudio, estas divergencias pueden deberse a los criterios de clasificación empleados por ambos grupos; mientras que en nuestro caso se tuvo en cuenta que fisiológicamente en las diferentes etapas del ciclo estral de caninas se reporta como normal el aumento del número de capas del epitelio de los ductos sin que las células muestren otras alteraciones propias de un crecimiento anómalo (Rehm *et al.*, 2007; Orfanou *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010; Sorenmo *et al.*, 2011); en el trabajo de Mouser et al. (2010) utilizaron criterios de inclusión de patologías de seno, es decir consideran HDU cuando hay más de dos capas de células (Rosen, 2001), lo cual en nuestro criterio no sería suficiente argumento para declarar este cambio como patológico.

En este estudio se separan los CIS como: CDIS que se deriva de los ductos interlobulares y CLIS en el que las células se originan preferentemente de lobulillos, pudiendo originarse tanto de los acinos o de los ductos intralobulares toda vez que estas estructuras son indistinguibles por HE (Ressel et al., 2011; Dabbs, 2012). Esta subdivisión es importante porque se ha demostrado en mujeres y hembras caninas que los mecanismos de carcinogénesis son diferentes según la localización, particularmente el carcinoma lobular se distingue por que no expresa E cadherina, en consecuencia las células malignas no presentan cohesión y al invadir toman un aspecto plasmocitoide mientras que el carcinoma ductal al invadir tiende a formar túbulos (Dabbs, 2012); también se diferencian ambas patologías por sus patrones de invasión -el fenotipo lobular debido a su poca adhesividad invade formando un patrón lineal inmerso en un estroma fibroso- recientemente descrito en patología veterinaria de caninas (Ressel et al., 2011); las dos alteraciones tienen capacidad de metástasis distinta ya que el carcinoma lobular es menos metastásico a pulmón y más a piel que el carcinoma ductal (Korhonen et al., 2014); por todo esto se sugiere que el desarrollo y progresión del CDIS es diferente al CLIS (Turashvili et al., 2007; Dabbs, 2012); todavía más, el carcinoma lobular tiene menor capacidad de invadir vasos linfáticos, pero una vez en ganglio linfático las células metastásicas son más difíciles de diferenciar ya que son pequeñas y se asemejan a linfocitos (Topps et al., 2013). Nuestros hallazgos muestran que al igual que en mujeres la mayoría de las lesiones de GM preinvasivas en caninas se originan anatómicamente en la unidad terminal ducto-lobulillar de la glándula mamaria (Lopez-Garcia *et al.*, 2010). Sin embargo, se requieren los perfiles de inmunohistoquímica de E cadherina y CK34betaE12, para confirmar a ciencia cierta si los 17 CLIS diagnosticados en este estudio en verdad lo son (Ressel et al., 2011).

No parece encontrarse un patrón claro de distribución de las prevalencias en los distintos grados nucleares entre los tres trabajos que abordan el estudio de las LIEs: Mouser et al. (2010), Antuofermo et al. (2007) y esta investigación. Pero es claro que en todos los trabajos los criterios de: polaridad nuclear, tamaño nuclear, patrón de la cromatina

(vesiculosa o densa), número y apariencia de nucléolos (ocasionales, prominentes o múltiples), la cantidad de mitosis permiten conocer si la lesión tiene riesgo bajo, intermedio o alto en progresar a un carcinoma invasivo.

Pero tal vez el hallazgo más relevante de este trabajo tiene que ver con la presencia de la lesión lobulillar (Figuras 2-17, 2-18) en la que se ve que ocupa prácticamente todo el lobulillo y no se ve relación alguna con lesión alguna de otro tipo, la lesión parece surgir de Novo espontáneamente en un lobulillo en el que aún persisten algunos acinos "normales morfológicamente". En nuestra opinión esta morfología es afín con la teoría del "sick lobe" de carcinogénesis de seno en mujeres, la cual postula que el carcinoma de mama es una enfermedad lobar en la cual los focos tumorales aparecen simultáneamente o de forma asíncrona y se desarrollan dentro de un único lóbulo enfermo. El lóbulo enfermo se caracteriza por la presencia de un gran número de células potencialmente malignas correspondientes a las células madre o células progenitoras mutantes dispersas dentro del lóbulo y presentes en varios sitios del mismo, por lo que el lóbulo enfermo es más sensible a los estímulos oncogénicos endógenos o exógenos en comparación con otros lóbulos de la misma mama que no tienen o tienen menos células potencialmente malignas (Tot, 2011). Esto coincide con reportes recientes que ponen de manifiesto que un subconjunto de los tejidos morfológicamente normales y/o con hiperplasias que se encuentran adyacentes o distantes a tumores de una misma GM contienen grupos de células que muestran alteraciones citológicas e inmunohistoquímicas asociadas a malignidad (Man and Nieburgs 2006). Entre los hallazgos más relevantes es que estas células son malignas desde un principio y tienen: (1) un aumento significativo de las interrupciones focales de las capas de células mioepiteliales a sus alrededores y la pérdida de la expresión del receptor de estrógeno, (2) los signos de invasión al estroma principalmente resaltan que el núcleo se vuelve fusiforme y penetra la membrana basal y también invade el estroma y que 10% de estos grupos de células malignas tenían contacto con estructuras parecidas a vasos que contenían células no cohesivas de aspecto flotante, (3) estas células se caracterizan por tener cambios nucleares asociados a malignidad (pérdida de la polaridad, múltiples nucléolos, forma nuclear irregular, megalocariosis) y (4) la expresión de múltiples biomarcadores asociados a malignidad (c-erb-B2, p53 y la proteína beta). Estos hallazgos sugieren que el modelo lineal de la progresión del tumor no puede aplicarse a todos los casos, y que en realidad estas lesiones espontáneas desde un principio pueden ser malignas (Man *et al.*, 2011).

Esta teoría se soporta en el hecho de que según los estudios histopatológicos la mayoría de los carcinomas de seno son multifocales y de tamaño variable; también los métodos diagnósticos de imagen modernos en seno apoyan estos resultados evidenciando que la enfermedad es multifocal hasta en un 40% de los casos. Se reportan la multifocalidad y el tamaño de los carcinomas como factores pronósticos importantes del comportamiento biológico de esta enfermedad en mujeres (Tot, 2009). Nuestros hallazgos indican que este proceso ocurriría en caninas y se deben hacer investigaciones para caracterizar el comportamiento biológico y la distribución de esas células potencialmente malignas. Con todo, recientemente, un estudio en nuestra opinión predominantemente epidemiológico en el que tomaron datos clínicos y diagnósticos histopatológicos de 90 hembras caninas con 296 tumores, concluye con la hipótesis que los tumores de mama malignos pueden desarrollarse a partir de tumores benignos preexistentes y que los tumores malignos serían la etapa final (Sorenmo *et al.*, 2009). Pero ellos también describen que dentro de

una misma glándula mamaria se presenta mucha heterogeneidad y que las lesiones benignas y malignas son multifocales y de tamaño variable.

En este estudio se reporta la coexistencia de lesiones preinvasivas con carcinomas invasivos, lo que sugiere que en verdad la progresión de los Ca mamarios en caninas sería a partir de lesiones que desde sus inicios muestran claras características morfológicas de malignidad (como los CIS) para luego avanzar a lesiones abiertamente malignas: invasividad por etapas distinguibles morfológicamente (Antuofermo *et al.*, 2007; Mouser *et al.*, 2010; Mohammed *et al.*, 2011), similar a lo descrito para mujeres (Lopez-Garcia *et al.*, 2010).

Según nuestra información, este es el primer estudio que describe displasias de origen complejo: hiperplasia compleja (7%) y carcinoma complejo (11%), hasta ahora no descritas en patología veterinaria, pero que tienen su contraparte en tumores manifiestos clínicamente (Misdorp *et al.*, 1999; Goldschmidt *et al.*, 2011; Caicedo and Iregui, 2014);

En conclusión este estudio proporciona evidencia que las LIEs se presentan en caninas en Bogotá D.C. con una frecuencia importante, hay similitudes respecto a la morfología de estas lesiones con la reportada en mujeres y la mayoría son de origen epitelial, se demostró que clasificación actual de las LIEs de hembras caninas no es definitiva, y nuestros hallazgos aportan información para proponer una nueva hipótesis para entender la carcinogénesis de esta enfermedad sustentada en la teoría del lóbulo enfermo. Esto argumenta la conveniencia de hacer localmente una caracterización molecular de estas lesiones de caninas para el estudio comparado de este tipo de patología en mujeres; con los consecuentes beneficios derivados de la investigación comparada.

2.7 Bibliografía

Antuofermo, E., Miller, M.A., Pirino, S., Xie, J., Badve, S., Mohammed, S.I., 2007. Spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs - A model of breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 16, 2247-2256.

Cadieu, E., Ostrander, E., 2007. Canine genetics offers new mechanisms for the study of human cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 16, 2181.

Caicedo, J.A., Iregui, C.A., Cabarcas, M.E., Acosta, B.J., 2012. Estudio comparativo de la frecuencia de tumores mamarios según sexo, edad y tipo histológico en caninos y humanos en los laboratorios de patología anatómica de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. *Revista Colombiana de Ciencia Animal* 5, 37-46.

Caicedo, J.A., Iregui, C.A., 2014. Intraepithelial Lesions (IELs) in mammary glands of dogs without clinical evidence of tumors, Bogotá-Colombia, SA. LCPG Presentations in ACVP&ASVCP 2014 Concurrent Annual Meeting. Atlanta – Georgia, USA (November 10th 2014)

Costarelli, L., Campagna, D., Mauri, M., Fortunato, L., 2012. Intraductal proliferative lesions of the breast—terminology and biology matter: premalignant lesions or preinvasive cancer?. *Int J Surg Oncol*, 2012:501904.

Dabbs, D.J., 2012. *Breast Pathology*, Saunders W.B. 1st, editor: Elsevier Health Sciences.

Donnay, I., Devleeschouwer, N., Wouters-Ballman, P., Leclercq, G., Verstegen, J., 1996. Relationship between receptors for epidermal growth factor and steroid hormones in normal, dysplastic and neoplastic canine mammary tissues. *Research in veterinary science* 60, 251-254.

Ferreira, E., Gobbi, H., Saraiva, B.S., Cassali, G.D., 2010. Columnar cell lesions of the canine mammary gland: pathological features and immunophenotypic analysis. *BMC Cancer* 10, 61.

Ferreira, E., Gobbi, H., Saraiva, B.S., Cassali, G.D., 2012. Histological and immunohistochemical identification of atypical ductal mammary hyperplasia as a preneoplastic marker in dogs. *Vet Pathol* 49(2), 322-9

Galimberti, V., Monti, S., Mastropasqua, MG., 2013. DCIS and LCIS are confusing and outdated terms. They should be abandoned in favor of ductal intraepithelial neoplasia (DIN) and lobular intraepithelial neoplasia (LIN). *Breast* 22(4), 431-5.

Gilbertson, S., Kurzman, I., Zachrau, R., Hurvitz, A., Black, M., 1983. Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Veterinary Pathology* 20(2), 127-42.

Goldschmidt, M., Pena, L., Rasotto, R., Zappulli, V., 2011. Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology Online* 48, 117-131.

Granados, J.A.T., 1995. Medidas de prevalencia y relación incidencia-prevalencia. *Med Clin (Barc)* 105, 216-218.

Grizzle, W.E., Srivastava, S., Manne, U. 2010. The biology of incipient, pre-invasive or intraepithelial neoplasia. *Cancer Biomark*, 9(1-6):21-39.

Hernández, G., Herrán, S., Cantor, L.F., 2007. Análisis de las tendencias de mortalidad por cáncer de mama en Colombia y Bogotá, 1981-2000. *Rev Colomb Cancerol* 11 (1), 32-39.

Im, K.-S., Kim, I.-H., Kim, N.-H., Lim, H.-Y., Kim, J.-H., Sur, J.-H., 2013. Breed-related differences in altered BRCA1 expression, phenotype and subtype in malignant canine mammary tumors. *The Veterinary Journal* 195, 366-372.

Klopfleisch, R., von Euler, H., Sarli, G., Pinho, S.S., Gartner, F., Gruber, A.D., 2011. Molecular Carcinogenesis of Canine Mammary Tumors: News From an Old Disease. *Veterinary Pathology* 48, 98-116.

Korhonen, T., Kuukasjärvi, T., Huhtala, H., Alarmo, E.L., Holli, K., Kallioniemi, A., Pylkkänen, L. 2013. The impact of lobular and ductal breast cancer histology on the metastatic behavior and long term survival of breast cancer patients. *Breast*, 22(6):1119-24.

Lester, S.C., Bose, S., Chen, Y.-Y., Connolly, J.L., de Baca, M.E., Fitzgibbons, P.L., Hayes, D.F., Kleer, C., O'Malley, F.P., Page, D.L., 2009. Protocol for the examination of specimens from patients with ductal carcinoma in situ of the breast. *Archives of pathology & laboratory medicine* 133, 15-25.

Lopez-Garcia, M.A., Geyer, F.C., Lacroix-Triki, M., Marchió, C., Reis-Filho, J.S., 2010. Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways. *Histopathology* 57(2), 171-192.

Man, Y.G., Nieburgs, H.E. 2006. A subset of cell clusters with malignant features in morphologically normal-appearing and hyperplastic tissues. *Cancer Detect Prev*, 30(3):239-47.

Man, Y., Grinkemeyer, M., Izadjoo, M., Stojadinovic A., 2011. Malignant Transformation and Stromal Invasion from Normal or Hyper-plastic Tissues: True or False?. *Journal of Cancer* 2, 413-424

Masood, S., 2010. Is it time to retire the term of "in situ carcinoma" and use the term of "borderline breast disease"? *Breast J* 16, 571-572

Masood, S., Rosa, M., 2011. Borderline breast lesions: diagnostic challenges and clinical implications. *Advances in anatomic pathology* 18, 190-198.

Matos, A.J., Baptista, C.S., Gärtner, M.F., Rutteman, G.R., 2012. Prognostic studies of canine and feline mammary tumours: The need for standardized procedures. *Vet J*, 193(1):24-31.

Misdorp, W., Else, R., Hellmen, E., Lipscomb, T., 1999. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. *Armed Forces Institute of Pathology*.

Misdorp, W., 2002. Tumors of the mammary gland. In *textbook of Tumors of Domestic Animals*, 4th edit, DJ Meuten, Eds., Iowa State Press, Iowa, pp. 575-606.

Mohammed, S.I., Meloni, G.B., Parpaglia, M.P., Marras, V., Burrai, G.P., Meloni, F., Pirino, S., Antuofermo, E., 2011. Mammography and ultrasound imaging of preinvasive and invasive canine spontaneous mammary cancer and their similarities to human breast cancer. *Cancer Prevention Research* 4(11), 1790-8.

Mouser, P., Miller, M.A., Antuofermo, E., Badve, S.S., Mohammed, S.I., 2010. Prevalence and Classification of Spontaneous Mammary Intraepithelial Lesions in Dogs Without Clinical Mammary Disease. *Veterinary Pathology* 47, 275-284.

O'Malley, F.P., Pinder, S.E., Mulligan, A.M., 2011. Breast Pathology: A Volume in the Series: Foundations in Diagnostic Pathology (Expert Consult-Online). Elsevier Health Sciences.

Oliveira, J.C., Kommers, G.D., Masuda, E.K., Marques, B., Figuera, R.A., Irigoyen, L.F., Barros, C.S.L., 2010. Retrospective study of 1,647 mammary gland tumors in dogs. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 30, 177-185.

Orfanou, D.C., Pourlis, A., Ververidis, H.N., Mavrogianni, V.S., Taitzoglou, I.A., Boscós, C.M., Fthenakis, G.C., 2010. Histological Features in the Mammary Glands of Female Dogs throughout Lactation. *Anatomia Histologia Embryologia* 39, 473-478.

Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P., 2005. Global cancer statistics, 2002. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians* 55, 74-108.

Queiroga, F., Lopes, C. 2002. Tumores mamários caninos: novas perspectivas. In: Congresso de Ciências Veterinárias. Congresso de Ciências Veterinárias, Oeiras, Portugal p.183-190.

Rehm, S., Stanislaus, D.J., Williams, A.M., 2007. Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. *Birth Defects Research Part B-Developmental and Reproductive Toxicology* 80, 233-245.

Ressel, L., Millanta, F., Poli, A. 2011. Canine invasive lobular carcinoma of the mammary gland: morphological and immunohistochemical characterizations of three cases. *J Comp Pathol*, 144(4):303-7.

Robles, S., Galanis, E., 2002. Breast cancer in Latin America and the Caribbean. *Revista Panamericana de Salud Pública* 11, 178-185.

Rosen, P.P., 2001. Rosen's Breast Pathology., 2nd edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 1004.

Rosen, P.P., 2009. Rosens Breast Pathology., 3rd edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (USA), 101-108.

Santos, M., Marcos, R., Faustino, A.M.R., 2010. Histological Study of Canine Mammary Gland During the Oestrous Cycle. *Reproduction in Domestic Animals* 45, E146-E154.

Sleeckx, N., de Rooster, H., Veldhuis Kroeze, E.J., Van Ginneken, C., Van Brantegem, L. 2011. Canine mammary tumours, an overview. *Reprod Domest Anim*, 46(6):1112-31

Sorenmo, K.U., 2003. Canine mammary gland tumors. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 33, 573.

Sorenmo, K.U., Kristiansen, V.M., Cofone, M.A., Shofer, F.S., Breen, A.M., Langeland, M., Mongil, C.M., Grondahl, A.M., Teige, J., Goldschmidt, M.H., 2009. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Vet Comp Oncol* 7, 162-172.

Sorenmo, K.U., Rasotto, R., Zappulli, V., Goldschmidt, M.H., 2011. Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms. *Veterinary Pathology* 48, 85-97.

Topps, A., Clay, V., Absar, M., Howe, M., Lim, Y., Johnson, R., Bundred, N. 2014. The sensitivity of pre-operative axillary staging in breast cancer: comparison of invasive lobular and ductal carcinoma. *Eur J Surg Oncol*, 40(7):813-7.

Tot, T., 2009. The metastatic capacity of multifocal breast carcinomas: extensive tumors versus tumors of limited extent. *Human Pathology* 40(2), 199–205

Tot, T., 2011. "The theory of the sick lobe," in *Breast Cancer: A Lobar Disease*, T. Tot, Ed., Springer, London, UK, 1–18.

Turashvili, G., Bouchal, J., Ehrmann, J., Fridman, E., Skarda, J., Kolar, Z. 2007. Novel immunohistochemical markers for the differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 151(1):59-64.

Uva, P., Aurisicchio, L., Watters, J., Loboda, A., Kulkarni, A., Castle, J., Palombo, F., Viti, V., Mesiti, G., Zappulli, V., 2009. Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BMC genomics* 10, 135.

Warner, M., 1977. Response of Beagle mammary dysplasias to various hormone supplements in vitro. *Cancer Research* 37, 2062-2067.

2.8 Recomendaciones

Se deben realizar estudios de inmunohistoquímica que busquen posibles cambios en el fenotipo de estas células potencialmente malignas que posiblemente son las iniciadoras de tumores mamarios y están contenidas en los lóbulos enfermos.

3. Caracterización del patrón de expresión inmunohistoquímica de Galectina- 3 en lesiones intraepiteliales de glándula mamaria en caninas sin signo clínico alguno de tumor

3.1 Resumen

Las lesiones intraepiteliales (LIEs) son anomalías morfológicas locales que incrementan el riesgo de cáncer. La detección temprana de cáncer de seno permite la identificación de LIEs. En las caninas se ha propuesto las LIEs como modelo comparativo con humanos. La galectina- 3 está involucrada con la progresión del cáncer en mujeres y hembras caninas pero su rol en el comportamiento biológico de las neoplasias es contradictorio según la célula de origen. El objetivo de este trabajo fue caracterizar histológicamente la expresión de galectina- 3 en 19 GM provenientes de 6 caninas sin signos clínicos de tumor que contenían 50 tipos LIEs y 7 carcinomas invasivos teniendo en cuenta el porcentaje de células positivas y la intensidad del color de la reacción. No hubo inmunomarcación para galectina- 3 en las adenosis, las hiperplasias ductales usuales, la hiperplasia lobular atípica, las lesiones de células columnares, el carcinoma complejo o las hiperplasias complejas. Un papiloma/adenoma con hiperplasia de acinos tuvo marcación multifocal en 11–50% de las células con moderada intensidad. Dos Ca in situ ambos del subtipo CLIS uno de grado nuclear intermedio y el otro de alto grado, tuvieron marcación en 10% de las células, pero uno tuvo intensidad baja y el otro intensidad moderada. Nuestros hallazgos sugieren que el rol de la galectina- 3 aparentemente es poco importante en la iniciación de las LIEs, pero sugieren que en la progresión de estas lesiones es una proteína de interés que posiblemente interactúa en el comportamiento biológico de esta enfermedad.

3.2 Abstract

Intraepithelial lesions (IELs) are local morphological abnormalities that increase the risk of cancer. Early detection of breast cancer allows identification of LIEs. In the canine has been proposed as a comparative model between the LIEs humans. Galectin-3 is involved with progresión cancer in women and bitches but their role in the biological behavior of neoplasms is contradictory as the source cell. The aim of this study was histologically characterize the expression of galectin-3 in 19 GM from 6 canine without clinical signs of tumor containing 50 types LIEs and 7 invasive carcinomas considering the percentage of

positive cells and the intensity of color reaction. Not there was immunostaining for galectin-3 in the adenosis usual ductal hyperplasia, atypical lobular hyperplasia, columnar cells lesions, complex carcinoma or complex hyperplasias. Papilloma/ adenoma had multifocal staining of 11-50% of cells with moderate intensity. Two CLIS one of nuclear grade intermediate and the other of high nuclear grade dial had 10% of staining cells, but the intensity was moderate and in the other low. Our findings suggest that the role of galectin-3 appears to be unimportant in the initiation of LIEs but suggest that the progression of these lesions is a protein of interest that may interact in the biological behavior of the disease.

3.3 Introducción

Recientemente se han demostrado coincidencias en el desarrollo temprano de las lesiones carcinomatosas de la glándula mamaria (GM) más comunes en mujeres y hembras caninas, las denominadas lesiones intraepiteliales (LIEs) (Antuofermo *et al.*, 2007), neoplasias intraepiteliales ductales y lobulares (Galimberti *et al.*, 2013), enfermedades de seno limítrofes “borderline breast disease” (Masood, 2010), entre otras. Posiblemente, la formación de algunos carcinomas (Ca) mamarios pasa por ciertos estadios previos LIEs antes de la manifestación clínica de la lesión, algunos de los cuales son factores de riesgo precursores de patologías neoplásicas (Lopez-Garcia *et al.*, 2010). Además de las similitudes morfológicas en mujeres y caninas, en el plano molecular, se han descrito otras semejanzas de las LIEs entre las que se encuentran que pueden ser positivas o negativas a estrógenos y que la expresión de progesterona en ambas especies es significativamente baja en el CIS de bajo grado (Mouser *et al.*, 2010), adicionalmente para los CIS se han descrito según la expresión de estrógenos (e), progesterona (p), ERB-B2 y citoqueratinas (CK) los mismos subtipos moleculares que hay en mujeres: Luminal A (e o p + y ERB-B2 +), luminal B (e o p + y ERB-B2 -), ERB-B2 (e o p - y ERB-B2+), basal (e o p - y ERB-B2 – pero CK 4 o CK5+) (Sassi *et al.*, 2010).

Actualmente las LIEs mamarias se diagnostican con frecuencia como resultado del éxito de programas de educación y concientización en mujeres. Establecer un modelo animal de estas lesiones se justifica ya que es un requisito previo para desarrollar ensayos clínicos en humanos y posteriormente probar tratamientos o programas preventivos (Antuofermo *et al.*, 2007; Sierra, 2009).

Además de su utilidad en el diagnóstico temprano de neoplasias mamarias, algunas de estas LIEs como el CIS pueden ser empleadas en el análisis de los primeros cambios genotípicos y fenotípicos que indiquen posibles rutas patogénicas a través de las cuales las células manifiestan sus propiedades invasivas tempranas. En las neoplasias mamarias humanas se describen cambios en distintas glicoproteínas, por ejemplo, hay expresión de mucinas aberrantes (MUC1 y MUC4) en la membrana celular de células tumorales (Cazet *et al.*, 2010); también los niveles de ARNm para muchos de los genes implicados en la glicosilación difieren significativamente entre el tejido normal y maligno de mama, lo que indica que la síntesis, la degradación y la adhesión mediada por glicanos puede alterarse drásticamente en los Ca de mama (Cazet *et al.*, 2010; Potapenko *et al.*, 2010; Mukhopadhyay *et al.*, 2011).

En caninas también se han demostrado cambios fenotípicos de antígenos carbohidrato que normalmente no se encuentran en el epitelio de los acinos y ductos pero en tumores mamarios clínicamente manifiestos se expresan, entre ellos, los antígenos sialyl le^a, T/Tn (Nowak *et al.*, 2009) y galectina- 3 (Choi *et al.*, 2004), sin embargo, no se conocen estudios que reporten la expresión de antígenos carbohidrato en lesiones tempranas mamarias de caninas, esto es importante dado que se conoce que los cambios en los patrones de glicosilación celular están implicados en la progresión del cáncer (Hakomori, 2002).

Por otra parte, aunque el aumento de la expresión de galectina- 3 en algunos tipos de tumores malignos (tiroides, paratiroides, Ca renal entre otros) se ha correlacionado con la transformación y eventos propios de la metástasis; una disminución en la expresión de la galectina-3 en distintos tumores, entre los que se incluye el cáncer de seno, también se ha asociado con progresión tumoral y metástasis (Castronovo *et al.*, 1996; Cay, 2012). Estos resultados aparentemente contradictorios demuestran que el papel de la galectina-3 en la carcinogénesis no está completamente comprendido. Para la GM de caninas se conoce que normalmente no expresa galectina- 3, en tumores benignos se sobreexpresa y en tumores malignos disminuye su expresión (Choi *et al.*, 2004); pero aún no se conoce el papel de la galectina-3 en los estadios de iniciación del tumor. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue caracterizar la expresión de galectina- 3 en LIEs de GM de caninas sin signos clínicos de tumor mamario.

3.4 Materiales y métodos

3.4.1 Descripción de las LIEs incluidas en el estudio para hacer la inmunomarcación de galectina- 3.

Se adelantó un estudio descriptivo del fenotipo del estroma en lesiones intraductales e intraacinares no invasivas en GM de caninas, denominadas como lesiones intraepiteliales (LIEs) en la literatura internacional (Antuofermo *et al.*, 2007; Mouser *et al.*, 2010). El estudio se realizó en muestras de GM con LIEs de seis hembras reproductivamente enteras, con presentación de más de un celo y sin evidencia clínica alguna de tumor mamario. Estas seis hembras caninas fueron obtenidas de la casuística de necropsia del laboratorio de patología veterinaria (LPV) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional (FMVZ) UN y de hembras sometidas a eutanasia en el Centro de Zoonosis (CZ), igualmente sin signo clínico alguno de enfermedad mamaria; estos cadáveres fueron incinerados. Estos procedimientos fueron practicados por Médicos Veterinarios calificados, entre el 14 de febrero y el 14 de diciembre de 2012, luego de aprobación del Comité de Bioética de la FMVZ- UN (2011) y del concepto a favor del Tribunal de Ética Profesional COMVEZCOL (2012).

Todas las muestras fueron procesadas siguiendo los protocolos de rutina de histotecnica de inclusión en parafina, fijación en formalina al 3,7%, corte (3-4 μ m), desparafinado, hidratación y tinción con hematoxilina y eosina, PAS y tricrómica de Masson. Para confirmar las lesiones complejas se utilizaron anticuerpos contra miosina pesada y queratina básica 5.

Para el diagnóstico de las LIEs espontáneas se siguieron los criterios propuestos por Antuofermo et al. (2007), los cuales fueron establecidos a partir de la interconsulta de casos de LIEs de GM en caninas con patólogos de humanos, también se usaron revisiones de patología mamaria de caninas (Goldschmidt *et al.*, 2011) y libros recientes de patologías de seno de mujeres (Dabbs, 2012; O'Malley *et al.*, 2011; Rosen, 2009). Para las lesiones columnares se utilizó la clasificación establecida para caninas por Ferreira et al. (2010). Para los Ca la graduación se estableció principalmente por el pleomorfismo nuclear y/o presencia de mitosis, en un sistema de tres grados: bajo grado o 1, grado intermedio o 2 y alto grado o 3 (Antuofermo *et al.*, 2007; Lester *et al.*, 2009; Rosen, 2009; Mouser *et al.*, 2010).

Se diagnosticaron 50 LIEs y 7 Ca invasivos (CaI) en 19 GM afectadas de las seis caninas incluidas en el estudio como se resume en la Tabla 2-1 (ver capítulo 2), que también muestra el número de tipo lesiones por animal y por GM (Caicedo and Iregui, 2014).

Las adenosis constituyeron el 24% de las LIEs, mientras que los Ca con el 21%, los CaC con el 11% y los CaI con 12% combinados constituyeron el 45% de la casuística.

Carcinomas in situ (CIS): en 12 GM se diagnosticaron CIS de dos tipos: *Ca ductal in situ* (CDIS) y *Ca lobular in situ* (CLIS). Dentro de cada GM se hizo un conteo para además describir cada uno de los diferentes patrones, en total se diagnosticaron 42 lesiones de este tipo. Estas alteraciones variaron desde grado nuclear bajo hasta alto. En la Tabla 2-2 (ver capítulo 2) se resumen los subtipos según arreglo arquitectónico y grado nuclear.

3.4.2 Protocolo de la prueba de detección inmunohistoquímica de galectina- 3 (LPV-UN-2013)

Objetivo: Esta prueba provee una detección cualitativa de la expresión de la galectina- 3 en tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina, utiliza un anticuerpo primario monoclonal liofilizado producido en ratón (NCL-GAL3; Laboratorio Novocastra, Newcastle, UK) dirigido contra la proteína galectina- 3. La galectina- 3 es una lectina que se une a la enzima beta-galactosidasa que cataliza la hidrólisis de galactósidos a monosacáridos y se localiza en el citoplasma y en el núcleo de varios tipos de células (Cay, 2012). Para el revelado se utilizó un kit comercial de marca DAKO LSAB®2 Link (USA).

Procesamiento de los tejidos: Brevemente. Para visualizar la expresión de galectina- 3 se aplicaron sobre cada tejido de GM desparafinado 200µl de Ig anti-galectina- 3 a una concentración de 1:100, se incubó por una hora en cámara húmeda a 25°C y para el revelado de la reacción se utilizó un sistema de detección: IgG anti-ratón producido en Cabra (Dako, Dinamarca). Se utilizó como cromógeno diaminobencidina (Dako-Cytomation) lista para usar y como tinción de contraste, hematoxilina de Meyer. Para mejorar la inmunorreactividad del tejido, se sumergieron las láminas en un frasco de plástico con un búfer de desenmascaramiento Tris-EDTA y se calentaron en un horno microondas durante 25 min, a continuación, las secciones se lavaron con agua por 10

min y se bloquearon durante una hora con 200µl de leche descremada al 5% en TBST a temperatura ambiente (Anexo A).

Interpretación: Las células marcadas con el anticuerpo contra galectina- 3 muestran un patrón de tinción en el citoplasma y/o núcleo celular de color pardo a rojizo. Se utilizó como control positivo de la técnica próstata (Figura 3-1) y como control negativo tiroides ambas de origen humano (Figura 3-2). Adicionalmente en el interior de cada GM canina tratada se evaluaron los macrófagos como un control adicional ya que normalmente presentan marcación positiva.

Figura 3-1: Próstata de humano, control positivo de tinción IHQ para la galectina- 3. La marcación es de tono café en el citoplasma de las células epiteliales y de algunos macrófagos en el estroma subepitelial. IHQ 200x.

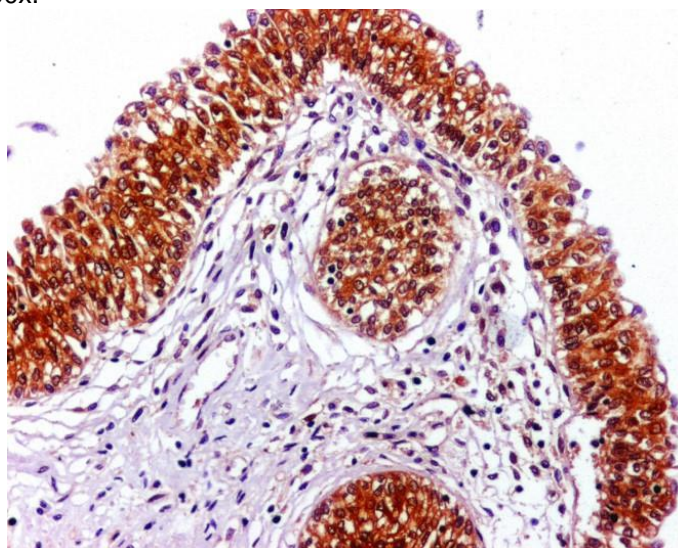
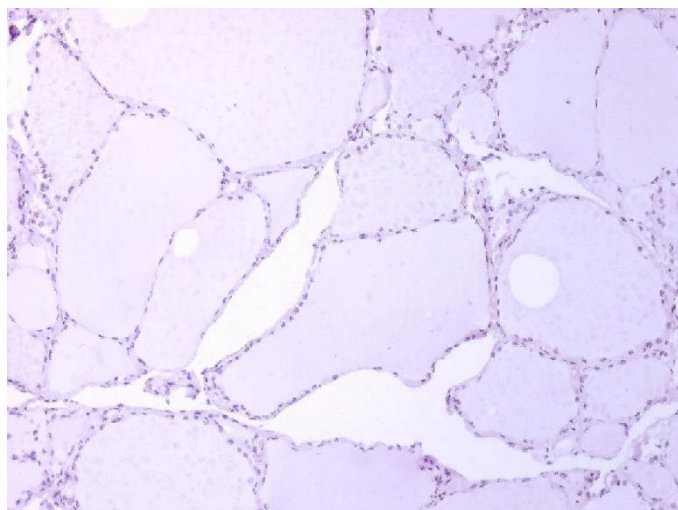


Figura 3-2: Tiroides de humano, control negativo de tinción IHQ para la galectina- 3. No hay marcación en ninguna célula de los folículos. IHQ 100x.



Lectura de inmunohistoquímica: Se llevó a cabo un análisis semicuantitativo de la expresión de galectina- 3 según lo descrito por Choi et al. (2004) modificado debido a que en este artículo se solapan los límites y adicionalmente en el presente estudio se tuvo en cuenta la intensidad de la reacción del color de la lesión vs el control positivo y los macrófagos en el interior de la GM (Tabla 3-1).

Tabla 3-1: Puntaje para el análisis semicuantitativo en la lectura de la IHQ para galectina- 3

Puntos	Porcentaje de células positivas	Puntos	Intensidad de la reacción del color
0	Ninguna célula con tinción	0	No tiñen
1	1-10% células con tinción positiva	1	Baja intensidad vs control positivo
2	11–50% células con tinción positiva	2	Moderada intensidad vs control positivo
3	51–100% células con tinción positiva	3	Igual o más intensidad vs control positivo

3.5 Resultados

3.5.1 Caracterización de la expresión de galectina- 3 en LIEs de GM de caninas sin signos clínicos en Bogotá D.C.

Los resultados de la expresión de galectina- 3 para cada tipo de lesión diagnosticada en este trabajo se resumen en la Tabla 3-2.

Tabla 3-2: Inmunorreactividad a la marcación para galectina- 3 según tipo de LIEs.

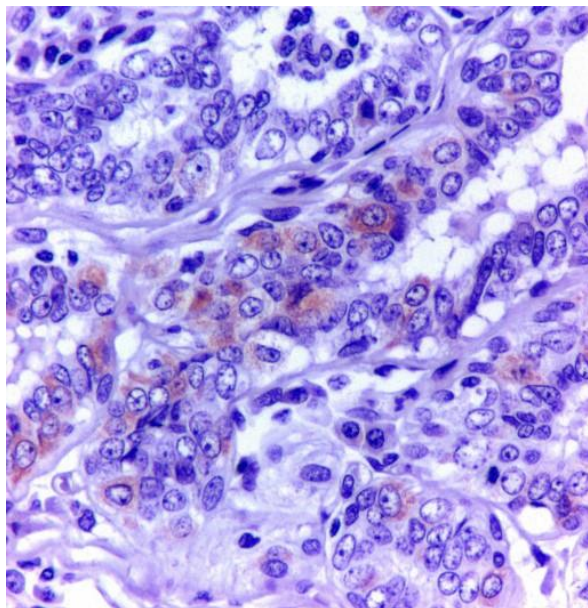
TIPO DE LESIÓN	N°	PORCENTAJE CÉLULAS POSITIVAS				INTENSIDAD DE LA REACCIÓN DEL COLOR			
		0	1	2	3	0	1	2	3
Adenosis	14	14	0	0	0	14	0	0	0
Papiloma intraductal	4	3	0	1	0	3	0	1	0
HDU	5	5	0	0	0	5	0	0	0
Lesiones columnares	4	4	0	0	0	4	0	0	0
Hiperplasias complejas	4	4	0	0	0	4	0	0	0
HLA	1	1	0	0	0	1	0	0	0
CIS (CDIS - CLIS)	42*	40	2	0	0	40	1	1	0
Ca complejo	8	8	0	0	0	8	0	0	0
Cal	12	11	1	0	0	11	1	0	0
Total	94	90	3	1	0	90	2	2	0

*Se diagnosticaron CIS en 12 GM, en adición se realizó un conteo según subtipo, arreglo y grado nuclear de cada CIS, en el cual se obtuvieron en total 42 CIS.

No hubo inmunomarcación para galectina- 3 en las adenosis, las hiperplasias ductales usuales, la hiperplasia lobular atípica, las lesiones de células columnares, el Ca complejo o las hiperplasias complejas.

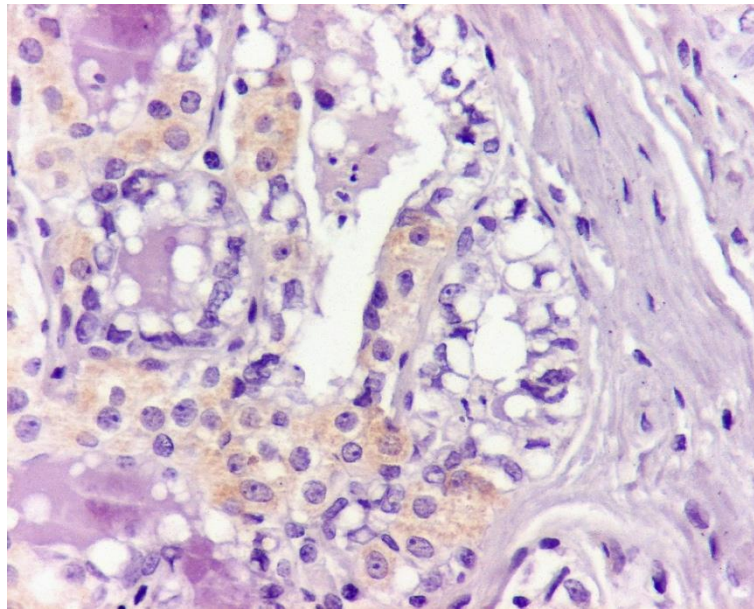
Un papiloma/adenoma con hiperplasia de acinos tuvo marcación multifocal en 11–50% de las células epiteliales con moderada intensidad vs el control de la técnica de IHQ (Figura 3-3). Un Cal tuvo marcación en 1-10% de las células con baja intensidad.

Figura 3-3: Papiloma/adenoma con foco de hiperplasia de acinos, las células epiteliales tienen inmunomarcación multifocal positiva color café en su citoplasma. IHQ para galectina- 3. IHQ 400x.



Dos CIS ambos del subtipo CLIS uno de grado nuclear intermedio y otro de alto grado, tuvieron marcación en 10% de las células, pero uno tuvo intensidad baja y el otro intensidad moderada vs la próstata control positivo de la técnica de IHQ (Figura 3-4).

Figura 3-4: CLIS grado intermedio. Las células epiteliales tienen inmunomarcación positiva color café de baja intensidad en su citoplasma que tiene vacuolas. IHQ para galectina- 3. IHQ 200x



3.6 Discusión

Este estudio demuestra que la mayoría de las LIEs encontradas no expresaron galectina-3; tampoco se demostró la expresión de esta molécula en el epitelio de ductos ni acinos normales; finalmente, hubo expresión de galectina-3 en un papiloma/adenoma, dos CLIS y un Cal la cual fue de poca extensión e intensidad débil. La ausencia de expresión de galectina-3 en epitelio normal así como la baja expresión de este antígeno en adenomas clínicamente manifiestos de GM de caninas ha sido documentada por Choi et al. (2004). En principio, los resultados pertinentes al epitelio normal son directamente comparables entre ambos estudios; de igual manera, se podría concluir que existe similitud en lo referente a los resultados de los adenocarcinomas en el estudio de Choi et al. (2004) y nuestros hallazgos en el caso de las lesiones pre y malignas, en las que la marcación para galectina-3 fue escasa, en todo caso, se debe recordar que en la investigación de los citados autores ya existían tumores clínicamente manifiestos en contraste con las muestras de este trabajo. No podemos hacer comentario alguno respecto a los adenomas como lo mencionan Choi et al. (2004), dado que la contraparte de LIE de esta lesión no se encontró en esta investigación.

Con base en nuestro resultados, se podría afirmar que la expresión de galectina-3 en LIEs de caninas no es un rasgo importante en la evolución de las lesiones malignas mamarias en sus primeros estadios de desarrollo y que su expresión es mayor en tumores abiertos (Choi et al., 2004); en tal caso, dicha expresión correspondería a una fase tardía de su evolución.

La galectina-3 en tumores mamarios manifiestos bien desarrollados de hembras caninas desempeña varias funciones estrechamente relacionadas con los primeros pasos del proceso metastásico y otros procesos de malignidad (de Oliveira *et al.*, 2010); porque: 1) La galectina-3 interactúa con proteínas oncogénicas (HRAS y KRAS); 2) La galectina-3

regula las ciclinas A, D y E promotoras del ciclo celular, además regula los niveles de moléculas inhibitoras del ciclo celular p21 (WAF 1) y p27 (KIP1); 3) La galectina- 3 tiene efectos anti-apoptóticos- por interactuar con la familia de proteínas BCL2 (Honjo *et al.*, 2001). También se considera a la galectina- 3 como un quimioatrayente para células endoteliales y estimula la neovascularización in vivo, por lo tanto, contribuye a la angiogénesis del tumor y proporciona una vía de escape por el cual las células potencialmente malignas pueden abandonar el tumor primario y entrar en los vasos (Nangia-Makker *et al.*, 2000).

Nuestros hallazgos demuestran que para el caso de las lesiones tempranas iniciales la galectina-3 no tendría un papel significativo en el origen y evolución de los Ca mamarios en la primeras fases de desarrollo; es posible que otras vías metabólicas pudieran tener mayor significado.

3.7 Bibliografía

Antuofermo, E., Miller, M.A., Pirino, S., Xie, J., Badve, S., Mohammed, S.I., 2007. Spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs - A model of breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 16, 2247-2256.

Caicedo, J.A., Iregui, C.A., 2014. Intraepithelial Lesions (IELs) in mammary glands of dogs without clinical evidence of tumors, Bogotá-Colombia, SA. LCPG Presentations in ACVP&ASVCP 2014 Concurrent Annual Meeting. Atlanta – Georgia, USA (November 10th 2014).

Castronovo, V., Van Den Brûle, F.A., Jackers, P., Clause, N., Liu, F.T., Gillet, C., Sobel, M.E., 1996. Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer. *J Pathol* 179, 43–48.

Cay, T., 2012. Immunohistochemical expression of galectin-3 in cancer: a review of the literature. *Turk Patoloji Derg* 28(1), 1-10

Cazet, A., Julien, S., Bobowski, M., Burchell, J., Delannoy, P., 2010. Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. *Breast Cancer Res* 12(3), 204.

Choi, Y.K., Hong, S.H., Kim, B.H., Kim, H.C., Woo, H.J., Kim, D.Y., 2004. Immunohistochemical expression of galectin-3 in canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology* 131, 242-245.

Dabbs, D.J., 2012. *Breast Pathology*, Saunders W.B. 1st, editor: Elsevier Health Sciences.

de Oliveira, J.T., de Matos, A.J., Gomes, J., Vilanova, M., Hespanhol, V., Manninen, A., Rutteman, G., Chammas, R., Gärtner, F., Bernardes, E.S., 2010. Coordinated expression of galectin-3 and galectin-3-binding sites in malignant mammary tumors: implications for tumor metastasis. *Glycobiology* 20(11), 1341–1352.

de Oliveira, J.T., de Matos, A.J., Santos, A.L., Pinto, R., Gomes, J., Hespanhol, V., Chammas, R., Manninen, A., Bernardes, E.S., Albuquerque R.C., Rutteman, G., Gärtner F., 2011. Sialylation regulates galectin-3/ligand interplay during mammary tumour progression a case of targeted uncloaking. *Int. J. Dev. Biol.*, 55: 823-834.

de Oliveira, J.T., Gartner, F., 2012. Galectins - Potential Targets in Canine Mammary Tumour Therapy. In: *Canine Behavior, Classification and Diseases*. Nova Science Publishers, Inc.

Ferreira, E., Gobbi, H., Saraiva, B.S., Cassali, G.D., 2010. Columnar cell lesions of the canine mammary gland: pathological features and immunophenotypic analysis. *BMC Cancer* 10, 61.

Galimberti, V., Monti, S., Mastropasqua, MG., 2013. DCIS and LCIS are confusing and outdated terms. They should be abandoned in favor of ductal intraepithelial neoplasia (DIN) and lobular intraepithelial neoplasia (LIN). *Breast* 22(4), 431-5.

Goldschmidt, M., Pena, L., Rasotto, R., Zappulli, V., 2011. Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology Online* 48, 117-131.

Klopfleisch, R., von Euler, H., Sarli, G., Pinho, S.S., Gartner, F., Gruber, A.D., 2011. Molecular Carcinogenesis of Canine Mammary Tumors: News From an Old Disease. *Veterinary Pathology* 48(1):98-116.

Hakomori, S., 2002. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 10231.

Honjo, Y., Nangia-Makker, P., Inohara, H., Raz, A., 2001. Down-regulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human breast carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 7(3), 661-8.

Lester, S.C., Bose, S., Chen, Y.-Y., Connolly, J.L., de Baca, M.E., Fitzgibbons, P.L., Hayes, D.F., Kleer, C., O'Malley, F.P., Page, D.L., 2009. Protocol for the examination of specimens from patients with ductal carcinoma in situ of the breast. *Archives of pathology & laboratory medicine* 133, 15-25.

Lopez-Garcia, M.A., Geyer, F.C., Lacroix-Triki, M., Marchió, C., Reis-Filho, J.S., 2010. Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways. *Histopathology* 57(2), 171-92.

Masood, S., 2010. Is it time to retire the term of "in situ carcinoma" and use the term of "borderline breast disease"? *Breast J* 16, 571-572

Mouser, P., Miller, M.A., Antuofermo, E., Badve, S.S., Mohammed, S.I., 2010. Prevalence and Classification of Spontaneous Mammary Intraepithelial Lesions in Dogs Without Clinical Mammary Disease. *Veterinary Pathology* 47, 275-284.

Mukhopadhyay, P., Chakraborty, S., Ponnusamy, M.P., Lakshmanan, I., Jain, M., Batra, S.K., 2011. Mucins in the pathogenesis of breast cancer: Implications in diagnosis, prognosis and therapy. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* 1815, 224-240.

Nangia-Makker, P., Honjo, Y., Sarvis, R., Akahani, S., Hogan, V., Pienta, K.J., Raz, A., 2000. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *Am J Pathol* 156:899–909.

Nowak, M., Madej, J., Dzikgiel, P., Lopljszynski, W., Rodo, A., Ugorski, M., 2009. Tumor-associated Carbohydrate Antigens: Sialyl Le(a) and T/Tn Antigens in Canine Mammary Tumors. *Veterinary Pathology* 46, 222-226.

O'Malley, F.P., Pinder, S.E., Mulligan, A.M., 2011. *Breast Pathology: A Volume in the Series: Foundations in Diagnostic Pathology (Expert Consult-Online)*. Elsevier Health Sciences.

Ochieng, J., Furtak, V., Lukyanov, P., 2004. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj J* 19:527–535. *Glycoconj J*19(7-9), 527-35.

Orfanou, D.C., Pourlis, A., Ververidis, H.N., Mavrogianni, V.S., Taitzoglou, I.A., Boscos, C.M., Fthenakis, G.C., 2010. Histological Features in the Mammary Glands of Female Dogs throughout Lactation. *Anatomia Histologia Embryologia* 39, 473-478.

Potapenko, I.O., Haakensen, V.D., Luders, T., Helland, A., Bukholm, I., Sorlie, T., Kristensen, V.N., Lingjaerde, O.C., Borresen-Dale, A.L., 2010. Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. *Molecular Oncology* 4, 98-118.

Rehm, S., Stanislaus, D.J., Williams, A.M., 2007. Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. *Birth Defects Research Part B-Developmental and Reproductive Toxicology* 80, 233-245.

Rosen, P., 2009. Papilloma and related benign tumors. *Rosens Breast pathology.*, 3rd edition, Lippincot, Williams & Wilkins edits., Philadelphia (USA), 101-108.

Santos, M., Marcos, R., Faustino, A.M.R., 2010. Histological Study of Canine Mammary Gland During the Oestrous Cycle. *Reproduction in Domestic Animals* 45, E146-E154.

Sassi, F., Benazzi, C., Castellani, G., Sarli, G. 2010. Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *BMC Vet Res*, 6:5.

Sierra, A., 2009. Animal models of breast cancer for the study of pathogenesis and therapeutic insights. *Clin Transl Oncol* 11(11), 721-7.

3.8 Recomendaciones

Se deben realizar estudios de inmunohistoquímica que busquen otras vías metabólicas y posibles cambios en el fenotipo de estas células potencialmente malignas que posiblemente son las iniciadoras de tumores mamarios y están contenidas en los lóbulos enfermos.

4. Estudio histológico del estroma en lesiones intraepiteliales de glándula mamaria en caninas sin signo clínico alguno de tumor.

4.1 Resumen

Las lesiones intraepiteliales (LIEs) son anomalías morfológicas locales que incrementan el riesgo de cáncer. La detección temprana de cáncer de seno permite la identificación de LIEs. En las caninas se ha propuesto las LIEs como modelo comparativo con humanos. El microambiente que rodea los tumores está involucrado con la progresión del cáncer en mujeres pero su rol en el comportamiento biológico de las lesiones tempranas aún no se ha establecido. El objetivo de este trabajo fue caracterizar histológicamente la morfología del estroma en 19 GM provenientes de 6 caninas sin signos clínicos de tumor que contenían 50 tipos de LIEs y 7 carcinomas invasivos se evaluó la membrana basal (PAS), densidad del estroma (TM) y el tipo de infiltrado inflamatorio (HE). La membrana basal se observó engrosada en los carcinomas in situ (CIS) e interrumpida en los Carcinomas invasivos (Cal). Se observaron tres patrones de densidad del tejido conectivo, laxo (Hiperplasias complejas), denso (CIS y Cal) y mezcla (Ca complejos). Se encontró que el infiltrado leucocitario que predomina son los linfocitos, las células plasmáticas y los macrófagos. Nuestros hallazgos sugieren que el estroma interactúa durante la progresión biológica de estas LIEs.

4.2 Abstract

Intraepithelial lesions (IELs) are local morphological abnormalities that increase the risk of cancer. Early detection of breast cancer allows identification of LIEs. In the canine has been proposed as a comparative model the LIEs humans. The microenvironment surrounding tumors is involved with cancer progression in women but their role in the biological behavior of early lesions has not yet been established. The aim of this study was histologically characterize the morphology of the stroma in 19 GM from 6 canine without clinical signs of tumor containing 50 types of LIEs and 7 invasive carcinomas basement membrane (PAS), stromal density (TM) was evaluated and the type of inflammatory infiltrate (HE). The basement membrane was observed thickened in the in situ carcinoma (CIS) and disrupted in the invasive carcinomas (Cal). Three patterns of density of connective loose tissue (complex Hyperplasia), dense (CIS and Cal) and mixed (complex Ca) were observed. It was found that the infiltration of lymphocytes, plasmatic cells and macrophages are predominant. Our findings suggest that the stroma interacts during progression of these lesions in female dogs.

4.3 Introducción

La glándula mamaria (GM) es un tejido compuesto de un parénquima epitelial el cual incluye tanto las células epiteliales en directo contacto con el lumen ductal o acinar y las células mioepiteliales que se ubican debajo de ellas sobre la membrana basal (MB), ésta es una red especializada de macromoléculas de la matriz extracelular que forma una barrera delgada que separa el epitelio del estroma y está conformada por proteínas, glicoproteínas y proteoglicanos; en mayor proporción se encuentran la laminina y el colágeno tipo IV (Rowe and Weiss 2008). Ambos tipos de células epiteliales se encuentran incrustadas en tejido conectivo compuesto por diversos tipos de células (fibroblastos, leucocitos, adipocitos, etc.), en el cual además se localizan los vasos sanguíneos y linfáticos; finalmente, el tejido conectivo (TC) está inmerso en una matriz extracelular compuesta por moléculas de distinta índole que junto con el TC regulan la proliferación y diferenciación tanto del tejido epitelial como del TC (Fata et al., 2003). Entre algunas de las moléculas de la matriz importantes en esta interacción encontramos el factor beta transformante de crecimiento, el factor de crecimiento de hepatocitos, el factor de crecimiento epidérmico y las metaloproteinasas de la matriz (Simian et al., 2001).

Las interacciones estroma-epitelio regulan el desarrollo de la GM y son críticas para la remodelación fisiológica del tejido (Kass et al., 2007; Klopffleisch et al., 2011). La matriz extracelular es una mezcla de un amplio número de diferentes componentes moleculares que varía entre los organismos y también entre los tejidos dentro de un organismo y, a veces, también varía con la edad de desarrollo (Davies, 2001). En la GM esta matriz interviene en la regulación del crecimiento, la supervivencia, la migración y la diferenciación de las células epiteliales mamarias y de las células del mismo TC a través de un repertorio de receptores transmembrana, de los cuales los mejor caracterizados son las integrinas en las células epiteliales. Las integrinas modulan el destino celular mediante la transducción recíproca de señales bioquímicas y biofísicas entre la célula epitelial y la matriz extracelular, facilitando procesos tales como la morfogénesis glandular en la etapa embrionaria y durante la lactancia (Fata et al., 2003).

Durante el desarrollo de la GM y la progresión del cáncer, la matriz extracelular se altera dinámicamente en su composición, volumen y orientación. Estas alteraciones de la matriz modifican la forma de las células epiteliales y la expresión de algunos factores de crecimiento, entre otros cambios, pero además dependen estas células de estímulos hormonales (estrógenos, progesterona, prolactina, entre otros) que son importantes en la ramificación de los ductos y la diferenciación acinar (Fata et al., 2003). La transformación maligna de las células epiteliales también se asocia con la remodelación de la matriz y en algunos casos se observa una esclerosis progresiva del TC que puede estimular el crecimiento de estas células de la GM, perturbar la organización del tejido mamario y promover la invasión y la supervivencia de las mismas (Fata et al., 2003).

Algunas de las propiedades y eventos que ocurren en este microambiente y se describen como importantes para que las células epiteliales manifiesten su malignidad son: hipoxia intratumoral (factor inducible por hipoxia-1 α (HIF-1 α)), la angiogénesis (factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)), la transición epitelio-mesenquimal (EMT) (E cadherina, Vimentina, entre otras moléculas) y propiedades inmunosupresoras tumorales (factor de necrosis tumoral- α (TNF- α)) (Videira et al., 2014).

Estudiar el comportamiento del estroma en relación con los factores morfológicos de riesgo según el tipo de lesión intraepitelial en GM proporciona información útil para identificar los posibles actores celulares que intervienen en el proceso de iniciación y progresión de estas neoplasias. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue caracterizar la morfología de algunos componentes del estroma (microambiente) en LIEs de glándula mamaria (GM) de hembras caninas sin signos clínicos de tumor mamario de las cuales se hizo un estudio detallado de su epitelio en el capítulo 2.

4.4 Materiales y métodos

4.4.1 Descripción de las LIEs incluidas en el estudio para hacer el estudio del estroma

Se adelantó un estudio descriptivo del fenotipo del estroma en lesiones intraductales e intraacinares no invasivas o invasivas en glándula mamaria (GM) de caninas, denominadas como lesiones intraepiteliales (LIEs) en la literatura internacional (Antuofermo *et al.*, 2007; Mouser *et al.*, 2010). El estudio se realizó en muestras de GM con LIEs de seis hembras reproductivamente enteras, con presentación de más de un celo y sin evidencia clínica alguna de tumor mamario. Estas seis hembras caninas fueron obtenidas de la casuística de necropsia del laboratorio de patología veterinaria (LPV) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional (FMVZ) UN y de hembras sometidas a eutanasia en el Centro de Zoonosis (CZ), igualmente sin signo clínico alguno de enfermedad mamaria; estos cadáveres fueron incinerados. Estos procedimientos fueron practicados por Médicos Veterinarios calificados, entre el 14 de febrero y el 14 de diciembre de 2012, luego de aprobación del Comité de Bioética de la FMVZ- UN (2011) y del concepto a favor del Tribunal de Ética Profesional COMVEZCOL (2012).

Todas las muestras fueron procesadas siguiendo los protocolos de rutina de histotecnica de inclusión en parafina, fijación en formalina al 3,7%, corte (3-4 μ m), desparafinado, hidratación y tinción con hematoxilina y eosina, PAS y tricrómica de Masson.

Para el diagnóstico de las LIEs espontáneas se siguieron los criterios propuestos por Antuofermo *et al.* (2007), los cuales fueron establecidos a partir de la interconsulta de casos de LIEs de GM en caninas con patólogos de humanos; también se usaron revisiones de patología mamaria de caninas (Goldschmidt *et al.*, 2011) y libros recientes de patologías de seno de mujeres (Rosen, 2009; O'Malley *et al.*, 2011; Dabbs, 2012). Para las lesiones columnares se utilizó la clasificación establecida para caninas por Ferreira *et al.* (2010). Para los carcinomas (Ca) la graduación se estableció principalmente por el pleomorfismo nuclear y/o presencia de mitosis, en un sistema de tres grados: bajo grado o 1, grado intermedio o 2 y alto grado o 3 (Lester *et al.*, 2009; Rosen, 2009).

Se diagnosticaron 50 LIEs y 7 Ca invasivos (CaI) en 19 GM afectadas de las seis caninas incluidas en el estudio como se resume en la Tabla 2-1 (Ver capítulo 2), que también muestra el número de tipo lesiones por animal y por GM (Caicedo and Iregui, 2014).

Las adenosis constituyeron el 24% de las LIEs, mientras que los CIS con el 21%, los CaC con el 11% y los Cal con 12% combinados constituyeron el 45% de la casuística.

Carcinomas in situ (CIS): en 12 GM se diagnosticaron carcinomas de dos tipos: *Ca ductal in situ* (CDIS) y *Ca lobular in situ* (CLIS). Dentro de cada GM se hizo un conteo para además describir cada uno de los diferentes patrones, en total se diagnosticaron 42 lesiones de este tipo. Los grados nucleares de estas alteraciones variaron de bajo hasta alto. En la Tabla 2-2 (ver capítulo 2) se resumen los subtipos según arreglo arquitectónico y grado nuclear.

4.4.2 Protocolo de la evaluación del estroma

Todas las GM con LIEs fueron procesadas con H&E, ácido periódico de Schiff (PAS) y Tricrómica de Masson (TM) y evaluadas según como se resume a continuación:

Para la evaluación de la **MB** se tienen en cuenta los siguientes criterios según tinción de PAS:

- Normal: si al compararla con los acinos y ductos vecinos normales, no hay diferencia en grosor.
- Engrosada: si al compararla con los acinos y ductos vecinos su grosor es mayor
- Interrumpida: si se presentan regiones de MB discontinuas
- Podía encontrarse una mezcla de las dos últimas categorías: interrumpidas y engrosadas.

Para la evaluación del TC se tienen en cuenta los siguientes criterios según tinción tricrómica de Masson:

1. Normal: si al compararlo con los acinos y ductos vecinos normales, no hay diferencia en cuanto a la cantidad de células, fibras y sus tonos.
2. TC laxo: si al compararlo con los acinos y ductos normales vecinos hay disminución de las fibras y las células conectivas y/o su distancia es más amplia, la tinción no es azul fuerte (escasa matriz extracelular madura) y más bien tiende a ser translúcida.
3. TC denso: si al compararlo con los acinos y ductos normales vecinos hay mayor cantidad de fibras (expresada por lo general como mayor grosor de paquetes de las mismas) y sus tonos son más intensos (más maduros).
4. TC con áreas densas y laxas: Si se presentan mezclas de las dos anteriores categorías.

Para la evaluación del **infiltrado leucocitario** se tienen en cuenta la distribución de los leucocitos en dos áreas (la periferia y el interior de la lesión) y clasificadas según lo descrito por Estrela-Lima et al. (2010) por la técnica de H&E:

1. Focal: presencia de focos de leucocitos, entre uno y tres.
2. Multifocal: presencia de más de 3 focos de leucocitos.
3. Difusa: presencia de leucocitos distribuidos en la periferia de la lesión.

Además se consideró el tipo de leucocitos infiltrados (linfocitos, plasmáticas, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, eosinófilos) y la intensidad (cantidad de leucocitos por campo de 400x) (Estrela-Lima et al., 2010).

1. Ausente: 0 células.
2. Leve: 10-50 células.
3. Moderado: 51-100 células.
4. Severo: más de 100 células.

4.4.3 Estadística

Se realizó la prueba de comparación de proporciones con un estadístico T de student para confrontar el cambio del TC y el cambio en la expresión de la MB entre dos grupos de lesiones: 1) las lesiones preinvasivas de riesgo bajo e intermedio (Adenosis, HDU, HLA, LCC, HC); y, 2) lesiones malignas (CIS, Cal, CaC), esto utilizando el software del sistema statistix 10 con significancia del 99%. Para determinar si hay correlación entre el grado nuclear y el comportamiento de la membrana basal y del estroma; y, entre los cambios histológicos de la membrana basal y del estroma, como nuestras variables son de rangos, se corrió la correlación de Spearman con el sistema statistix 10.

4.5 Resultados

4.5.1 Membrana basal

La Tabla 4-1 resume los hallazgos de la MB en las LIEs de GM de caninas sin lesión tumoral alguna.

Tabla 4-1: Modificación en la membrana basal en LIEs y Cal

TIPO DE LESION	N°	NORMAL	ENGROSADA	ENGROSADA Y CON RUPTURA
Adenosis	14	13	1	0
HDU	5	5	0	0
Lesiones columnares	4	2	2	0
Papiloma intraductal	4	4	0	0
HLA	1	1	0	0
Hiperplasias complejas	4	4	0	0
Ca in situ (CDIS y CLIS)	42	14	28	0
Carcinoma complejo	6	6	0	0
Cal	7	0	0	7

Excepto por una adenosis y dos lesiones columnares, las lesiones benignas no mostraron engrosamiento de la MB; mientras que en las dos terceras partes de los CIS, la MB estaba engrosada (Figura 4-1), y en los Cal estaba engrosada y con ruptura (Figura 4-2); en tanto que en el CaC en ninguno la MB estaba engrosada.

Con una significancia del 99% se obtuvo una diferencia significativa ($p < 0,0001$) en cuanto al engrosamiento y la ruptura de la membrana basal entre las lesiones preinvasivas y las malignas.

Figura 4-1: CLIS grado intermedio. La MB de los acinos comprometidos está engrosada (Flechas rojas) comparada con la MB de los acinos normales localizados en la parte superior de la foto (Flechas negras). PAS. 400x.

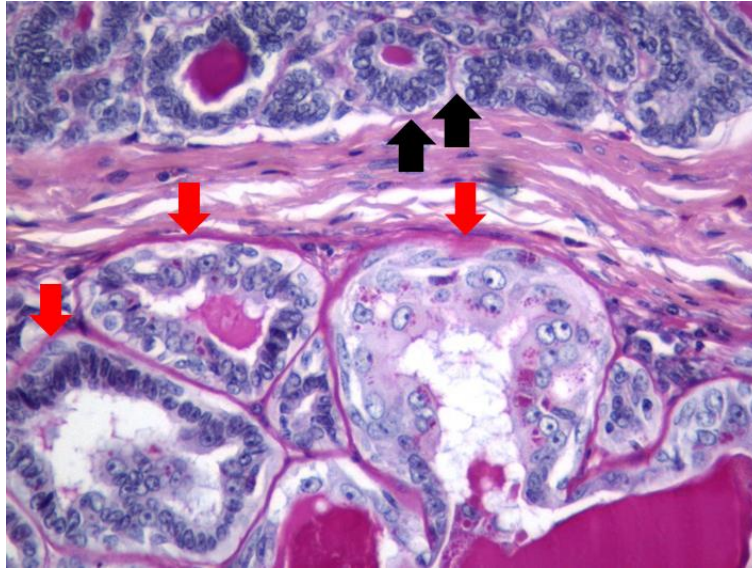
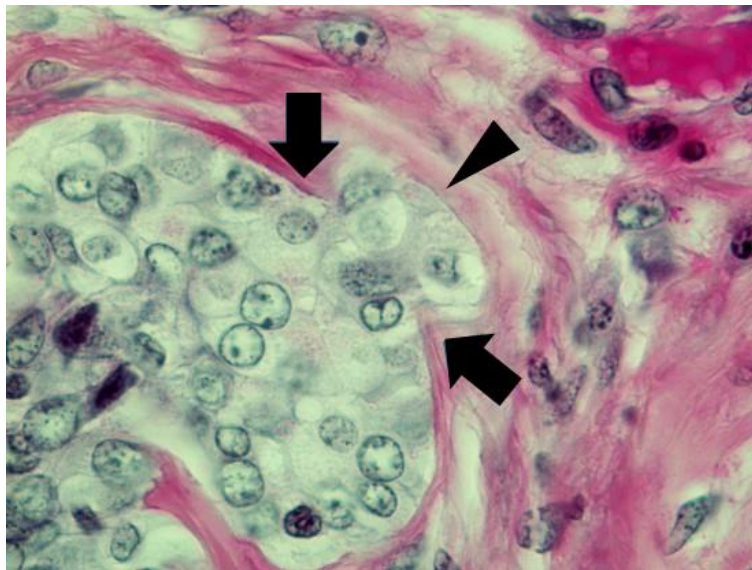


Figura 4-2: Carcinoma invasivo. MB con ruptura (Flechas) y protrusión de células tumorales a la periferia del acino, es probable que aún quede algún remanente de la MB (cabeza de flecha) aunque de forma más tenue. PAS 1000x.



La Tabla 4-2 resume los hallazgos de la MB según tipo de Ca y grado nuclear.

Tabla 4-2: Modificación en la membrana basal según tipo y grado de CLIS y CDIS

DIAGNÓSTICO	N° LESIONES	N° CASOS	MEMBRANA BASAL		GRADO nuclear
			NORMAL	ENGROSADA	
CLIS	17	7	7	0	I
		9	1	8	II
		1	0	1	III
CDIS PAPILAR	7	0	NA	NA	I
		5	0	5	II
		2	0	2	III
CDIS MICROPAPILAR	8	5	5	0	I
		2	0	2	II
		1	0	1	III
CDIS SOLIDO	5	1	1	0	I
		2	0	2	II
		2	0	2	III
CDIS COMEDOCARCINOMA	5	0	NA	NA	I
		0	NA	NA	II
		5	0	5	III
TOTAL		42	14	28	

Grado. Bajo (I), intermedio, (II) y alto (III). NA (No aplica).

Como se aprecia en la Tabla 4-2, 13/14 (93%) de los CIS que no mostraron engrosamiento de la MB tuvieron grado nuclear I; en tanto que en el 28/29 (96,5%) de los CIS que tuvieron grado II o III la MB estaba engrosada, esto es el (28/42) 67% de los CIS. Estadísticamente se demostró que existe una correlación positiva del 0,6647 entre el grado nuclear y el grosor de la membrana basal, con una probabilidad exacta de 0,0001%. Es decir a medida que aumenta el grado nuclear aumenta el grosor de la membrana basal.

4.5.2 Tejido conectivo

La tabla 4-3 resume los hallazgos del TC con la técnica de TM.

Tabla 4-3: Modificación del tejido conectivo según tipo de LIEs y Cal

TIPO DE LESION	TEJIDO CONECTIVO				
	N°	NORMAL	LAXO	DENSO	MEZCLA
Adenosis (Figuras 2-2 a 2-4)	14	14	0	0	0
HDU (Figuras 2-5 a 2-6)	5	3	1	1	0
Lesiones columnares (Figura 2-7)	4	4	0	0	0
Papiloma intraductal (Figuras 2-8 a 2-11)	4	4	0	0	0
HLA (Figuras 2-12 y 2-13)	1	1	0	0	0

Hiperplasias complejas (Figuras 2-14 a 2-16)	4	0	4	0	0
Ca in situ (Figuras 2-17 a 2-24)	42	17	1	24	0
Ca complejo (Figuras 2-25 a 2-26)	6	0	1	0	5
Cal (Figuras 2-27 a 2-28)	7	0	0	7	0

Cinco CaC presentaron mezcla de ambos tipos de TC (Figura 4-3). Veinticuatro CIS, es decir el 56% de las lesiones preinvasivas de alto riesgo (Ca in situ, Ca complejo, Carcinoma invasivo) (31/55), 7 Cal, esto es, el 100% de las abiertamente invasivas demostraron engrosamiento del TC alrededor de acinos y ductos (Figura 4-4); lo que a su vez representa el 65% (36/55) de todas las lesiones con alguna manifestación de malignidad. Una HDU demostró aumento del grosor de fibras intersticiales; mientras que en cuatro hiperplasias complejas y una HDU el estroma era laxo (Figura 4-5). Las demás lesiones no demostraron cambio alguno del TC intersticial. Se resalta la presencia de lo que parecen ser miofibroblastos en las áreas de desmoplasia alrededor de un CDIS papilar, un CDIS micropapilar, un CLIS y un Cal (Figura 4-6).

La lesiones de alto riesgo (CIS, Cal, CaC) tuvieron mayores cambios en el arreglo del tejido conectivo que las rodea (laxo, mezcla y denso) que las LIEs preinvasivas de riesgo bajo e intermedio (Adenosis, HDU, HLA, LCC, HC), con una significancia del 99% ($p < 0,0001$).

Figura 4-3: Carcinoma complejo. Se observan diferentes tonos del color azul correspondiente a fibras de colágeno, que indican el grosor del TC (mezcla) en el interior de la lesión, laxo (L) denso (D). Tricrómica de Masson. 40x.

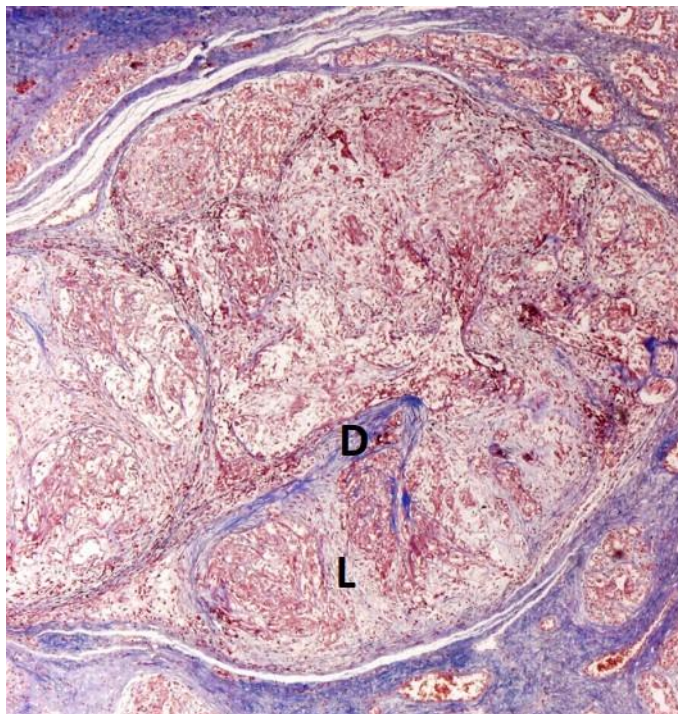


Figura 4-4: CDIS micropapilar de alto grado. La lesión parece dividirse en dos hemisferios según la cantidad y densidad del TC: uno superior-derecho y otro inferior-izquierdo. En el primero se

observa aumento del TC entre lo que parecen ser acinos, el cual es más delgado y escaso en la mitad superior y más abundante y denso en la inferior, entre lo que parecen ser ductos. Tricrómica de Masson. 40x.

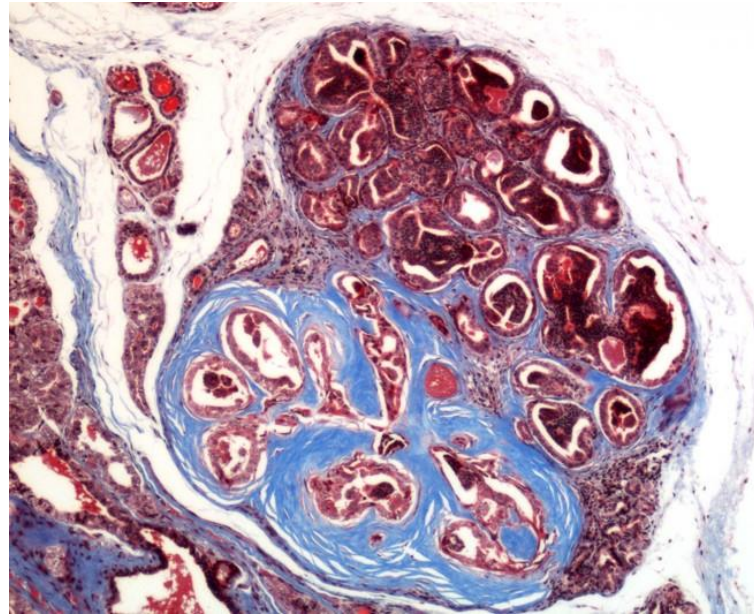


Figura 4-5: Hiperplasia ductal usual. Se observa poco TC de carácter laxo entre los acinos representado por la escasa tinción (tono azul muy tenue: cabezas de flecha. Hay un infiltrado inflamatorio con predominio linfoplasmocitario. En la periferia el TC igual de denso que el de los acinos no afectados de la misma GM. Tricrómica de Masson. 200x

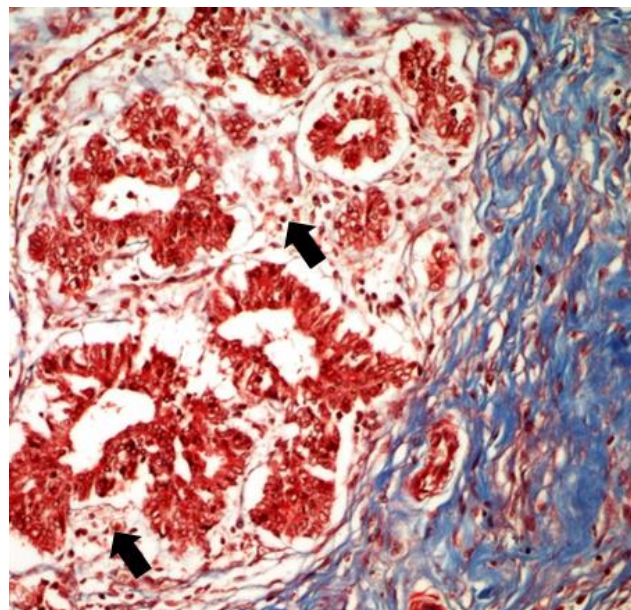


Figura 4-6: CDIS papilar grado intermedio. Las papilas están soportadas por un estroma fibrovascular que tiñe de color rojo a diferencia del habitual azul, lo cual sugiere que las células que lo componen son miofibroblastos (Yoshimura et al., 2011) (MF). Tricrómica de Masson.100x.



La tabla 4-4 resume los hallazgos del TC según tipo de Ca y su grado nuclear.

Tabla 4-4: Modificación del tejido conectivo de los subtipos de carcinoma según su arreglo y grado nuclear

DIAGNÓSTICO	N° LESIONES	N° CASOS	TEJIDO CONECTIVO			GRADO nuclear
			NORMAL	LAXO	DENSO	
CLIS	17	7	7	0	0	I
		9	5	0	4	II
		1	0	0	1	III
CDIS PAPILAR	7	0	NA	NA	NA	I
		5	1	0	4	II
		2	0	0	2	III
CDIS MICROPAPILAR	8	5	4	0	1	I
		2	0	0	2	II
		1	0	0	1	III
CDIS SOLIDO	5	1	0	1	0	I
		2	0	0	2	II
		2	0	0	2	III
		0	NA	NA	NA	I

CDIS COMEDOCARCINOMA	5	0	NA	NA	NA	II
		5	0	0	5	III
TOTAL		42	17	1	24	

Grado. Bajo (I), intermedio, (II) y alto (III). NA (no aplica)

En el 57% de los CDIS y los CLIS de grado intermedio y alto el TC que los rodea es más denso, mientras que en los de grado bajo (40.5%) el espesor de su TC fue similar al de los lóbulos o ductos no afectados. Se obtuvo una correlación positiva de 0,4036 entre el grado nuclear y la cantidad de tejido conectivo que rodea los lobulillos o ductos, esto es, hay relación directa significativa: entre mayor grado nuclear (II o III) mayor grosor del TC intersticial, con una probabilidad exacta de 0,0085%.

De otro lado, se obtuvo una correlación positiva de 0,2819 entre el grosor de la MB y la cantidad de TC que rodea los lobulillos o ductos, esto significa que existe una relación directa significativa en el engrosamiento de ambas estructuras con una probabilidad exacta de 0,0706%.

4.5.3 Infiltrado leucocitario:

La tabla 4-5 resume los hallazgos del infiltrado leucocitario según el tipo de lesión.

Tabla 4-5: Descripción de los tipos y distribución de infiltrado leucocitario según tipo de LIEs

TIPO DE LESION	N°	Presentación del INFILTRADO LEUCOCITARIO
Adenosis	14	Ocho no mostraron infiltrado alguno; seis tuvieron en su interior o en la periferia infiltrado focal de tipo linfoplasmocitario leve (3) y moderado (3).
Papiloma intraductal	4	Todos mostraron en el interior de la lesión, específicamente en el árbol fibrovascular, un infiltrado multifocal con predominio linfoplasmocitario y de macrófagos leves. Algunos macrófagos tenían pigmentos en el citoplasma de color café y en un caso, hubo macrófagos vacuolados en la luz.
HDU	5	Una no presentó infiltrado alguno. Una, tenía infiltrado multifocal de linfocitos y células plasmáticas moderados en la periferia y en el interior. Las tres restantes tenían infiltrado focal en la periferia de predominio linfoplasmocitario leve.
Lesiones columnares	4	Dos no presentaron infiltrado y las otras dos presentaron infiltrado focal linfoplasmocitario leve en la periferia.
Hiperplasias complejas	4	Las cuatro <i>hiperplasias complejas</i> presentaron en su interior infiltrado

		multifocal linfoplasmocitario leve.
HLA	1	En la periferia y en el interior infiltrado MN multifocal de predominio linfoplasmocitario moderado.

La información para los *CIS*, *CaC* Y *CaI* se resume en la tabla 4-6.

Tabla 4-6: Descripción de los tipos y distribución de infiltrado inflamatorio para los *CIS*, *CaC* Y *CaI*

DIAGNÓSTICO	N° LESIONES	GRADO	N° CASOS	TIPO DE INFILTRADO INFLAMATORIO
		I	7	Tres no tenían infiltrado. Dos con infiltrado interno difuso linfoplasmocitario leve y moderado. Uno con infiltrado focal linfoplasmocitario leve. Uno con infiltrado en la periferia e interno multifocal de predominio de macrófagos con pigmentos pardos en su citoplasma.
CLIS	17	II	9	Dos no tenían infiltrado. Cuatro con infiltrado interno difuso linfoplasmocitario moderado. Uno con infiltrado interno multifocal linfoplasmocitario leve. Una con infiltrado interno y en la luz infiltrado moderado multifocal de macrófagos, algunos con pigmentos en su citoplasma PAS positivos (ocrocitos) (Dabbs, 2012)(Figura 4-7). Uno con infiltrado en la periferia multifocal linfoplasmocitario moderado.
		III	1	Infiltrado interno difuso linfoplasmocitario moderado.
		I	0	No se observaron lesiones de este tipo.
CDIS PAPILAR	7	II	5	Dos no tenían infiltrado. Dos con infiltrado interno focal linfoplasmocitario leve. Uno con infiltrado en la periferia e interno difuso linfoplasmocitario moderado.
		III	2	Una con infiltrado interno focal linfoplasmocitario leve. Una con infiltrado interno multifocal linfoplasmocitario moderado.
		I	5	Cinco no tenían infiltrado
CDIS MICROPAPILAR	8	II	2	Uno con infiltrado en la periferia focal linfoplasmocitario leve. Uno con infiltrado en la periferia e interno multifocal linfoplasmocitario leve
		III	1	No presentó infiltrado inflamatorio.
		I	1	Presentó infiltrado interno multifocal linfoplasmocitario moderado.
CDIS SOLIDO	5	II	2	No tenían infiltrado
		III	2	Una sin infiltrado. Una con infiltrado

				interno focal linfoplasmocitario leve.
		I	0	No se observaron lesiones de este tipo.
CDIS COMEDOCARCINOMA	5	II	0	No se observaron lesiones de este tipo.
		III	5	Dos no tenían infiltrado. Uno con infiltrado interno multifocal linfoplasmocitario leve. Uno con infiltrado interno difuso linfoplasmocitario severo. Una con infiltrado en la periferia difuso linfoplasmocitario leve y también interno multifocal linfoplasmocitario moderado
CaC	8	En seis se observó en el interior y en la periferia infiltrado multifocal linfoplasmocitario severo y de macrófagos moderado algunos con pigmentos en su citoplasma.		
Cal	7	Todos los <i>Cal</i> (7) tuvieron en el interior y en la periferia infiltrado multifocal MN principalmente linfoplasmocitario con menos macrófagos algunos con pigmentos; estos infiltrados fueron de diferentes grados: leve (uno), moderado (uno) y severo (cinco) (Figura 4-8).		

Figura 4-7: CLIS grado intermedio. Macrófagos con pigmentos en su citoplasma, algunos con gránulos PAS positivos (ocrocitos). PAS 400x.

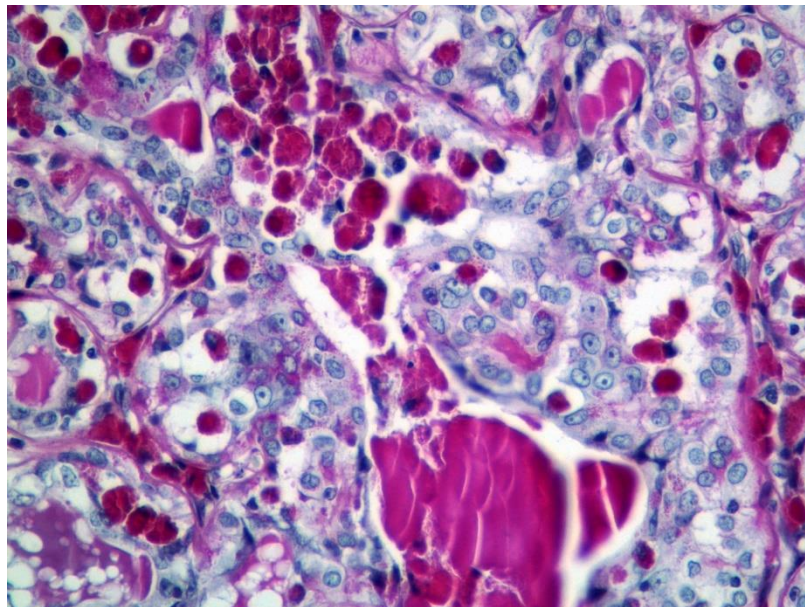
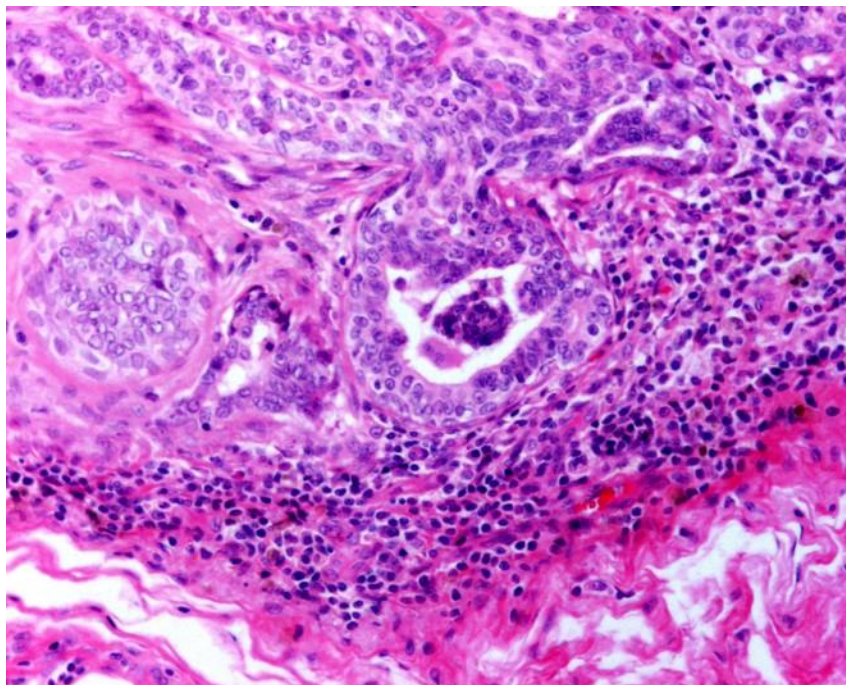


Figura 4-8: Cal. Foco de infiltrado linfoplasmocitario severo en la periferia de la lesión. HE. 200x.



4.6 Discusión

La importancia del “microambiente” – o lo que tradicionalmente se ha conocido como estroma- en el inicio, evolución y consecuencias de los procesos neoplásicos cobra cada día más importancia (Allen and Jones, 2011); en el caso particular de los tumores de seno de mujeres, se ha demostrado que los fibroblastos asociados con los carcinomas secretan exosomas CD81 +, que son endocitados por las células epiteliales neoplásicas, una vez endocitados inducen a la invasión a estas células a través de la señalización de WNT-PCP la cual modifica su polaridad para conducir su comportamiento invasivo (Luga et al., 2012; Cheung and Ewald, 2014).

El así denominado microambiente está constituido por la MB, la matriz extracelular, los fibroblastos, los vasos sanguíneos y linfáticos, las fibras del TC y los leucocitos (Cichon et al., 2010). En nuestro conocimiento este es el primer estudio que analiza los cambios histológicos tempranos de varios de los componentes del microambiente – la MB que rodea el epitelio glandular, el TC y el infiltrado leucocitario- que rodea las LIEs de GM en caninas sin signos clínicos de tumor.

Tanto la MB como el TC en este trabajo demostraron estar alterados (engrosados) de forma significativa ($p < 0,0001$ y $p < 0,0001$), respectivamente, desde los primeros estadios de evolución de las LIEs con algún comportamiento de malignidad, es decir, en aquellas de tipo preinvasivo (Ca in situ) o abiertamente invasivas (CaI). El 96,5% de las lesiones preinvasivas que obtuvieron grado nuclear II o III mostraron engrosamiento de la

MB, esto es el 67% del total de las lesiones de alto riesgo morfológico; en tanto que en el 93% de las patologías de grado nuclear I no se observó alteración alguna de la MB. De igual forma, el aumento en la densidad del TC está significativamente relacionado con el aumento del grado nuclear: 57% vs 40% en los de bajo grado. Con base en estos resultados se puede concluir que en tanto aumenta el grado de malignidad de la porción epitelial de los tumores mamarios de caninas igualmente aumenta la cantidad de dos de los componentes inmediatos del intersticio o microambiente que acompaña a dichas lesiones: la membrana basal y el tejido conectivo; esto concuerda con lo reportado en lesiones tempranas de alto riesgo morfológico en mujeres (Wetzels et al., 1989; Tanner, 2012). Este incremento en la densidad de la MB posiblemente es la expresión morfológica de cambios de la organización y producción del colágeno. Al aumentar el grosor de la MB se incrementa su rigidez, lo cual a su vez favorece la transformación epitelial-mesenquimal es decir que las células epiteliales expresen un fenotipo mesenquimal que se caracteriza por aumento de la expresión de N-cadherina la cual es oncogénica (Chen et al., 2013); los mecanismos por los cuales la rigidez de la MB podría aumentar la migración y el cambio del fenotipo de células epiteliales malignas implican la modificación de receptores para colágeno, incluyendo el dominio extracelular de las integrinas que se une a la secuencia tripéptido RGD (Arg-Gly-Asp) presente en la laminina y la fibronectina, dos componentes destacados de la MB. Aún más, el receptor de dominio discoidina 1 es una proteína transmembrana de las células epiteliales de mama, el cual pertenece a la familia de receptores tirosina kinasa; el papel de este dominio se basa en sus interacciones con una gran variedad de moléculas como factores de crecimiento, fosfolípidos y lípidos neutros, galactosa y colágenos participando en adhesión celular, migración y organogénesis, particularmente se describe que se activa con el colágeno tipo I que induce una fosforilación de las tirosinas del dominio kinasa esto mejora la migración de células de carcinoma mamario in vitro (Egeblad et al., 2010). El engrosamiento de la MB también se ha descrito para los carcinomas de colon, estómago y el Ca escamocelular oral en humanos, los cuales en su progresión biológica incrementan la expresión de las proteínas de la MB; esto confirma que en cáncer los componentes de la membrana basal no sólo se degradan durante la progresión del tumor, sino que también son resintetizados en la parte del frente de invasión (Kulasekara et al., 2009).

En este trabajo en los Cal además de la interrupción o ruptura de la MB, fue igualmente notorio el engrosamiento de esta estructura en todas estas lesiones. Este último cambio es muy significativo si se tiene en cuenta que en tanto que los CIS de alto y grado intermedio en su mayoría (96,5%) tenían engrosamiento de la MB al igual que los Cal (100%), no así los CaC, permitiría sugerir este hallazgo una línea continua evolutiva de CIS a Cal.

De forma sorprendente la MB no mostró cambio alguno en la periferia de los CaC y muestra su utilidad para delimitarlos en su contorno como lesiones in situ. Si bien resulta un poco arriesgado, se podría especular que justamente el hecho de que estas lesiones cuenten con una importante cantidad de células mioepiteliales confirmaría que estas son fuente importante de componentes “apropiados” de la MB, lo cual explicaría porque ninguna de estas alteraciones demostró engrosamiento de esta estructura y a su vez serviría de soporte para la hipótesis de que las células epiteliales de este tipo de lesiones tendrían un comportamiento “menos maligno” que aquellas en que se encuentra solo el componente epitelial; de hecho, se considera que los tumores manifiestos de CaC tienen

mejor pronóstico que aquellos compuesto únicamente de células epiteliales (Santos et al., 2013). Al igual que en la mujer, las células epiteliales o mioepiteliales de LIEs de GM potencialmente malignas de caninas atraviesan la MB secretando metaloproteinasas que degradan la matriz y catepsina que destruye glucoproteínas distintas del colágeno y los proteoglicanos, con lo que las células tumorales pueden penetrar en el tejido conjuntivo destruido (Cox and Erler, 2011; Tanner, 2012). Hoy en día se le da especial relevancia tanto a las células mioepiteliales como a la MB en el progreso de las lesiones malignas (Cichon et al., 2010); las interacciones paracrinas entre las células epiteliales y mioepiteliales lumbinales son importantes para la regulación de la progresión del ciclo celular normal, el establecimiento de la polaridad celular epitelial, y la inhibición de la migración celular y la invasión. Sobre la base de estas funciones, las células mioepiteliales mamarias normales han sido llamadas "células supresoras tumorales naturales" (Polyak and Hu, 2005) debido a que secretan altas cantidades de inhibidores de proteasas y de diversos inhibidores angiogénicos en ductos normales (Barsky and Karlin, 2005).

En los Ca invasivos de seno de mujeres se resalta la degradación de la MB por cambios en el fenotipo molecular de: 1) Las células mioepiteliales: como se dijo, normalmente por secreción autocrina y paracrina suprimen la proliferación de las células epiteliales, sin embargo, cuando se relacionan con carcinomas muestran alta expresión de catepsinas F, K y L, metaloproteinasa 2 y citocinas CXCL12/SDF-1 y CXCL14, las cuales han sido implicadas como promotores del ciclo celular, migración e invasión (Sgroi, 2010); también se reporta que las células mioepiteliales asociadas a los carcinomas sufren cambios genéticos y en su fenotipo perdiendo la capacidad de sintetizar suficiente laminina-1 por lo que las células epiteliales no mantienen su polaridad (Gudjonsson et al., 2002). 2) Los fibroblastos: éstos son atraídos al sitio por las células epiteliales, los que secretan factor de crecimiento derivado de plaquetas, la estromelina-3, el factor de crecimiento insulínico tipo 2 (IGF-2), el inhibidor tisular de metaloproteinasas tipo 1 (TIMP-1) y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) favoreciendo la desmoplasia, la angiogénesis y la progresión del tumor de CDIS a Cal (Elenbaas and Weinberg, 2001). 3) Miofibroblastos: expresan genes relacionados con catepsina F, K y L, metaloproteinasa 2 (MMP2) y citocinas como el factor derivado del estroma 1 (SDF-1/CXCL12) que promueven el crecimiento del epitelio neoplásico en los carcinomas por la estimulación paracrina (Sgroi, 2010). Y 4) Infiltración de leucocitos, particularmente para los linfocitos se describe que secretan el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento básico de fibroblastos, que inducen desmoplasia, linfangiogénesis y angiogénesis, lo que favorece la diseminación de las células malignas a través de vasos linfáticos a los ganglios linfáticos (Gisterek et al., 2008).

Para tumores mamarios benignos manifiestos de caninas bien desarrollados se reporta que las MB se encuentran intactas, discontinuas en los tumores malignos y ausentes en carcinomas pobremente diferenciados; también se documenta que un aumento en el grado de malignidad se acompaña con engrosamiento de la MB usando IHQ para laminina, colágeno tipo IV y VII (Benazzi et al., 1993); con las correspondientes precauciones debidas al tipo de muestras de estos autores y de nuestra investigación, el estado de la MB en ambos estudios coincide de manera significativa en lo relativo a los tumores/lesiones benignas y tumores/ Cal, respectivamente. No hay coincidencia entre las lesiones de tipo complejo de este trabajo y aquellas de la misma naturaleza en el

reporte de Benazzi et al. (1993). Pues ellos informan una sobreproducción de los componentes de la MB. Esto sugiere que la producción de los componentes de la membrana basal en lesiones complejas cambia siendo mayor en tumores manifiestos vs los estadios tempranos de estas lesiones.

El TC en las LIEs de este estudio demostró tres patrones morfológicos: laxo, frecuente en las hiperplasias complejas; denso, el cual se asoció de manera estadísticamente significativa con los CIS y en particular con los CIS de grado nuclear intermedio y alto; igualmente su presencia fue significativamente más alta alrededor de los carcinomas invasivos, mientras que las mezclas de densidades estuvieron asociadas con lesiones complejas. Al igual que en el caso de la MB resulta llamativo el hecho de que aquellas lesiones de carácter más agresivo: CIS y Cal mostraron mayor grado de actividad de su TC: esto indica que en caninas como en mujeres las lesiones de mayor grado evidentemente tienen una mayor actividad de estos componentes del microambiente (Bissell et al., 2002; Boudreau et al., 2012), con lo cual se ratificaría que esta parte del componente tumoral juega un papel más importante del que hasta ahora se le ha reconocido. También se ha documentado este cambio del TC para las neoplasias mamarias manifiestas de caninas las cuales, independiente de que sean benignas o malignas, presentan con frecuencia una abundante cantidad de matriz extracelular y metaplasia (Martins et al., 2002). Estos autores describen mayor frecuencia de expresión de desmoplasia y metaplasia en el estroma de los carcinomas complejos, y proponen que durante la progresión del tumor ocurre un aumento de la inestabilidad genética de las células neoplásicas que influye sobre las células mioepiteliales lo que las hace perder su actividad supresora de tumores, sin embargo, se debe señalar que estos autores no trabajaron con lesiones tempranas, trabajaron tumores bien manifiestos (Martins et al., 2002).

La desmoplasia describe un patrón histológico que se caracteriza por un estroma hialinizado con un infiltrado celular mínimo. En las neoplasias de seno de mujer, este patrón de respuesta del estroma está clásicamente asociado con malignidad (Abbas and Mahalingam, 2011). Probablemente operen mecanismos moleculares similares a los descritos en mujeres; esto es, que en caninas existirían fibroblastos que se activan y están relacionados con la progresión de estas lesiones y secretan factores de crecimiento (TGF β , IGF, PDGF), citoquinas (IL6, IL8), metaloproteinasas (MMP-2, MMP-3 y MMP-9) y especies reactivas de hidrógeno (peróxido de hidrógeno) los cuales favorecen el crecimiento de la neoplasia (Jeziarska-Drutel et al., 2013).

Se describe en esta investigación la presencia de miofibroblastos en las lesiones malignas: tres CIS y un Cal; aunque no se habían documentado estas células en lesiones tempranas en caninas, para tumores manifiestos bien desarrollados se reportan en mayor frecuencia en el interior de carcinomas simples que en adenomas simples de GM de esta especie, estas células promueven el crecimiento del tumor, la migración e invasión (SgROI, 2010; Yoshimura et al., 2011)

En cuanto al infiltrado leucocitario en esta investigación muestra que las líneas más frecuentes que se encuentran en el interior y alrededor de estas lesiones son los linfocitos, las células plasmáticas y los macrófagos. Entender la interacción y asociación entre la respuesta inmune y el desarrollo del tumor es relevante no solo para comprender el proceso de carcinogénesis sino también se ha demostrado que tiene importancia

pronóstica en tumores de caninas (Estrela-Lima et al., 2010). Estrela-Lima et al. (2010) describen para caninas una disminución de la infiltración de leucocitos a medida que aumenta el grado de malignidad del carcinoma y también reportan que determinar el fenotipo de los linfocitos es útil como examen complementario para establecer el pronóstico de la lesión, siendo las GM neoplásicas con mayores cantidades de linfocitos T CD8 las de menos probabilidad de metástasis y alta supervivencia y las GM neoplásicas que tienen más LT CD4 las de peor pronóstico; aunque el recuento de leucocitos en esta investigación se hizo con una técnica poco sensible como la H&E y por lo tanto no era indicado un estudio estadístico como el de otras variables (MB y TC), por lo menos en cuanto a su número global, una observación detenida de la Tabla 4-6 parece señalar una mayor cantidad de leucocitos en los Cal, lo cual estaría en contraste con los hallazgos de los anteriores autores; de todas formas, es claro que de nuestra parte se deben implementar técnicas más específicas como las utilizadas en otros estudios.

Con todo, y sin perjuicio de la necesidad de caracterizar y determinar de mejor forma la cantidad de los leucocitos que se relacionan con las LIEs en este trabajo, no podemos dejar pasar desapercibido el hecho de que en el "frente de avance" de la lesión propuesta como "lóbulo enfermo" (sick lobe), descrito en detalle en el capítulo 2, se encontró una población de leucocitos en estrecha relación con los acinos con alteraciones morfológicas propias de malignidad. Según la teoría del lóbulo enfermo, ocurren mutaciones en las células malignas y las células del estroma circundante las cuales conducen a una pérdida de la regulación del balance epitelio-estroma; en consecuencia, las células epiteliales cancerosas pierden su capacidad para mantener la capa mioepitelial y la MB alrededor de los conductos y lóbulos normales, entonces el estroma contiguo a estas células malignas sufre remodelación que se caracteriza porque los linfocitos se encuentran en el frente de avance de la lesión maligna y hay desmoplasia. Los datos actuales sobre estas alteraciones moleculares en el estroma y el creciente reconocimiento de la importancia de las interacciones epitelio-estroma plantean la posibilidad de que tanto el componente estromal, como el componente epitelial son anormales en el "lóbulo enfermo" (Tot, 2011). Las principales hipótesis de cómo la infiltración de leucocitos promueve la invasión tumoral y la metástasis para la glándula mamaria son: Los macrófagos responden a la señalización paracrina del tumor y una vez adentro interrumpen las uniones intercelulares y modifican las moléculas de adhesión de la superficie celular, haciendo que ocurra disociación entre las células tumorales desde el núcleo del tumor, estos macrófagos fusionan su membrana plasmática con las tumorales, creando quimeras de macrófagos células tumorales; posteriormente estos macrófagos imparten capacidad migratoria a las células tumorales arrastrándolas físicamente a diferentes sitios del tejido (Man et al., 2011). De acuerdo con esta hipótesis los macrófagos son reclutados en el frente invasivo mediante la expresión de factores quimiotácticos que provienen del tumor y en respuesta a la ruptura de la membrana basal. En este sitio los macrófagos mejoran la migración de las células tumorales y la invasión a través de la secreción de factores quimiotácticos como los descritos arriba. –Una segunda hipótesis se relaciona con la mediación de otros componente del sistema inmune: En este caso los linfocitos T CD4+ expresan IL-4 la cual promueve indirectamente la invasión y posterior metástasis de adenocarcinomas mamarios mediante la atracción de células mieloides inmaduras tales como macrófagos CD11b+ Gr1-F4/80+, estas se describen como una población con una potente actividad inmunosupresora que a su vez mejora la capacidad de metástasis a través de la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico de señalización en las células epiteliales mamarias malignas. En resumen, lo anterior sugiere que los

leucocitos que infiltran el tumor pueden afectar, directa o indirectamente, su progresión a través de múltiples vías y mecanismos (Man et al., 2013).

En conclusión, este estudio demuestra por primera vez que en lesiones tempranas preinvasivas e invasivas de GM de caninas se da un aumento en la cantidad de la MB y el TC el cual es estadísticamente significativo, este aumento se vio solo en una de las lesiones tempranas de carácter netamente benigno; este hallazgo confirmaría lo documentado para las LIEs mamarias de mujer, en el sentido de que cambios como los acá descritos son un indicador importante de potencial o abierta malignidad. De forma similar a lo reportado para la teoría de lóbulo enfermo propuesto en tumores mamarios de humanas, en esta investigación se demostró la presencia de leucocitos en el “frente de avance” del componente maligno que pudieran jugar un papel semejante a los de su contraparte humana. Finalmente, se resalta la ausencia del aumento de grosor de la MB en las lesiones de CaC de las caninas y se especula sobre el potencial papel de las células mioepiteliales en este estado de cosas y se sugiere el posible significado pronóstico de estos hallazgos para este tipo de patologías

4.7 Bibliografía

Abbas, O., Mahalingam, M., 2011. Desmoplasia: not always a bad thing. *Histopathology* 58, 643-659.

Allen, M., Jones, L.J. 2011. Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *J Pathol*, 223(2):162-76.

Antuofermo, E., Miller, M.A., Pirino, S., Xie, J., Badve, S., Mohammed, S.I., 2007. Spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs - A model of breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 16, 2247-2256.

Barsky, S.H., Karlin, N.J. 2005. Myoepithelial cells: autocrine and paracrine suppressors of breast cancer progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 10(3):249-60.

Benazzi C1, Sarli G, Galeotti M, Marcato PS. 1993. Basement membrane components in mammary tumours of the dog and cat. *J Comp Pathol*, 109(3):241-52.

Bissell, M.J., Radisky, D.C., Rizki, A., Weaver, V.M., Petersen, O.W. 2002. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation*, 70(9-10):537-46.

Boudreau, A., van't Veer, L.J., Bissell, M.J. 2012. An "elite hacker": breast tumors exploit the normal microenvironment program to instruct their progression and biological diversity. *Cell Adh Migr*, 6(3):236-48.

Caicedo, J.A., Iregui, C.A., 2014. Intraepithelial Lesions (IELs) in mammary glands of dogs without clinical evidence of tumors, Bogotá-Colombia, SA. LCPG Presentations in

ACVP&ASVCP 2014 Concurrent Annual Meeting. Atlanta – Georgia, USA (November 10th 2014).

Cichon, M.A., Degnim, A.C., Visscher, D.W., Radisky, D.C. 2010. Microenvironmental influences that drive progression from benign breast disease to invasive breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 15(4):389-97.

Chen, Q.K., Lee, K., Radisky, D.C., Nelson, C.M. 2013. Extracellular matrix proteins regulate epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Differentiation*, 86(3):126-32.

Cheung, K.J., Ewald, A.J. 2014. Illuminating breast cancer invasion: diverse roles for cell-cell interactions. *Curr Opin Cell Biol*, 30:99-111.

Cox, T.R., Erler, J.T. 2011. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech*, 4(2):165-78.

Dabbs, D.J., 2012. Breast pathology. Elsevier Health Sciences.

Davies, J.A., 2001. Extracellular Matrix, in *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group. Pag 1-7.

Egeblad, M., Rasch, M.G., Weaver, V.M. 2010. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Curr Opin Cell Biol* 22:697–706.

Elenbaas, B., Weinberg, R. A. 2001. Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp Cell Res*, 264(1):169-84.

Estrela-Lima, A., Araujo, M.S.S., Costa-Neto, J.M., Teixeira-Carvalho, A., Barrouin-Melo, S.M., Cardoso, S.V., Martins, O.A., Serakides, R., Cassali, G.D., 2010. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. *Bmc Cancer* 10.

Fata, J.E., Werb, Z., Bissell, M.J., 2003. Regulation of mammary gland branching morphogenesis by the extracellular matrix and its remodeling enzymes. *Breast cancer research* 6, 1.

Ferreira, E., Gobbi, H., Saraiva, B.S., Cassali, G.D., 2010. Columnar cell lesions of the canine mammary gland: pathological features and immunophenotypic analysis. *Bmc Cancer* 10, 7.

Gisterek, I., Frydecka, I., Świątoniowski, G., Fidler, S., Kornafel. 2008. Tumour-infiltrating CD4 and CD8 T lymphocytes in breast cancer-Review Article. *Rep Pract Oncol Radiother*, 13(4): pp. 205–208

Goldschmidt, M., Pena, L., Rasotto, R., Zappulli, V., 2011. Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology Online* 48, 117-131.

Gudjonsson, T., Rønnov-Jessen, L., Villadsen, R., Rank, F., Bissell, M.J., Petersen, O.W. 2002. Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. *J Cell Sci*, 115(Pt 1):39-50.

Harunaga, J.S., Doyle, A.D., Yamada, K.M. 2014. Local and global dynamics of the basement membrane during branching morphogenesis require protease activity and actomyosin contractility. *Dev Biol*, 394(2):197-205.

Jeziarska-Drutel, A., Rosenzweig, S.A., Neumann, C.A. 2013. Role of oxidative stress and the microenvironment in breast cancer development and progression. *Adv Cancer Res*, 119:107-25

Kass, L., Eler, J.T., Dembo, M., Weaver, V.M., 2007. Mammary epithelial cell: Influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumorigenesis. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, 1987-1994.

Klopfleisch, R., von Euler, H., Sarli, G., Pinho, S.S., Gartner, F., Gruber, A.D., 2011. Molecular Carcinogenesis of Canine Mammary Tumors: News From an Old Disease. *Veterinary Pathology* 48, 98-116.

Kulasekara, K.K., Lukandu, O.M., Neppelberg, E., Vintermyr, O.K., Johannessen, A.C., Costea, D.E. 2009. Cancer progression is associated with increased expression of basement membrane proteins in three-dimensional in vitro models of human oral cancer. *Arch Oral Biol*, 54(10):924-31.

Lester, S.C., Bose, S., Chen, Y.-Y., Connolly, J.L., de Baca, M.E., Fitzgibbons, P.L., Hayes, D.F., Kleer, C., O'Malley, F.P., Page, D.L., 2009. Protocol for the examination of specimens from patients with ductal carcinoma in situ of the breast. *Archives of pathology & laboratory medicine* 133, 15-25.

Lopez-Garcia, M.A., Geyer, F.C., Lacroix-Triki, M., Marchió, C., Reis-Filho, J.S., 2010. Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways. *Histopathology* 57, 171-192.

Luga, V., Zhang, L., Vitoria-Petit, A.M., Ogunjimi, A.A., Inanlou, M.R., Chiu, E., Buchanan, M., Hosein, A.N., Basik, M., Wrana, J.L. 2012. Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell* 151(7):1542-56.

Man, Y., Grinkemeyer, M., Izadjoo, M., Stojadinovic A., 2011. Malignant Transformation and Stromal Invasion from Normal or Hyper-plastic Tissues: True or False?. *Journal of Cancer* 2, 413-424

Man, Y.G., Stojadinovic, A., Mason, J., Avital, I., Bilchik, A., Bruecher, B., Protic, M., Nissan, A., Izadjoo, M., Zhang, X., Jewett, A. 2013. Tumor-infiltrating immune cells promoting tumor invasion and metastasis: existing theories. *J Cancer*, 4(1):84-95.

-
- Marsh, T., Pietras, K., McAllister, S.S. 2013. Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1832(7):1070-8.
- Martins, A., Tamaso, E., Guerra, J., 2002. Retrospective review and systematic study of mammary tumors in dogs and characteristics of the extracellular matrix. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 39, 38-42.
- Mouser, P., Miller, M.A., Antuofermo, E., Badve, S.S., Mohammed, S.I., 2010. Prevalence and Classification of Spontaneous Mammary Intraepithelial Lesions in Dogs Without Clinical Mammary Disease. *Veterinary Pathology* 47, 275-284.
- O'Malley, F.P., Pinder, S.E., Mulligan, A.M., 2011. *Breast Pathology: A Volume in the Series: Foundations in Diagnostic Pathology (Expert Consult-Online)*. Elsevier Health Sciences.
- Polyak, K., Hu, M. 2005. Do myoepithelial cells hold the key for breast tumor progression? *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 10(3):231-47.
- Rønnov-Jessen, L., Bissell, M.J. 2009. Breast cancer by proxy: can the microenvironment be both the cause and consequence? *Trends Mol Med*, 15(1):5-13.
- Rosen, P., 2009. Papilloma and related benign tumors. *Rosens Breast pathology.*, 3rd edition, Lippincot, Williams & Wilkins edits., Philadelphia (USA), 101-108.
- Rowe, R.G., Weiss, S.J. 2008. Breaching the basement membrane: who, when and how? *Trends Cell Biol*, 18(11):560-74
- Santos, A.A., Lopes, C.C., Ribeiro, J.R., Martins, L.R., Santos, J.C., Amorim, I.F., Gärtner, F., Matos, A. J. 2013. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. *BMC Veterinary Research* 4; 9: 1.
- Sgroi, D.C. 2010. Preinvasive breast cancer. *Annu Rev Pathol*, 5:193-221.
- Simian, M., Hirai, Y., Navre, M., Werb, Z., Lochter, A., Bissell, M.J. 2001. The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Development*, 128(16):3117-31.
- Sorenmo, K.U., Rasotto, R., Zappulli, V., Goldschmidt, M.H. 2011. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Vet Pathol*, 48(1):85-97.
- Tanner K. 1012. Regulation of the basement membrane by epithelia generated forces. *Phys Biol*, 9(6): 065003.
- Tot, T., 2011. "The theory of the sick lobe," in *Breast Cancer: A Lobar Disease*, T. Tot, Ed., Springer, London, UK, 1–18.
- Videira, M., Reis, R.L., Brito, M.A. 2014. Deconstructing breast cancer cell biology and the mechanisms of multidrug resistance. *Biochim Biophys Acta*, 1846(2):312-325.

Wetzels, R.H., Holland, R., van Haelst, U.J., Lane, E.B., Leigh, I.M., Ramaekers, F.C. 1989. Detection of basement membrane components and basal cell keratin 14 in noninvasive and invasive carcinomas of the breast. *Am J Pathol*, 134(3):571-9.

Yoshimura, H., Michishita, M., Ohkusu-Tsukada, K., Takahashi, K. 2011. Increased presence of stromal myofibroblasts and tenascin-C with malignant progression in canine mammary tumors. *Vet Pathol*, 48(1):313-21.

4.8 Recomendaciones

Se deben realizar estudios de inmunohistoquímica que busquen posibles cambios en el fenotipo de estas células del microambiente que posiblemente contribuyen con la progresión de estas lesiones a tumores mamarios.

5. Conclusiones

5.1 Conclusiones

Este estudio demuestra que en hembras caninas sin signos clínicos se presentan LIEs en GM y por lo tanto la toma de muestras debiera estar siempre acompañada de imágenes diagnósticas para todas las GM no solo la afectada.

Ratifica la predilección de las caninas mestizas en nuestro medio a sufrir neoplasias mamarias.

Revalida que se debe revisar o por lo menos precisar de mejor forma el término de LIEs para estas alteraciones; y propone el vocablo lesiones proliferativas intraductales (LPI) de glándula mamaria limita el término al sistema lobular y tubular.

Corroboración que la presencia de LIEs en hembras caninas sin signos clínicos es más frecuente en las glándulas abdominales e inguinales que en las torácicas.

Confirma los criterios de polaridad nuclear, tamaño nuclear, patrón de la cromatina (vesiculosa o densa), número y apariencia de nucléolos (ocasionales, prominentes o múltiples), la cantidad de mitosis permiten conocer si la lesión tiene riesgo bajo, intermedio o alto en progresar a un carcinoma invasivo.

Soporta la hipótesis de que las lesiones espontáneas malignas tienen un carácter maligno desde sus inicios, mostrándolo en lesiones lobulillares que surgen de Novo espontáneamente en un lobulillo en el que aún persisten algunos acinos "normales morfológicamente". En nuestra opinión estos hallazgos no descritos antes en patología veterinaria son afines con la teoría del "sick lobe" de carcinogénesis de seno en mujeres, la cual postula que el carcinoma de mama es una enfermedad lobar en la cual los focos tumorales aparecen simultáneamente o de forma asíncrona y se desarrollan dentro de un único lóbulo enfermo.

En este estudio se reporta la coexistencia de lesiones preinvasivas con carcinomas invasivos, lo que sugiere que en verdad la progresión de los Ca mamarios en caninas sería a partir de lesiones que desde sus inicios muestran claras características morfológicas de malignidad (como los CIS) para luego avanzar a lesiones abiertamente invasivas.

Según nuestra información, este es el primer estudio que describe displasias de origen complejo: hiperplasia compleja y carcinoma complejo, hasta ahora no descritas en patología veterinaria, pero que tienen su contraparte en tumores manifiestos clínicamente.

Demuestra que la clasificación actual de las LIEs de hembras caninas no es definitiva, que se deben separar las lesiones netamente ductales de las lobulares y aporta información novedosa para plantear nuevas hipótesis para entender la carcinogénesis de esta enfermedad sustentada en la teoría del lóbulo enfermo.

Afirma que la expresión de galectina-3 en LIEs de caninas no es un rasgo importante en la evolución de las lesiones malignas mamarias en sus primeros estadios de desarrollo y que se deben investigar otras vías metabólicas que pudieran tener mayor significado.

Comprueba que en tanto aumenta el grado de malignidad de la porción epitelial de los tumores mamarios de caninas igualmente se modifica la densidad de dos de los componentes inmediatos del microambiente que acompaña a dichas LIEs: la membrana basal y el tejido conectivo; y, en particular esto ocurre en los CIS de grado nuclear intermedio y alto; igualmente su presencia fue significativamente más alta alrededor de los carcinomas invasivos, mientras que las mezclas de densidades del TC estuvieron asociadas con lesiones complejas.

Se describe en esta investigación la presencia de miofibroblastos en las lesiones malignas: que en nuestro conocimiento no se han documentado en lesiones tempranas de GM en caninas.

Muestra que los leucocitos más frecuentes que se encuentran en el interior y alrededor de estas LIEs son los linfocitos, las células plasmáticas y los macrófagos. Pudiendo tener un papel importante en la carcinogénesis de esta neoplasia.

Ratifica que las hembras caninas son un modelo de investigación en la carcinogénesis de los tumores mamarios pues presentan similitud, morfológica con las lesiones de su contraparte en el cáncer de seno de la mujer

A. Anexo: Procedimientos para inmunohistoquímica de galectina-3

Conservación del anticuerpo anti-galectina 3 y del kit de revelado Dako

Conservar en refrigeración 4-7°C

Materiales y reactivos

- Anticuerpo monoclonal anti-Gal 3 (Novocastra) producido en ratón. Dilución recomendada 1:100
- Cloruro de Sodio
- Leche descremada
- Tris Base
- Tween 20
- Peróxido de hidrógeno
- Hematoxilina de Meyer
- Sistema de detección EnVision +/-HRP IgG anti-conejo de Cabra. Dako-Cytomation; HRP-labeled polymer conjugate
- Cromógeno DAB. Dako-Cytomation
- Etanol
- Agua destilada
- Xilol

Instrumental

Pipetas de 1000 y 2-10 µl

Pipetas Pasteur

Probetas de 1000 y 25 ml

Falcon N°15 ml

Preparación de reactivos

1. Preparación de 500 ml de Tris-EDTA:
0,605 g Tris + 0,185g EDTA + 500 ml agua destilada.
2. Preparación de 1000 ml de TBS-Tween pH 7.

Pesar 6.06 gramos de Trizma Base

Pesar 17.5 gramos de NaCl

Disolver en 800 ml de H₂O destilada

Ajustar el pH a 7.6 con HCL o NaOH con concentración molar conocida (1N).

Ajustar el volumen a 800 ml.

Adicionar 0.5 ml de Tween 20
Completar a 1000 ml (1L) con agua destilada.
Guardar en refrigeración hasta su uso (máximo 1 mes).

3. Preparación de 200 ml de H₂O₂ al 3%:

$$V_i * C_i = V_f * C_f$$

$$? 30\% = 200\text{ml} * 3\%$$

$$200\text{ml} * 3\%$$

$$\text{-----} = 20 \text{ ml de H}_2\text{O}_2$$

$$30 \% \text{ H}_2\text{O}_2$$

Tomar 20 ml de H₂O₂ y adicionar 180 ml de Etanol

4. Preparación de 100 ml de TBST con leche descremada al 5%:

Tomar 100 ml de TBST y adicionar 5 g de leche descremada

5. Preparación de la solución 1:100 de Galectina 3 para 5 láminas:

Tomar 1000 µl de TBST, retirar 100 µl y adicionar 100 µl de anti- galectina 3 de ratón, para formar una dilución de 1:100. Aplicar Vortex

6. Preparación: solución DAB para revelado de la reacción:

Mezclar 1 ml del búfer sustrato de DAB y una gota (25 a 30 µl) de DAB cromógeno en un vial, llevar inmediatamente al Vortex.

7. Preparación del agua amoniacal

100 de H₂O destilada + 2 ml de hidróxido de amonio al 28%

Bibliografía

Abbas, O., Mahalingam, M., 2011. Desmoplasia: not always a bad thing. *Histopathology* 58, 643-659.

Allen, M., Jones, L.J. 2011. Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *J Pathol*, 223(2):162-76.

Antuofermo, E., Miller, M.A., Pirino, S., Xie, J., Badve, S., Mohammed, S.I., 2007. Spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs - A model of breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 16, 2247-2256.

Barsky, S.H., Karlin, N.J. 2005. Myoepithelial cells: autocrine and paracrine suppressors of breast cancer progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 10(3):249-60.

Benazzi C1, Sarli G, Galeotti M, Marcato PS. 1993. Basement membrane components in mammary tumours of the dog and cat. *J Comp Pathol*, 109(3):241-52.

Bissell, M.J., Radisky, D.C., Rizki, A., Weaver, V.M., Petersen, O.W. 2002. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation*, 70(9-10):537-46.

Boudreau, A., van't Veer, L.J., Bissell, M.J. 2012. An "elite hacker": breast tumors exploit the normal microenvironment program to instruct their progression and biological diversity. *Cell Adh Migr*, 6(3):236-48.

Brockhausen, I., 2006. Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO reports* 7, 599-604.

Brooks, S., Hall, D., Buley, I., 2001. GalNAc glycoprotein expression by breast cell lines, primary breast cancer and normal breast epithelial membrane. *British journal of cancer* 85, 1014.

Cadieu, E., Ostrander, E., 2007. Canine genetics offers new mechanisms for the study of human cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 16, 2181.

Caicedo, J.A., Iregui, C.A., Cabarcas, M.E., Acosta, B.J., 2012. Estudio comparativo de la frecuencia de tumores mamarios según sexo, edad y tipo histológico en caninos y humanos en los laboratorios de patología anatómica de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. *Revista Colombiana de Ciencia Animal* 5, 37-46.

Caicedo, J.A., Iregui, C.A., 2014. Intraepithelial Lesions (IELs) in mammary glands of dogs without clinical evidence of tumors, Bogotá-Colombia, SA. LCPG Presentations in ACVP&ASVCP 2014 Concurrent Annual Meeting. Atlanta – Georgia, USA (November 10th 2014).

Castronovo V., Van Den Brûle F.A., Jackers P., Clause N., Liu F.T., Gillet C., Sobel M.E., 1996. Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer. *The Journal of Pathology* 179, 43-48.

Cay, T., 2012. Immunohistochemical expression of galectin-3 in cancer: a review of the literature. *Turk Patoloji Derg* 28(1), 1-10

Cazet, A., Julien, S., Bobowski, M., Burchell, J., Delannoy, P., 2010. Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. *Breast Cancer Res* 12(3), 204.

Chen, G., Zou, Q., Yang, Z., 2010. Expression of galectin-3 and Sambucus nigra agglutinin and its clinicopathological significance in benign and malignant lesions of breast]. *Zhong nan da xue xue bao. Yi xue ban= Journal of Central South University. Medical sciences* 35, 584.

Chen, Q.K., Lee, K., Radisky, D.C., Nelson, C.M. 2013. Extracellular matrix proteins regulate epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Differentiation*, 86(3):126-32.

Cheung, K.J., Ewald, A.J. 2014. Illuminating breast cancer invasion: diverse roles for cell-cell interactions. *Curr Opin Cell Biol*, 30:99-111.

Choi, Y.K., Hong, S.H., Kim, B.H., Kim, H.C., Woo, H.J., Kim, D.Y., 2004. Immunohistochemical expression of galectin-3 in canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology* 131, 242-245.

Cichon, M.A., Degnim, A.C., Visscher, D.W., Radisky, D.C. 2010. Microenvironmental influences that drive progression from benign breast disease to invasive breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 15(4):389-97.

Clarke, R., 1996. Animal models of breast cancer: their diversity and role in biomedical research. *Breast Cancer Res Treat* 39(1), 1-6.

Costarelli, L., Campagna, D., Mauri, M., Fortunato, L., 2012. Intraductal proliferative lesions of the breast—terminology and biology matter: premalignant lesions or preinvasive cancer?. *Int J Surg Oncol*, 2012:501904.

Cox, T.R., Erler, J.T. 2011. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech*, 4(2):165-78.

Dabbs, D.J., 2012. Breast Pathology, Saunders W.B. 1st, editor: Elsevier Health Sciences.

Davies, J.A., 2001. Extracellular Matrix, in Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group. Pag 1-7.

de Oliveira, J.T., de Matos, A.J., Gomes, J., Vilanova, M., Hespanhol, V., Manninen, A., Rutteman, G., Chammas, R., Gärtner, F., Bernardes, E.S., 2010. Coordinated expression of galectin-3 and galectin-3-binding sites in malignant mammary tumors: implications for tumor metastasis. *Glycobiology* 20(11), 1341–1352.

de Oliveira, J.T., de Matos, A.J., Santos, A.L., Pinto, R., Gomes, J., Hespanhol, V., Chammas, R., Manninen, A., Bernardes, E.S., Albuquerque R.C., Rutteman, G., Gärtner F., 2011. Sialylation regulates galectin-3/ligand interplay during mammary tumour progression a case of targeted uncloaking. *Int. J. Dev. Biol.*, 55: 823-834.

de Oliveira, J.T., Gartner, F., 2012. Galectins - Potential Targets in Canine Mammary Tumour Therapy. In: *Canine Behavior, Classification and Diseases*. Nova Science Publishers, Inc.

Donnay, I., Devleeschouwer, N., Wouters-Ballman, P., Leclercq, G., Versteegen, J., 1996. Relationship between receptors for epidermal growth factor and steroid hormones in normal, dysplastic and neoplastic canine mammary tissues. *Research in veterinary science* 60, 251-254.

Egeblad, M., Rasch, M.G., Weaver, V.M. 2010. Dynamic interplay between the collagen

Elenbaas, B., Weinberg, R. A. 2001. Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp Cell Res*, 264(1):169-84.

Estrela-Lima, A., Araujo, M.S.S., Costa-Neto, J.M., Teixeira-Carvalho, A., Barrouin-Melo, S.M., Cardoso, S.V., Martins, O.A., Serakides, R., Cassali, G.D., 2010. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. *Bmc Cancer* 10.

Fata, J.E., Werb, Z., Bissell, M.J., 2003. Regulation of mammary gland branching morphogenesis by the extracellular matrix and its remodeling enzymes. *Breast cancer research* 6, 1.

Ferreira, E., Gobbi, H., Saraiva, B.S., Cassali, G.D., 2010. Columnar cell lesions of the canine mammary gland: pathological features and immunophenotypic analysis. *BMC Cancer* 10, 61.

Gabius, H.J., Andre, S., Kaltner, H., Siebert, H.C., 2002. The sugar code: functional lectinomics. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1572, 165-177.

Galimberti, V., Monti, S., Mastropasqua, MG., 2013. DCIS and LCIS are confusing and outdated terms. They should be abandoned in favor of ductal intraepithelial neoplasia (DIN) and lobular intraepithelial neoplasia (LIN). *Breast* 22(4), 431-5.

Gallegos, B., 2013. El papel de la galectina-3 en el desarrollo del cáncer de mama., in: Blanca Cuevas, E.P.C., Rocío Coutiño y Pedro Hernández Cruz. (Ed.), *Galectina tres en cáncer de mama*. *Revista De Educación Bioquímica: REB*. 32(1): 3-12.

Gama, A., Alves, A., Schmitt, F., 2008. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Archiv* 453, 123-132.

Ghazarian, H., Idoni, B., Oppenheimer, S.B., 2011. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochemica* 113, 236-247.

Gilbertson, S., Kurzman, I., Zachrau, R., Hurvitz, A., Black, M., 1983. Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Veterinary Pathology* 20(2), 127-42.

Gisterek, I., Frydecka, I., Świątoniowski, G., Fidler, S., Kornafel. 2008. Tumour-infiltrating CD4 and CD8 T lymphocytes in breast cancer-Review Article. *Rep Pract Oncol Radiother*, 13(4): pp. 205–208

Goldschmidt, M., Pena, L., Rasotto, R., Zappulli, V., 2011. Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology Online* 48, 117-131.

Granados, J.A.T., 1995. Medidas de prevalencia y relación incidencia-prevalencia. *Med Clin (Barc)* 105, 216-218.

Griffey, S., Madewell, B., Dairkee, S., Hunt, J., Naydan, D., Higgins, R., 1993. Immunohistochemical reactivity of basal and luminal epithelium-specific cytokeratin antibodies within normal and neoplastic canine mammary glands. *Vet Pathol* 30(2):155-61.

Grizzle, W.E., Srivastava, S., Manne, U. 2010. The biology of incipient, pre-invasive or intraepithelial neoplasia. *Cancer Biomark*, 9(1-6):21-39.

Gudjonsson, T., Rønnov-Jessen, L., Villadsen, R., Rank, F., Bissell, M.J., Petersen, O.W. 2002. Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. *J Cell Sci*, 115(Pt 1):39-50.

Hakomori, S., 2002. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 10231.

Harunaga, J.S., Doyle, A.D., Yamada, K.M. 2014. Local and global dynamics of the basement membrane during branching morphogenesis require protease activity and actomyosin contractility. *Dev Biol*, 394(2):197-205.

Hernández, G., Herrán, S., Cantor, L.F., 2007. Análisis de las tendencias de mortalidad por cáncer de mama en Colombia y Bogotá, 1981-2000. *Rev Colomb Cancerol* 11 (1), 32-39.

Honjo, Y., Nangia-Makker, P., Inohara, H., Raz, A., 2001. Down-regulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human breast carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 7(3), 661-8.

Hovey, R.C., Aimo, L., 2010. Diverse and Active Roles for Adipocytes During Mammary Gland Growth and Function. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 15, 279-290.

Im, K.-S., Kim, I.-H., Kim, N.-H., Lim, H.-Y., Kim, J.-H., Sur, J.-H., 2013. Breed-related differences in altered BRCA1 expression, phenotype and subtype in malignant canine mammary tumors. *The Veterinary Journal* 195, 366-372.

Jeziarska-Drutel, A., Rosenzweig, S.A., Neumann, C.A. 2013. Role of oxidative stress and the microenvironment in breast cancer development and progression. *Adv Cancer Res*, 119:107-25

Kass, L., Eler, J.T., Dembo, M., Weaver, V.M., 2007. Mammary epithelial cell: Influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumorigenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 39(11):1987-94.

Kawaguchi, T., Takazawa, H., Imai, S., Morimoto, J., Watanabe, T., Kanno, M., Igarashi, S., 2006. Expression of *Vicia villosa* agglutinin (VVA)-binding glycoprotein in primary breast cancer cells in relation to lymphatic metastasis: is atypical MUC1 bearing Tn antigen a receptor of VVA?. *Breast cancer research and treatment* 98, 31-43.

Kierszenbaum, AL., 2011. Fertilization, placentation, and lactation (Mammary gland). In: Kierszenbaum, ed. *Histology and Cell Biology*. Elsevier / Mosby; 3rd edition. Philadelphia, USA, p. 676.

Klopfleisch, R., von Euler, H., Sarli, G., Pinho, S.S., Gartner, F., Gruber, A.D., 2011. Molecular Carcinogenesis of Canine Mammary Tumors: News From an Old Disease. *Veterinary Pathology* 48(1):98-116.

Knapp, D.W., Waters, D.J. 1997. Naturally occurring cancer in pet dogs: important models for developing improved cancer therapy for humans. *Mol med today*, 3(1):8-11.

Korhonen, T., Kuukasjärvi, T., Huhtala, H., Alarmo, E.L., Holli, K., Kallioniemi, A., Pylkkänen, L. 2013. The impact of lobular and ductal breast cancer histology on the

metastatic behavior and long term survival of breast cancer patients. *Breast*, 22(6):1119-24.

Kulasekara, K.K., Lukandu, O.M., Neppelberg, E., Vintermyr, O.K., Johannessen, A.C., Costea, D.E. 2009. Cancer progression is associated with increased expression of basement membrane proteins in three-dimensional in vitro models of human oral cancer. *Arch Oral Biol*, 54(10):924-31.

Kumaraguruparan, R., Prathiba, D., Nagini, S., 2006. Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. *Research in Veterinary Science* 81, 218-224.

Lee, C., Kweon, O., 2002. Mutations of p53 tumor suppressor gene in spontaneous canine mammary tumors. *Journal of veterinary science* 3, 321.

Lester, S.C., Bose, S., Chen, Y.-Y., Connolly, J.L., de Baca, M.E., Fitzgibbons, P.L., Hayes, D.F., Kleer, C., O'Malley, F.P., Page, D.L., 2009. Protocol for the examination of specimens from patients with ductal carcinoma in situ of the breast. *Archives of pathology & laboratory medicine* 133, 15-25.

Liu, X., Nie, H., Zhang, Y.B., Yao, Y.F., Maitikabili, A., Qu, Y.P., Shi, S.L., Chen, C.Y., Li, Y., 2013. Cell Surface-Specific N-Glycan Profiling in Breast Cancer. *PLoS One* 8(8), e72704.

Lopez-Garcia, M.A., Geyer, F.C., Lacroix-Triki, M., Marchió, C., Reis-Filho, J.S., 2010. Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways. *Histopathology* 57(2), 171-192.

Luga, V., Zhang, L., Vilorio-Petit, A.M., Ogunjimi, A.A., Inanlou, M.R., Chiu, E., Buchanan, M., Hosein, A.N., Basik, M., Wrana, J.L. 2012. Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell* 151(7):1542-56.

Man, Y., Grinkemeyer, M., Izadjoo, M., Stojadinovic A., 2011. Malignant Transformation and Stromal Invasion from Normal or Hyper-plastic Tissues: True or False?. *Journal of Cancer* 2, 413-424

Man, Y.G., Nieburgs, H.E. 2006. A subset of cell clusters with malignant features in morphologically normal-appearing and hyperplastic tissues. *Cancer Detect Prev*, 30(3):239-47.

Man, Y.G., Stojadinovic, A., Mason, J., Avital, I., Bilchik, A., Bruecher, B., Protic, M., Nissan, A., Izadjoo, M., Zhang, X., Jewett, A. 2013. Tumor-infiltrating immune cells promoting tumor invasion and metastasis: existing theories. *J Cancer*, 4(1):84-95.

Marsh, T., Pietras, K., McAllister, S.S. 2013. Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1832(7):1070-8.

Martins, A., Tamaso, E., Guerra, J., 2002. Retrospective review and systematic study of mammary tumors in dogs and characteristics of the extracellular matrix. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 39, 38-42.

Masood, S., 2010. Is it time to retire the term of "in situ carcinoma" and use the term of "borderline breast disease"? *Breast J* 16, 571-572

Masood, S., Rosa, M., 2011. Borderline breast lesions: diagnostic challenges and clinical implications. *Advances in anatomic pathology* 18, 190-198.

Matos, A.J., Baptista, C.S., Gärtner, M.F., Rutteman, G.R., 2012. Prognostic studies of canine and feline mammary tumours: The need for standardized procedures. *Vet J*, 193(1):24-31.

McGeady T.A., 2006. Male and Female Reproductive System. In: McGeady TA, Quinn A, Fitz-Patrick ES (eds). *Veterinary embryology*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, p 264.

Misdorp, W., Weijer, K., 1980. Animal model of human disease: breast cancer. *The American Journal of Pathology* 98, 573.

Misdorp, W., Else, R., Hellmen, E., Lipscomb, T., 1999. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. *Armed Forces Institute of Pathology*.

Misdorp, W., 2002. Tumors of the mammary gland. In *textbook of Tumors of Domestic Animals*, 4th edit, DJ Meuten, Eds., Iowa State Press, Iowa, pp. 575-606.

Mislovicova, D., Gemeiner, P., Kozarova, A., Kozar, T., 2009. Lectinomics I. Relevance of exogenous plant lectins in biomedical diagnostics. *Biologia* 64 (1), pp. 1-19.

Mody, R., Joshi, S.H., Chaney, W., 1995. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 33(1), 1-10. Review.

Mohammed, S.I., Meloni, G.B., Parpaglia, M.P., Marras, V., Burrai, G.P., Meloni, F., Pirino, S., Antuofermo, E., 2011. Mammography and ultrasound imaging of preinvasive and invasive canine spontaneous mammary cancer and their similarities to human breast cancer. *Cancer Prevention Research* 4(11), 1790-8.

Mouser, P., Miller, M.A., Antuofermo, E., Badve, S.S., Mohammed, S.I., 2010. Prevalence and Classification of Spontaneous Mammary Intraepithelial Lesions in Dogs Without Clinical Mammary Disease. *Veterinary Pathology* 47, 275-284.

Mukhopadhyay, P., Chakraborty, S., Ponnusamy, M.P., Lakshmanan, I., Jain, M., Batra, S.K., 2011. Mucins in the pathogenesis of breast cancer: Implications in diagnosis, prognosis and therapy. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* 1815, 224-240.

Mulligan, R., 1963. Comparative pathology of human and canine cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 108, 642-690.

Nakagawa, T., Endo, Y., Watanabe, M., Mochizuki, M., Nishimura, R., Sugano, S., Sasaki, N., 2009. Adhesional function of canine mammary gland tumor cells expressing sialyl Lewis X. *Journal of Veterinary Medical Science* 71, 1225-1228.

Nangia-Makker, P., Honjo, Y., Sarvis, R., Akahani, S., Hogan, V., Pienta, K.J., Raz, A., 2000. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *Am J Pathol* 156:899-909.

Nelson, D and Cox, M, 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry* four edition. pp.521.

Nowak, M., Madej, J., Dzielicki, P., Lopulski, W., Rodo, A., Ugorski, M., 2009. Tumor-associated Carbohydrate Antigens: Sialyl Le(a) and T/Tn Antigens in Canine Mammary Tumors. *Veterinary Pathology* 46, 222-226.

Ochieng, J., Furtak, V., Lukyanov, P., 2004. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj J* 19:527-535. *Glycoconj J* 19(7-9), 527-35.

Oliveira, J.C., Kommers, G.D., Masuda, E.K., Marques, B., Figuera, R.A., Irigoyen, L.F., Barros, C.S.L., 2010. Retrospective study of 1,647 mammary gland tumors in dogs. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 30, 177-185.

O'Malley, F.P., Pinder, S.E., Mulligan, A.M., 2011. *Breast Pathology: A Volume in the Series: Foundations in Diagnostic Pathology (Expert Consult-Online)*. Elsevier Health Sciences.

Orfanou, D.C., Pourlis, A., Ververidis, H.N., Mavrogianni, V.S., Taitzoglou, I.A., Boscios, C.M., Fthenakis, G.C., 2010. Histological Features in the Mammary Glands of Female Dogs throughout Lactation. *Anatomia Histologia Embryologia* 39, 473-478.

Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P., 2005. Global cancer statistics, 2002. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians* 55, 74-108.

Patsikas, M.N., Karayannopoulou, M., Kaldrymidoy, E., Papazoglou, L.G., Papadopoulou, P.L., Tzegas, S.I., Tziris, N.E., Kaitzis, D.G., Dimitriadis, A.S., Dessiris, A.K., 2006. The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: A lymphographic study. *Anat Histol Embryol*, 35(4):228-34.

Pereira, D., Vieira, A.F., Schmitt, F., Paredes, J., Gama, A., 2013. Targeting cancer stem cells in canine mammary cancer. ESVP/ECVP Proceedings 2012. *Journal of Comparative Pathology* 148(1): 49.

Pinder, S.E., 2010. Ductal carcinoma in situ (DCIS): pathological features, differential diagnosis, prognostic factors and specimen evaluation. *Modern Pathology* 23, S8-S13.

Pinho, S.S., Matos, A.J.F., Lopes, C., Marcos, N.T., Carvalheira, J., Reis, C.A., Gartner, F., 2007. Sialyl Lewis x expression in canine malignant mammary tumours: correlation with clinicopathological features and E-Cadherin expression. *BioMed Central cancer: BMC Cancer* 7:124.

Plachot, C., Chaboub, L.S., Adissu, H.A., Wang, L., Urazaev, A., Sturgis, J., Asem, E.K., Lelievre, S.A., 2009. Factors necessary to produce basoapical polarity in human glandular epithelium formed in conventional and high-throughput three-dimensional culture: example of the breast epithelium. *BMC Biol*, 7-77.

Polyak, K., Hu, M. 2005. Do myoepithelial cells hold the key for breast tumor progression? *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 10(3):231-47.

Potapenko, I.O., Haakensen, V.D., Luders, T., Helland, A., Bukholm, I., Sorlie, T., Kristensen, V.N., Lingjaerde, O.C., Borresen-Dale, A.L. Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. *Molecular Oncology* 4, (2010): 98-118.

Prier, J., Brodey, R. Canine neoplasia: A prototype for human cancer study*. *Bulletin of the World Health Organization* 29, (1963): 331-44. Review.

Purcell, C., Norris, H., 1998. Intraductal proliferations of the breast: a review of histologic criteria for atypical intraductal hyperplasia and ductal carcinoma in situ, including apocrine and papillary lesions. *Annals of Diagnostic Pathology* 2, 135-145.

Queiroga, F., Lopes, C. 2002. Tumores mamários caninos: novas perspectivas. In: *Congresso de Ciências Veterinárias*. Congresso de Ciências Veterinárias, Oeiras, Portugal p.183-190.

Rehm, S., Stanislaus, D.J., Williams, A.M., 2007. Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. *Birth Defects Research Part B-Developmental and Reproductive Toxicology* 80, 233-245.

Ressel, L., Millanta, F., Poli, A. 2011. Canine invasive lobular carcinoma of the mammary gland: morphological and immunohistochemical characterizations of three cases. *J Comp Pathol*, 144(4):303-7.

Rivera, P., Melin, M., Biagi, T., Fall, T., Haggstrom, J., Lindblad-Toh, K., von Euler, H., 2009. Mammary Tumor Development in Dogs Is Associated with BRCA1 and BRCA2. *Cancer Research* 69, 8770-8774.

Rivera, P., von Euler, H., 2011. Molecular Biological Aspects on Canine and Human Mammary Tumors. *Veterinary Pathology* 48, 132-146.

Robles, S., Galanis, E., 2002. Breast cancer in Latin America and the Caribbean. *Revista Panamericana de Salud Pública* 11, 178-185.

Rønnov-Jessen, L., Bissell, M.J. 2009. Breast cancer by proxy: can the microenvironment be both the cause and consequence? *Trends Mol Med*, 15(1):5-13.

Rosen, P.P., 2001. *Rosen's Breast Pathology.*, 2nd edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 1004.

Rosen, P.P., 2009. *Rosens Breast Pathology.*, 3rd edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (USA), 101-108.

Rowe, R.G., Weiss, S.J. 2008. Breaching the basement membrane: who, when and how? *Trends Cell Biol*, 18(11):560-74

Santos, A.A., Lopes, C.C., Ribeiro, J.R., Martins, L.R., Santos, J.C., Amorim, I.F., Gärtner, F., Matos, A. J. 2013. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. *BMC Veterinary Research* 4; 9: 1.

Santos, M., Marcos, R., Faustino, A.M.R., 2010. Histological Study of Canine Mammary Gland During the Oestrous Cycle. *Reproduction in Domestic Animals* 45, E146-E154.

Sassi, F., Benazzi, C., Castellani, G., Sarli, G. 2010. Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *BMC Vet Res*, 6:5.

Schneider, R., 1970. Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer* 26(2), 419-26.

Sgroi, D.C. 2010. Preinvasive breast cancer. *Annu Rev Pathol*, 5:193-221.

Sierra, A., 2009. Animal models of breast cancer for the study of pathogenesis and therapeutic insights. *Clin Transl Oncol* 11(11), 721-7.

Simian, M., Hirai, Y., Navre, M., Werb, Z., Lochter, A., Bissell, M.J. 2001. The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Development*, 128(16):3117-31.

Sisson, S., Grossman, J.D., 2001. *Anatomía de los animales domésticos*, Robert Getty. Quinta edición. Ed. Elsevier Masson, S.A. Barcelona, España. Tomo 1, 2290.

Sleeckx, N., de Rooster, H., Veldhuis Kroeze, E.J., Van Ginneken, C., Van Brantegem, L. 2011. Canine mammary tumours, an overview. *Reprod Domest Anim*, 46(6):1112-31

Sorenmo, K., 2003. Canine mammary gland tumors. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 33, 573.

Sorenmo, K.U., Kristiansen, V.M., Cofone, M.A., Shofer, F.S., Breen, A.M., Langeland, M., Mongil, C.M., Grondahl, A.M., Teige, J., Goldschmidt, M.H., 2009. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Vet Comp Oncol* 7, 162–172.

Sorenmo, K.U., Rasotto, R., Zappulli, V., Goldschmidt, M.H. 2011. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Vet Pathol*, 48(1):85-97.

Strandberg, J., Goodman, D., 1974. Animal model of human disease: canine mammary neoplasia. *The American Journal of Pathology* 75, 225.

Tanner K. 1012. Regulation of the basement membrane by epithelia generated forces. *Phys Biol*, 9(6): 065003.

Topps, A., Clay, V., Absar, M., Howe, M., Lim, Y., Johnson, R., Bundred, N. 2014. The sensitivity of pre-operative axillary staging in breast cancer: comparison of invasive lobular and ductal carcinoma. *Eur J Surg Oncol*, 40(7):813-7.

Tot, T., 2009. The metastatic capacity of multifocal breast carcinomas: extensive tumors versus tumors of limited extent. *Human Pathology* 40(2), 199–205

Tot, T., 2011. "The theory of the sick lobe," in *Breast Cancer: A Lobar Disease*, T. Tot, Ed., Springer, London, UK, 1–18.

Tot, T., 2011. "The theory of the sick lobe," in *Breast Cancer: A Lobar Disease*, T. Tot, Ed., Springer, London, UK, 1–18.

Tsubura, A., Uehara, N., Kiyozuka, Y., Shikata, N., 2005. Dietary factors modifying breast cancer risk and relation to time of intake. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 10, 87-100.

Turashvili, G., Bouchal, J., Ehrmann, J., Fridman, E., Skarda, J., Kolar, Z. 2007. Novel immunohistochemical markers for the differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 151(1):59-64.

Uva, P., Aurisicchio, L., Watters, J., Loboda, A., Kulkarni, A., Castle, J., Palombo, F., Viti, V., Mesiti, G., Zappulli, V., 2009. Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BMC Genomics* 10, 135.

Videira, M., Reis, R.L., Brito, M.A. 2014. Deconstructing breast cancer cell biology and the mechanisms of multidrug resistance. *Biochim Biophys Acta*, 1846(2):312-325.

Warner, M., 1977. Response of Beagle mammary dysplasias to various hormone supplements in vitro. *Cancer Research* 37, 2062-2067.

Wetzels, R.H., Holland, R., van Haelst, U.J., Lane, E.B., Leigh, I.M., Ramaekers, F.C. 1989. Detection of basement membrane components and basal cell keratin 14 in noninvasive and invasive carcinomas of the breast. *Am J Pathol*, 134(3):571-9.

Yoshimura, H., Michishita, M., Ohkusu-Tsukada, K., Takahashi, K. 2011. Increased presence of stromal myofibroblasts and tenascin-C with malignant progression in canine mammary tumors. *Vet Pathol*, 48(1):313-21.

Zatloukal, J., Lorenzova, J., Tichy, F., Necas, A., Kecova, H., Kohout, P., 2005. Breed and age as risk factors for canine mammary tumours. *Acta Veterinaria Brno* 74, 103-109.