

INSTITUTO DE ESPAÑA
REAL ACADEMIA DE CIENCIAS VETERINARIAS

EL CÁNCER MAMARIO CANINO: DE LA CLÍNICA VETERINARIA A LA INVESTIGACIÓN HUMANA

DISCURSO DE INGRESO PRONUNCIADO POR LA
ILMA. SRA. D^a LAURA LUISA PEÑA FERNÁNDEZ
EN EL ACTO DE SU TOMA DE POSESIÓN COMO
ACADÉMICA CORRESPONDIENTE ELECTA
EL DÍA 18 DE MAYO DE 2015

Y DISCURSO DE PRESENTACIÓN A CARGO DEL
ACADÉMICO DE NÚMERO
EXCMO. SR. D. JUAN CARLOS ILLERA DEL PORTAL



**Real Academia de
Ciencias Veterinarias
de España**

18 de mayo de 2015
MADRID

ISBN 978-84-606-8125-0

Peña Fernández, Laura Luisa

Madrid, 2015

DISCURSO DE INGRESO A CARGO
DEL ACADÉMICO DE NÚMERO
Excmo. Sr. Dr. D. **Juan Carlos Illera del Portal**

DISCURSO DE PRESENTACIÓN DEL EXCMO. SR. D. JUAN CARLOS ILLERA DEL PORTAL

Excelentísimo Sr. Presidente de la Real Academia de Ciencias Veterinarias, Excelentísimos Sres. Académicos, distinguidos Sres. y Sras.

Siento una emoción muy especial al presentarles a la nueva Académica Correspondiente de esta ilustre Corporación, la Dra. D^a. Laura Peña Fernández. Nuestra común convivencia a lo largo de los últimos 15 años, hace que mis palabras fluyan desde mi gran afecto, pero sin menoscabar la seriedad de este momento. La Dra. Peña comenzó sus estudios de Veterinaria en el año 1980, en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, estudios que terminó en el año 1985, y ese mismo año obtuvo el Grado de Licenciada en Veterinaria con la calificación de Sobresaliente.

La hoy recipiendaria se incorporó en el año 1986 como becaria de Formación del Personal Investigador al equipo de Histología y Anatomía Patológica del Departamento de Patología Animal II de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, para la realización de la Tesis Doctoral que versó sobre el estudio de los “Tumores mamarios inducidos con DMBA en rata: estudio biológico, histopatológico e inmunocitoquímico”, un tema pionero, de especial relevancia para la Oncología y que marcó la carrera científica de la Dra. Peña. La defensa de la Tesis Doctoral tuvo lugar en el año 1989, obteniendo la calificación de Sobresaliente *cum laude* y, posteriormente, el Premio Extraordinario de Doctorado.

Una vez finalizada la Tesis Doctoral decidió permanecer en

la Universidad y continuar su carrera como Docente e Investigadora. Su carrera Docente la ha desarrollado casi íntegramente en el Departamento de Patología Animal II, ahora llamado Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. Hasta la actualidad la Dra. Peña ha desempeñado los siguientes Puestos Docentes: de 1989 a 1991 Profesor ayudante y, desde febrero de 1991, Profesora Titular de Universidad, cargo que desempeña en la actualidad; además está acreditada por la ANECA a Catedrática de Universidad por el Área de Ciencias de la Salud desde febrero 2011. En este Departamento imparte o ha impartido, las asignaturas de Citología e Histología, Anatomía Patológica General, Anatomía Patológica Especial y Endocrinología Animal, así como en las Facultades de Veterinaria de las Universidades de Tras Os Montes (Portugal) y la Universidad de Padua (Italia). Ha participado en varios Cursos y Programas de Doctorado, como por ejemplo el actualmente vigente: “Ciencias Veterinarias” y en el Máster de Tercer ciclo: Investigación en Ciencias Veterinarias.

Destacaré, asimismo, que ha participado como Profesora en numerosos cursos de posgrado y de formación continuada, en Universidades y Centros de Investigación de España y en el Extranjero, que no vamos enumerar por no hacer demasiado larga esta introducción.

Su carrera Investigadora la ha desarrollado también, en su mayor parte, en el Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de la UCM y dentro del área de la Oncología Animal. Esta carrera Investigadora, complemento de la carrera Docente, a la que ha dedicado muchas horas de su vida, le ha llevado a realizar varias estancias en distintos países, principalmente, en los Departamentos de Patología Animal de la Universidad de Utrecht, en Holanda, y de la Universidad de California Davis en USA, y en los últimos años en el MD Anderson Cancer Center de Houston, Tejas, USA, todas ellas en calidad de profesor invitado.

El resultado de sus primeros estudios en el campo de la Oncología Animal fue el Premio Extraordinario de Doctorado y una serie de publicaciones que han sido la base para, prácticamente, todos los estudios de los últimos años del grupo de investigación que dirigimos. El fruto de esta colaboración ha sido la publicación en común de más de 25 trabajos científicos y también numerosas ponencias, y comunicaciones a Congresos Nacionales e Internacionales y también la concesión del Premio de Investigación de la Real Academia de Ciencias Veterinarias en el año 2004 y una patente por la línea celular de carcinoma inflamatorio mamario canino.

Me gustaría contarles cómo se gestó esa colaboración entre la Dra. Peña y mi persona. A principios de los noventa nos encontramos en la Universidad de Utrecht, no nos habíamos conocido antes porque pertenecíamos a bandos diferentes y opuestos en la Facultad. Después de conocernos, a la vuelta de Utrecht, comenzamos a reunirnos con una serie de profesores los jueves por la tarde en la cafetería de la Facultad para tomar algo y cambiar impresiones, y una de esas tardes, años después, la Dra. Peña me comentó que en los carcinomas mamarios inflamatorios de perra aparecían gotas lipídicas y que no sabía muy bien que función tenían, y yo lo dije que como la mayoría de los cánceres de mama son hormonodependientes, que si esas gotas lipídicas no serían el sustrato para la producción de hormonas esteroides por el propio tumor. Y bien, nos pusimos a analizarlo y, en consecuencia, hemos demostrado por primera vez en Veterinaria y en Humana que los tumores mamarios son capaces de producir y almacenar diversas hormonas esteroides, es decir los tumores de mama actúan como órganos endocrinos y se autoalimentan.

Los frutos de tantas horas de trabajo se han visto recompensados con la publicación de 70 artículos científicos en revistas de reconocido prestigio, lo que se conoce vulgarmente como “revistas de alto impacto”, 150 *proceedings* de congresos y comunicaciones y ponencias presentadas en congresos nacionales e internacionales. Lo que indica que además de ser

una gran investigadora la Dra. Peña es una gran viajera y comunicadora. Ha dirigido o codirigido varias Tesinas de Licenciatura y 15 Tesis Doctorales. Participa en Comités Internacionales de la Unión Europea y es Revisora de Revistas Científicas de reconocido prestigio, por mencionar algunas: miembro del Consejo Editorial de la revista *Veterinary Pathology* y Editor Asociado del *Forntiers in Veterinary Science* (revista del grupo Nature).

Pertenece a Sociedades Científicas y Profesionales, señalando que es Diplomada del *European College of Veterinary Pathologists* (ECVP) desde 1998 hasta la actualidad. Conviene destacar que en este Colegio Europeo ha sido *Full Member* del *Examination Committee*, como Jefa de Sección para Patología de Pequeños Animales, y *Councillor* (Consejero) del *Council* del citado *European College*.

Asimismo, ha desarrollado varios cargos de gestión entre los que conviene mencionar que ha sido jefa del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Veterinario Complutense.

No puedo dejar de señalar que la Dra. Peña está hoy en día considerada como una autoridad mundial en la histopatología de los tumores mamarios. Actualmente, es Codirectora Patóloga (*Co-chair Pathologist*) del *Oncology Pathology Working Group* (OPWG), organización estadounidense derivada de la *Veterinary Cancer Society* y del *American College of Veterinary Pathologists* (ACVP), que tiene la finalidad de aunar conceptos de Oncólogos y Patólogos en actuaciones sobre tumores mamarios caninos.

Pero como no todo en esta vida es Ciencia y Docencia, queremos terminar señalando que la Dra. Peña es una magnífica persona y amiga, una gran conversadora y una persona muy alegre, le gusta la buena mesa (a veces demasiado) y por supuesto el viajar; una muestra de ello, son los innumerables congresos, cenas y celebraciones varias que hemos compartido con ella, a lo largo de estos últimos años.

El Discurso de Ingreso: El cáncer mamario canino: de la clínica veterinaria a la investigación humana.

En la justificación del tema elegido, hace mención a su propia trayectoria investigadora, ya que la investigación sobre los tumores mamarios caninos ha sido el hilo conductor de su actividad científica.

El discurso de ingreso lo ha dividido en los siguientes capítulos:

I. Prevalencia y factores de riesgo. En este apartado revisa la prevalencia de esta enfermedad y enumera los factores de riesgo, detallando más en profundidad el efecto beneficioso de la ovariectomía en animales jóvenes y el papel de las hormonas esteroides.

II. Etiología y carcinogénesis. Aquí la Dra. Peña lleva a cabo un resumen sobre la carcinogénesis mamaria canina, indicando algunos genes implicados y deteniéndose en la posibilidad del cáncer mamario canino hereditario.

III. Histopatología. Clasificación histopatológica. De forma somera, realiza una visión de conjunto sobre las peculiaridades histopatológicas de los tumores mamarios caninos y aborda, de forma personal, la génesis de la nueva clasificación histopatológica de los mismos, que queda recogida indicando todos los tipos histológicos.

IV. Factores pronóstico. Tras indicar el concepto de factor pronóstico, el método de realización de estudios pronóstico y la dificultad de llevarlos a cabo correctamente, pasa a enumerar y comentar los factores pronóstico más destacados, en muchas ocasiones basándose en sus propias investigaciones. Los ha subdividido en factores pronóstico epidemiológicos, clínicos, histopatológicos e inmunohistoquímicos. Cabe destacar, por su

importancia y utilidad práctica, el grado histológico de malignidad adaptado a la especie canina como logro del equipo de la Dra. Peña.

V. El cáncer mamario canino como modelo para el cáncer mamario humano. En esta sección se evalúa, desde un punto de vista crítico, la validez del modelo canino para estudiar el cáncer mamario humano en su conjunto.

VI. El cáncer mamario inflamatorio humano y canino. En este último apartado describe brevemente las características comunes de esta grave enfermedad en ambas especies y defiende la utilización del modelo canino, basándose en los resultados de investigación obtenidos. Se resumen los hallazgos hormonales específicos en esta neoplasia y se describen, brevemente, las características de una nueva línea celular de este cáncer mamario canino que ha desarrollado el grupo.

A mi parecer, realiza en su discurso, una visión de conjunto del tema basándose en gran medida en su experiencia y en sus propias aportaciones. El resultado es un discurso de ingreso riguroso, ameno y personal.

Termino diciendo que, para la Real Academia de Ciencias Veterinarias de España, es un verdadero honor recibir a la Dra. Peña entre sus distinguidos Académicos. Os doy la bienvenida y os deseo mucha vida activa entre todos nosotros y que acudas cuando esta Real Academia te necesite.

He dicho.

DISCURSO DE INGRESO DE LA
ACADÉMICA CORRESPONDIENTE
Ilma. Sra. Dra. D^a **Laura Luisa Peña Fernández**

A mi familia

*En el fondo, los científicos somos gente con suerte:
Podemos jugar a lo que queramos durante toda la vida.*

Lee Smolin
(Físico estadounidense, 1955-)

Excelentísimo Sr. Presidente de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de España,

Excelentísimos e ilustrísimos Sres. Académicos,

Señoras y señores,

Queridos familiares y amigos,

Este solemne acto de ingreso en la Real Academia de Ciencias Veterinarias de España es para mí de especial significado ya que supone un gran honor pertenecer a tan docta institución y además es un reconocimiento a la labor profesional de muchos años. Reflexionando sobre ello es quizá ahora cuando me doy más cuenta de mi edad, de todos los años que han pasado.... y de que, afortunadamente, han sido muy fructíferos, como les haré a ustedes partícipes en unos minutos.

Quiero agradecer tan alto honor en primer lugar al Sr. Presidente Excmo. Sr. Dr. D. Arturo Anadón que me animó a presentar mi candidatura y a las académicas Excelentísimas Sras. Dras. D^a. Josefina Illera del Portal y D^a. Ana Pérez Fuentes, así como al Excmo. Sr. Dr. D. Juan Carlos Illera del Portal, que la avalaron con su firma. Precisamente fue el Profesor Illera quien me convenció a presentarme a la vacante de Académico Correspondiente; por ello, por haber aceptado realizar mi presentación en nombre de la Real Academia y por haber compartido conmigo el placer de la investigación desde una orientación multidisciplinar, deseo expresarle mi gratitud. Éste es el momento de hacer una mención especial al que fue mi profesor de Fisiología el Excmo. Sr. Dr. D. Mariano Illera Martín, Presidente durante muchos años de esta Academia y también gestor de los inicios de nuestra colaboración.

Gratitud también para todos los Sres. Académicos que apoyaron mi ingreso con su voto. Me llenó de satisfacción y me sorprendió al tiempo contar con los votos de un gran número de ellos, más aún si cabe cuando descubrí que otras dos plazas de Académico Correspondiente habían quedado vacantes en esas mismas votaciones, a pesar de haber varios candidatos. Y es que el prestigio de esta Real Academia y de sus Doctores es muy grande y se incrementa con el bien hacer de los mismos.

Yo soy veterinaria, docente e investigadora por vocación y, diría, que también por esfuerzo; no es fácil compaginar todas estas facetas y salir airosa, como creo, de todas ellas. He dedicado horas y horas y una gran parte de mi vida a esta vocación que, vista desde la perspectiva de los años, me ha dado grandes satisfacciones y sólo pequeños sinsabores. Y sobre todo me ha dado grandes amigos. A lo largo de mi vida académica han sido muchas las personas que se han cruzado en mi camino de las que he aprendido, en las que he confiado, que han confiado en mí y que me han apoyado, compartiendo horas de sacrificios y también de éxitos y celebraciones. También algunas, las menos, me decepcionaron profundamente. A lo largo de este discurso iré mencionando aquellas que han sido clave en mi trayectoria profesional.

Comenzaré diciendo que me enamoré, sí me enamoré casi literalmente, de la Anatomía Patológica Veterinaria. Fue en tercero de carrera y desde entonces es el eje de mi vida profesional. Es por ello que soy anatomopatóloga o, como se dice actualmente, patóloga veterinaria. No habría sido posible sin la confianza de las profesoras María Castaño Rosado y Juana M^a Flores Landeira. Debo dar las gracias a la Profesora María Castaño por instarme a pedir una beca para realizar la Tesis Doctoral y por haber apoyado mi trayectoria profesional durante muchos años. De María aprendí muchas cosas, sobre todo el gusto por la docencia y la necesaria proyección internacional. La Profesora Castaño fue la que decidió que

empezara a trabajar en tumores mamarios caninos, allá por el año 1986, sin que hubiera ninguna línea de investigación dedicada a ello en la Cátedra. Desafortunadamente, y con cierta lógica, el tema de Tesis hubo que cambiarlo a un estudio experimental de cáncer mamario en ratas administradas con DMBA (7,12-dimetilbenzantraceno), bajo la dirección de la Profesora Juana María Flores Landeira. Agradezco a la Profesora Flores que me iniciara en la investigación, enseñándome a tener iniciativa y criterio propio; también fue la que me lanzó a la publicación científica: no me equivoco si menciono que los trabajos de Oncología Experimental que se derivaron de mi Tesis Doctoral fueron de los primeros realizados en la cátedra que se publicaban en el extranjero (Peña *et al.*, 1990, Peña *et al.*, 1991) y, esto fue posible, gracias a su iniciativa. Aunque también me he dedicado a otros temas en Oncología Veterinaria y Comparada, como la hematuria enzoótica bovina, y en Patología Veterinaria, como la patología del lince ibérico, el tema principal de mi investigación, el cáncer mamario canino, ya estaba en el destino, como ven, desde mis inicios como investigadora. La imposibilidad de realizar mi Tesis Doctoral en el tema inicial puede que me empujara, nada más acabarla, a iniciar la investigación en el primer tema propuesto. ¿Tozudez? puede.

Gran parte del éxito que hemos tenido en la investigación del cáncer mamario canino ha sido, precisamente, y como se recoge en el título de esta disertación, la búsqueda de la aplicación de los resultados obtenidos en la clínica veterinaria, es decir, el haber realizado una verdadera investigación aplicada. Para ello, la estrecha comunicación entre el patólogo y el clínico es esencial. En este aspecto, y de forma destacada, me gustaría agradecer profundamente a la Profesora Dra. M^a Dolores Pérez Alenza, el haber compartido conmigo todos estos años de investigación y amistad. Sin su orientación clínica en nuestras investigaciones no habrían sido posibles tantos y tantos buenos resultados. Tampoco habrían existido tantos y tantos buenos momentos, de esos que se recuerdan

en la vida. Los tragos amargos también los hemos pasado juntas y, por ello, han sido mucho más livianos. El haber contado, y contar todavía, con la Doctora Pérez-Alenza como colega y amiga, es un lujo de valor incalculable.

Desde mis principios como becaria de investigación, hablo de los años 1986 al 1989, comprendí que el enfoque multidisciplinar de una investigación era necesario. Los clínicos veterinarios debían poder beneficiarse de los resultados obtenidos. Si no ¿qué sentido podrían tener nuestros hallazgos histopatológicos, inmunohistoquímicos o de sala de necropsias? En aquel entonces eran mundos separados el de los clínicos y el de los patólogos. De mi participación aquellos años en las reuniones del que se llamó algo así como “el club de mediodía” en el que se reunían becarios y estudiantes colaboradores del Profesor Dr. Alberto Montoya Alonso, profesor entonces de Medicina Interna en mi mismo Departamento, se derivó probablemente esta idea: la conexión patólogo-clínico es imprescindible. Claro, rodeada de clínicos, yo única patóloga (bueno, embrión de patóloga entonces), debía hacerles comprender que lo que el Prof. Montoya llamaba “tapices” (para hacerme rabiar y con sorna de Chamberí) eran en realidad imágenes histopatológicas muy útiles para el diagnóstico y pronóstico de los pacientes. El profesor Montoya, Alberto, ya lo sabía; lo que no sabía es que aquel trato de colegas descansando al mediodía y contando anécdotas, derivaría en una fuerte amistad en la que los años y las vicisitudes no han podido hacer mella. El Profesor Montoya, desde su Cátedra en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, ha sido un apoyo incondicional en los momentos duros y un amigo sin reservas. Gracias Alberto, seguiré escudriñando los “tapices”.

Llegados a este punto, creo conveniente expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que fuera de España han sido guía y partícipes de mi devenir profesional, y lo haré por “orden de aparición” en el mismo.

En el año 1991 realicé por primera vez una estancia en la Facultad de Veterinaria de Utrecht (Holanda). Allí me esperaban el Prof. Wim Misdorp y el Prof. Gerard Rutteman. Digo mal: nos esperaban a la doctora Pérez Alenza y a mí para la realización de la Tesis Doctoral de la Dra. Pérez Alenza, ya que eran, como yo, directores de la misma. Dicho trabajo se llevó a cabo con muestras de tumores mamarios caninos procedentes de Madrid. Como anécdota diré que llevamos las muestras de los tumores mamarios en coche, atravesando las distintas fronteras que Europa tenía entonces, en un refrigerador tapado con abrigos conectado a un mechero y rezando para que no nos parara la policía. Debo decir también que la investigación resultó un éxito y derivó en interesantes publicaciones sobre nutrición y cáncer mamario que aún son únicas hoy en día, como luego comentaré (Perez Alenza *et al.*, 1995, Perez Alenza *et al.*, 1998). El ya desaparecido Prof. Wim Misdorp era conocido internacionalmente por ser el autor de la clasificación histológica de la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) de los tumores mamarios caninos y felinos. Estaba yo, humilde profesora Titular de Madrid, ante uno de los grandes de la Patología Veterinaria mundial. El encuentro con el Prof. Wim Misdorp resultó también un duro encuentro con la realidad: todo lo que había aprendido sobre el diagnóstico de los tumores mamarios caninos era incorrecto y, por ende, toda la colección de tumores mamarios caninos escondidos bajo los abrigos estaba mal diagnosticada. Después de varias sesiones con él en el microscopio aprendí la histopatología de los tumores mamarios caninos lo que me ha sido de gran utilidad, como luego ustedes verán. Gracias “Professor” por haber perdido parte de su valioso tiempo con aquella española de aspecto estresado. Con el Dr. Gerard Rutteman, profesor de Medicina Interna, conocí el rigor y la seriedad en la investigación, aprendiendo a diseñar y realizar investigación clínica.

En mis numerosas estancias en el extranjero, he tenido la oportunidad y el placer de conocer a verdaderos maestros de la Anatomía Patológica Veterinaria. De ellos he

aprendido mucho y he recibido un trato inmejorable. Pero más que eso, han confiado en mi valía y han hecho surgir lo mejor de mí misma como patóloga e investigadora, llegando a realizar proyectos y actuaciones que jamás creí que pudiera. Algunos se han convertido en verdaderos amigos: amigos de ciencia pero también amigos de los buenos. En definitiva, debo emplear la famosa frase al decir que he sido (y probablemente soy) más “profeta en el extranjero” que en mi propia tierra. Por eso también este acto de ingreso en la Academia tiene un significado y un dulzor especial.

Por “orden de aparición” en mi vida, deseo agradecer de todo corazón al Prof. Dr. Peter Moore y a la Prof. Dra. Verena Affolter de la Facultad de Veterinaria de Davis, Universidad de California y a la Prof. Dra Paola Roccabianca de la Facultad de Veterinaria de Milán. El Prof. Dr. Michael Goldschmidt de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Pensilvania ha sido fundamental en mi trabajo y proyección internacional. Para los no patólogos diré que el Prof. Michael Goldschmidt, hoy en día retirado junto a su encantadora mujer Myra, ha sido y es un referente mundial de la Histopatología Veterinaria. Ha sido un auténtico placer compartir microscopio y mantel con Michael, un verdadero caballero y amigo. Al Prof. James Reuben del M.D. Anderson Cancer Center de la Universidad de Tejas en Houston, que ha colaborado con nuestras investigaciones de forma activa, siempre poniendo a nuestra disposición todo lo que le hemos solicitado.

No puedo dejar de nombrar a mis compañeros del Comité de Exámenes y del “Council” del “College” Europeo de Patólogos Veterinarios (ECVP) con los que he compartido, y espero seguir compartiendo, trabajo duro y también muchos buenos ratos a lo largo de 12 años (desde 2003), con un objetivo común: la estandarización a nivel europeo de la Anatomía Patológica Veterinaria.

Como no puede ser de otra manera quiero agradecer a mis compañeros pasados y presentes del Dpto. de

Medicina y Cirugía Animal y, sobre todo, a los de la Unidad Docente de Histología y Anatomía Patológica, su colaboración y paciencia y, especialmente a aquellos que han participado en diversos proyectos de investigación conmigo. Y por supuesto, a los becarios y doctorandos que han realizado la Tesis Doctoral bajo mi dirección, gran parte de estas Tesis han versado sobre cáncer mamario canino.

Intentaré a continuación pronunciar el final de este prólogo al discurso sin emocionarme demasiado. Hoy es para mí un día feliz, pero no completo. Me hace falta mi padre, desaparecido hace unos años. Gran parte de lo que soy como persona y profesional se lo debo a él: los que me conocen y le conocieron saben que mi carácter se asemeja en muchos aspectos al suyo, como también se parece en parte al de mi madre. Espero que ambos hayan podido sentirse orgullosos de mí porque, al fin y al cabo, ellos son el origen de todo. Debo destacar mi agradecimiento público a mis hijos: Álvaro y Alejandra. No es fácil ser docente, investigadora y madre y actuar bien en todos los campos. Es posible que hubieran requerido más tiempo con su madre, sobre todo Álvaro, que a sus 20 días de edad ya venía conmigo al microscopio electrónico en su canastito...y eso era sólo el comienzo de mi carrera y de su infancia, de la que me perdí muchas horas. Pese a todo, no lo he debido de hacer muy mal porque tengo dos hijos extraordinarios, muy buenas personas, de los que estoy muy orgullosa y a los que adoro. Ellos han sido mi motor en las dificultades, aún sin saberlo.

Para finalizar este prólogo quiero agradecer en este especial y solemne acto a todos mis amigos, a algunos de los cuales ya he nombrado, por estar siempre a mi lado, lejos o cerca. Me jacto de ser una persona con buenos y pocos amigos, leales, de los que te apoyan siempre y te defienden. Compañeros de alegrías, esperanzas y penas.... ¡lo que me habéis tenido que aguantar! A todos vosotros, sabéis que os quiero.

A continuación paso a dar lectura al discurso de ingreso, que, como se desprende de mis palabras anteriores, se basa en el tema de investigación prioritario de mi carrera investigadora; intentaré hacerles partícipes, Sres. académicos, señoras y señores, del entusiasmo que en mí ha despertado a lo largo de los años, haciendo especial hincapié en nuestros logros sin entrar en demasía en detalle.

El título del mismo es:

El cáncer mamario canino: de la clínica veterinaria a la investigación humana.

I. Prevalencia y factores de riesgo

Las neoplasias mamarias suponen las segundas neoplasias más frecuentes en la especie canina después de los tumores de piel, si se consideran ambos sexos, macho y hembra (Gruntzig *et al.*, 2015). Si tomamos en consideración sólo la hembra, entonces las neoplasias mamarias son las de mayor prevalencia, llegando a representar entre el 25 y el 50% de todos los tumores. Los tumores mamarios en la especie canina son tres veces más frecuentes que en la especie humana lo que da una idea de la importancia de dichas neoplasias en la clínica veterinaria. Algunos investigadores han propuesto el cáncer mamario canino como modelo natural espontáneo para el estudio del cáncer mamario de la mujer (Peña *et al.*, 2003a, Queiroga *et al.*, 2011, Liu *et al.*, 2014). Como luego explicaré, esta afirmación se restringe a unos tipos concretos de cáncer mamario.

Los tumores mamarios caninos son benignos en un 50 a 70% de los casos y malignos de un 30 a un 50%. La proporción de tumores benignos y malignos varía mucho según los diversos estudios y ello se debe a la complejidad histológica de los mismos, que dificulta el diagnóstico (Misdorp *et al.*, 1999, Goldschmidt *et al.*, 2011).

Los factores de riesgo que se suelen estudiar son: la edad, la raza, el sexo, los factores hormonales y los factores nutricionales.

El riesgo de padecer neoplasias mamarias se incrementa con la edad, de manera que es más frecuente alrededor de los ocho años. Además, la edad se relaciona con la malignidad, de manera que los tumores suelen ser benignos en perras menores de cinco años.

No parece existir una clara predisposición según la raza, aunque diversos estudios han ofrecido datos sobre preponderancia de unas razas sobre otras en determinadas regiones geográficas. Así mismo, algunos autores han señalado que las perras mestizas presentan menor prevalencia y que las de raza pequeña suelen tener más frecuentemente tumores benignos (Sorenmo *et al.*, 2011).

Las neoplasias mamarias pueden afectar a los perros machos, pero muy raramente (menos del 1% de los casos).

Dentro de la influencia hormonal, los antecedentes reproductivos como el número de partos, la edad al primer parto y la lactación ofrecen resultados contradictorios según los estudios, a diferencia de lo publicado en la especie humana en la que estos factores son determinantes. Las investigaciones sobre alteraciones reproductivas tales como pseudogestación y pseudolactación como factores de riesgo también han generado resultados contradictorios y, así, algunos trabajos señalan que no actúan como factores de riesgo mientras que otros concluyen que promueven la aparición de tumores mamarios en general o sólo benignos en particular. Pero la influencia de la exposición hormonal en el desarrollo de tumores mamarios, sobre todo en la edad joven, queda patente en la drástica reducción del riesgo en animales castrados antes de los dos años y medio:

- Antes del 1^{er} celo: 0.05%
- Entre el 1^{er} y el 2^o celo: 8%

- Después del 2º celo: 26%
- Después de 4 años, no previene (100%)

Existen otros datos muy interesantes que refuerzan el papel de las hormonas como factores de riesgo. Hace años que conocemos que la administración exógena de hormonas (combinaciones de estrógenos y progestágenos) para prevenir el celo o para el tratamiento de pseudogestaciones, incrementa el riesgo de padecer neoplasias mamarias en la perra. Es, sin embargo, reciente (en 2012) la incorporación de la terapia estrogénica o combinada postmenopáusica, así como la contraceptiva oral de estrógenos y progestágenos en la lista de carcinógenos mamarios para la especie humana de la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer de la O.M.S.

Sabemos, pues, que las hormonas esteroides y no esteroides juegan un papel fundamental en la carcinogénesis de los tumores mamarios, sobre todo en sus fases iniciales. También, como luego comentaremos, juegan un papel promotor y todavía escasamente conocido en el crecimiento de las neoplasias mamarias.

Los factores nutricionales son también relevantes como factores de riesgo. En el estudio que el grupo llevó a cabo en colaboración con Utrecht y que formó parte de la Tesis de la Dra. Pérez Alenza, bajo mi dirección y la de los profesores Misdorp y Rutteman, se demostró que la obesidad en perras jóvenes (menores de un año de edad), una dieta rica en lípidos y la preponderancia de una dieta casera sobre una dieta comercial son factores de riesgo para la aparición de tumores mamarios en esta especie (Perez Alenza *et al.*, 1998).

II. Etiología y carcinogénesis

La etiología y el proceso de aparición (carcinogénesis) de los tumores mamarios caninos son desconocidos en gran

medida. Si tomamos como norma general lo que ocurre en otras neoplasias y en el cáncer mamario humano, los carcinógenos iniciadores del proceso (los que causan la mutación o mutaciones de las células favoreciendo su proliferación) son fundamentalmente carcinógenos químicos. Según el esquema de la carcinogénesis química experimental, los carcinógenos iniciadores originan células mutadas mientras que los carcinógenos promotores inducen su proliferación. En el caso de los tumores mamarios caninos, los estrógenos, y probablemente otras hormonas, actúan como carcinógenos promotores favoreciendo la proliferación celular. La posible etiología vírica de las neoplasias mamarias caninas se desechó hace años aunque últimamente se está empezando a estudiar de nuevo.

Diversos estudios en tumores mamarios caninos han demostrado la presencia de mutaciones en genes supresores tumorales y en protooncogenes (oncogenes):

Genes supresores tumorales:

- P53: detiene el ciclo celular e inicia la apoptosis en respuesta al daño del ADN
- BRCA1/BRCA2: repara el ADN
- p16/INK4A: controla el ciclo celular
- Pten: controla el ciclo celular

Oncogenes:

- Ras: promueve el ciclo celular
- C-MYC: promueve el ciclo celular
- C-kit (CD117): participa en la supervivencia de las células, proliferación y diferenciación
- C-yes: participa en la supervivencia de las células, proliferación, invasión y migración

Pero, ¿es posible el cáncer mamario canino hereditario? Ésta es la pregunta que nos hicimos alrededor del año 2000. Para ello nos decidimos a estudiar y

comprobamos la sobreexpresión de la proteína codificada por el gen *BRCA1* (*Breast Cancer 1*) que es responsable del cáncer mamario humano heredable. Aunque quedan todavía por realizar estudios sobre una gran población de perras con familiaridad conocida para poder afirmar dicha heredabilidad, nuestros trabajos abrieron esta posibilidad (Nieto *et al.*, 2003).

La actuación de las hormonas en el proceso de desarrollo de los tumores mamarios se ha puesto de manifiesto en diversas investigaciones de nuestro grupo que han demostrado un incremento notable de hormonas esteroides y no esteroides en macerados de neoplasias mamarias malignas y en el suero de las pacientes (Peña *et al.*, 2003b, Queiroga *et al.*, 2005, Queiroga *et al.*, 2008, Queiroga *et al.*, 2009, Queiroga *et al.*, 2010a, Queiroga *et al.*, 2014). Estos trabajos han sido posibles gracias a la formación multidisciplinar de nuestro grupo de investigación actual, que incluye la aproximación clínica, patológica, genética y endocrinológica con la detección hormonal realizada en el laboratorio de endocrinología dirigido por el Dr. Juan Carlos Illera y la Dra. Gema Silván.

III. Histopatología. Clasificación histopatológica

El diagnóstico de los tumores mamarios caninos se hace mediante un estudio histopatológico. Su histopatología es de una complejidad extraordinaria: las neoplasias pueden ser de origen epitelial, mioepitelial y mesenquimatoso, existiendo múltiples posibilidades y combinaciones. Una de las características diferenciales de las neoplasias mamarias en esta especie es la existencia frecuente de células mioepiteliales proliferadas que originan áreas tisulares de cartílago y de tejido óseo. En definitiva, los tumores mamarios caninos son muy complicados de diagnosticar. Si a esto le sumamos que la aplicación de algunos criterios de malignidad histológica, como la anisocariosis y la anisocitosis, no se deben realizar como en otras neoplasias, la consecuencia es un diagnóstico erróneo, incluso en

patólogos veterinarios con cierta experiencia. Y el diagnóstico forma parte intrínseca del manejo clínico y del pronóstico del paciente.

A principios del siglo XXI la clasificación histopatológica que se usaba era la realizada por Misdorp y colaboradores en 1999 para la O.M.S. (Misdorp *et al.*, 1999). Como el resto de patólogos, tras su publicación, comenzamos a emplearla. Sin embargo, había ciertos tipos histológicos que, desde mi punto de vista, estaban escasamente definidos y otros que deberían haberse incluido y no figuraban. Llevamos a cabo un interesante estudio multicéntrico en el que se comparaban los diagnósticos realizados por diversos colegas, incluso los de los propios autores de la clasificación. Resultó que, efectivamente, la aplicación de la clasificación a todos los tipos histológicos era limitada. Nunca llegamos a publicar dicho estudio, aunque sí lo presentamos con gran éxito al congreso europeo de la especialidad; no se pudo publicar porque el propio Misdorp, que había participado en él, no nos dio su autorización. Unos pocos años después, el profesor Michael Goldschmidt, experto en dermatohistopatología, que supo de mis anhelos por un patólogo veterinario italiano, el Prof. Dr. Massimo Castagnaro, me propuso renovar la clasificación de la O.M.S. incluyendo todas las modificaciones necesarias. De verdad que no me lo podía creer: él tenía los cauces y los contactos necesarios para ello. Y así fue como comenzamos a reunirnos con y sin microscopio y a definir la nueva clasificación, que es la que se usa hoy en día en todo el mundo (Goldschmidt *et al.*, 2011). Dicha clasificación fue presentada con anterioridad a su publicación en el congreso del “College” de patólogos americanos (American College of Veterinary Pathologists) en Baltimore en diciembre de 2010 y fue uno de los momentos más emocionantes de mi vida profesional. Como luego comentaremos, esta clasificación también tiene valor pronóstico.

Clasificación histológica de tumores mamarios caninos (Goldschmidt *et al.*, 2011)

1: Neoplasias epiteliales malignas

Carcinoma—*in situ*

Carcinoma—simple

a. Tubular

b. Túbulopapilar

c. Quístico-papilar

d. Cribriforme

Carcinoma—micropapilar invasivo

Carcinoma—sólido

Comedocarcinoma

Carcinoma—anaplásico

Carcinoma que surge en adenoma complejo/tumor mixto

Carcinoma—tipo complejo

Carcinoma y mioepitelioma maligno

Carcinoma—tipo mixto

Carcinoma ductal

Carcinoma intraductal papilar

2: Neoplasias epiteliales malignas- Tipos especiales

Carcinoma de células escamosas

Carcinoma adenoescamoso

Carcinoma mucinoso

Carcinoma rico en lípidos (secretor)

Carcinoma de células fusiformes

Mioepitelioma maligno

Carcinoma de células escamosas- variante de células fusiformes

Carcinoma de células fusiformes

Carcinoma inflamatorio

3: Neoplasias epiteliales malignas—Sarcomas

Osteosarcoma

Condrosarcoma

Fibrosarcoma

Hemangiosarcoma

Otros sarcomas

4: Carcinosarcoma—Tumor mamario mixto maligno

5: Neoplasias benignas

Adenoma—simple

Adenoma papilar intraductal

Adenoma ductal

-con diferenciación escamosa (gránulos de queratohialina)

Fibroadenoma

Mioepitelioma

Adenoma complejo (adenomioepitelioma)

Tumor mixto benigno

6: Hiperplasia/Displasia

Ectasia ductal

Hiperplasia lobular (adenosis)

- Regular
- Con actividad secretora (en lactación)
- Con fibrosis
- Con atipia

Epiteliosis

Papilomatosis

Cambio fibroadenomatoso

Ginecomastia

7: Neoplasias del pezón

Adenoma

Carcinoma

Carcinoma con infiltración epidérmica ("Paget-like")

8: Hiperplasia/Displasia del pezón

Melanosis de la piel del pezón

IV. Factores pronóstico

Los factores pronóstico son características clínicas, patológicas o moleculares de un paciente o de su enfermedad que permiten predecir cuál será la evolución del mismo (Webster *et al.*, 2011). En el caso del cáncer mamario canino, se quiere predecir cuál será la evolución de los animales una vez realizada la exéresis quirúrgica, que es el tratamiento de elección. Para poder afirmar que un factor es pronóstico es necesario realizar estudios de investigación clínica denominados "estudios pronóstico" que suelen ser estudios muy controlados clínica y analíticamente, y que se realizan prospectivamente en el tiempo.

Una gran parte de las investigaciones que evalúan posibles factores pronóstico publicadas hasta hace

relativamente pocos años, no cumplen las garantías metodológicas necesarias de fiabilidad. En 2011 tuve el honor de participar como coautora en la publicación internacional sobre las “Directrices recomendadas para la Aplicación y Evaluación de Estudios de pronóstico en Oncología Veterinaria” realizada por investigadores de todo el mundo (Webster *et al.*, 2011). En ella se definen los estudios pronóstico en Oncología Veterinaria como estudios prospectivos, analíticos, que deben incluir como “puntos finales” la aparición de metástasis a distancia, la recidiva, el tiempo libre de enfermedad y la supervivencia total, realizando un completo seguimiento clínico de los pacientes. Además, dichas investigaciones deben llevar un estudio estadístico completo que incluya un análisis multivariante. El estudio estadístico permite conocer el efecto de diversas características del paciente o de su enfermedad sobre los llamados “puntos finales”; ya que múltiples variables o características pueden influir de forma conjunta en la supervivencia y puntos finales, como la recidiva y la metástasis, se puede confundir el efecto conjunto de las mismas, por lo que es imprescindible realizar un estudio estadístico multivariante. En él se analiza el efecto de las características de forma conjunta, identificando aquellas que son verdaderamente influyentes de forma independiente en las variables “punto final”. Dicho de otro modo, identifica los factores pronóstico independientes, es decir, válidos.

Han sido muchos los factores pronóstico epidemiológicos, clínicos e histológicos que se han señalado como tales en el cáncer mamario canino, algunos de ellos “adoptados” de medicina humana. Sin embargo, son pocos los que han demostrado tener un verdadero valor predictivo utilizando la metodología adecuada, es decir, mediante un estudio pronóstico prospectivo y el correspondiente análisis estadístico multivariante.

Desde los comienzos de nuestras investigaciones, la intención de posibilitar la aplicación clínica de los resultados estaba presente y, por ello, nos decidimos a evaluar diversos

marcadores pronóstico que luego mencionaremos. Todos nuestros estudios pronóstico, incluidos los iniciales, se realizaron siguiendo la metodología adecuada. Lo cual no fue fácil. A la dificultad de conducir un estudio clínico prospectivo se añade la complejidad de la estadística de supervivencia y multivariante. Llegados a este punto debo volver a agradecer al Prof. Juan Carlos Illera el haberme proporcionado el contacto clave: el experto en bioestadística Dr. D. Pedro Cuesta. En aquel entonces, en mi Dpto. desconocíamos la existencia de este Servicio de Apoyo a la Investigación de la UCM. La ayuda del Dr. Cuesta durante muchos años ha sido clave. Intenten por un momento imaginarse con qué angustia llevábamos nuestros innumerables datos, tarde tras tarde, a Pedro Cuesta sin tener la menor idea de estadística. Sí, verdadera angustia la que por aquellos años (corría la década de los 90) pasábamos la Dra. Perez Alenza y yo con los datos de nuestras investigaciones y, tarde tras tarde, Pedro Cuesta nos aliviaba de esa angustia como si todo fuera realmente sencillo. Tanto fue así, que decidimos cambiarle el nombre por el del “Padre Cuesta” porque, tras visitarle, salíamos reconfortadas como por una luz divina clarificadora. Este apelativo de Padre Cuesta se usó durante muchos años y se extendió entre los usuarios que nos siguieron en mi Dpto. Creo que él nunca se enteró, (¿o puede que sí?).

Existen pocos estudios pronóstico prospectivos en cáncer mamario canino; normalmente el periodo de seguimiento varía entre los dieciocho meses y dos años y el número de animales con cáncer mamario incluidos oscila entre 45 y 85. En general, menos de la mitad de los animales con cáncer mamario sin otro tratamiento que el quirúrgico mueren de esta enfermedad durante el seguimiento clínico ya que la mortalidad oscila entre el 20 y el 55% (Goldschmidt *et al.*, 2015).

Mencionaré, a continuación, sólo aquellos factores que se ha demostrado su valor pronóstico en estudios prospectivos y con estudios estadísticos completos,

basándome en el capítulo que he escrito como coautora en el próximo libro “Tumors in domestic animals” editado por Donald Meuten (Goldschmidt *et al.*, 2015).

Factores pronóstico epidemiológicos

Edad

El pronóstico de las perras con cáncer mamario que tienen una edad avanzada (de más de 10,9 años) es peor que el de las más jóvenes (Peña *et al.*, 1998, Nieto *et al.*, 2000).

Raza

Las perras de razas pequeñas con cáncer mamario tienen una mayor supervivencia, aunque la explicación de este hecho no se refiera a la enfermedad neoplásica en sí, si no a que los perros de raza pequeña tienen por lo general una vida más larga que los de razas grandes (Peña *et al.*, 2012)

Ovariectomía

En los últimos años se está considerando la ovariectomía tardía como factor pronóstico negativo y positivo. Ya hemos comentado que la castración temprana previene la aparición de tumores mamaros. Pero ¿y la castración tardía? En un estudio reciente hemos podido demostrar que aquellas perras con cáncer mamario que habían sido castradas como máximo 4 años antes de la aparición de las neoplasias, presentaban peor supervivencia (Peña *et al.*, 2012). Sin embargo, existe un efecto beneficioso en la ovariectomía realizada a la vez que la resección quirúrgica de tumores hormono-dependientes (Kristiansen *et al.*, 2014).

Factores pronóstico clínicos

Los factores clínicos que se han asociado de forma más fiable con el pronóstico son: el tamaño tumoral, la afectación de linfonódulos regionales y el estadio clínico (Sorenmo *et al.*, 2011).

Tamaño tumoral

Se suele categorizar el tamaños tumoral según indicaciones de la O.M.S. para los tumores mamarios caninos en: T1<3 cm, T2 3–5 cm y T3>5 cm (Owen, 1980, Lana *et al.*, 2007). El tamaño tumoral T2 y T3 se ha asociado a un peor pronóstico (Peña *et al.*, 1998, Nieto *et al.*, 2000, Zuccari *et al.*, 2004, Peña *et al.*, 2012). En un reciente estudio proponemos subdividir los tumores en menor de 1 cm y mayor de 3 cm para afinar aún más el pronóstico de los tumores T1 (Peña *et al.*, 2012). Sin embargo, ya que el tamaño forma parte de la evaluación clínica del paciente y es uno de los parámetros usados en el establecimiento del estadio clínico, no es una característica de pronóstico independiente.

Afectación de linfonódulos regionales

La metástasis en los linfonódulos regionales se considera un factor de pronóstico clínico clásico. Sin embargo los resultados de los diferentes estudios ofrecen resultados contradictorios, seguramente porque la mayoría son retrospectivos y carecen de una buena cobertura clínica (Sorenmo *et al.*, 2011). En los estudios prospectivos realizados, entre ellos uno de nuestro grupo publicado en el año 2000 (Nieto *et al.*, 2000), se ha demostrado su valor pronóstico sobre todo en análisis univariantes y no multivariantes, ya que al formar parte del estadio clínico, pierde su valor como característica predictiva independiente, como sucede con el tamaño tumoral (Goldschmidt *et al.*, 2015).

Establecimiento de fases clínicas

El llamado “estadiaje” o establecimiento de fases clínicas de perras con tumores mamarios se basa en el llamado sistema TNM: tamaño tumoral, metastasis en linfonódulos regionales y metástasis a distancia. Existen dos sistemas de “estadiaje”: el original de la O.M.S., de 1980 (Owen, 1980), y la modificación de 2007 (Lana *et al.*, 2007). Brevemente, diré que los estados I a III son locales con neoplasias de tamaño creciente T1, T2 y T3, el estadio IV afecta a los ganglios regionales y el estadio V implica metástasis a distancia, normalmente en pulmón que es el órgano diana. Tanto el sistema antiguo de la O.M.S. de establecimiento de fases clínicas, como el modificado han demostrado tener valor pronóstico independiente (Peña *et al.*, 1998, Philibert *et al.*, 2003, Chang *et al.*, 2005, Peña *et al.*, 2012).

Fases clínicas (“estadiaje”) de perras con tumores mamarios^a (Lana *et al.*, 2007)

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

Abreviaturas:

T: tumor primario

T1: <3 cm de diámetro máximo

T2: 3–5 cm de diámetro máximo

T3: >5 cm de diámetro máximo

N: estado de los linfonódulos regionales
(comprobado por histología o citología)

N0: no metástasis

N1: metástasis

M: metástasis a distancia

M0: no metástasis a distancia

M1: se detectan metástasis a distancia

^a Se excluye el carcinoma inflamatorio

Otras características clínicas asociadas a una menor supervivencia son: la ulceración, las recidivas que se desarrollan durante el seguimiento y las metástasis a

distancia en el momento del diagnóstico (Goldschmidt *et al.*, 2015).

Factores pronóstico histológicos

Ciertas características histológicas son válidas como factores pronóstico: el tipo histológico, la invasión vascular y el grado histológico de malignidad.

Tipo de tumor maligno. Invasión vascular

El mayor problema para determinar el pronóstico de los distintos tipos histológicos malignos es, precisamente, su variabilidad histológica. Las perras diagnosticadas con sarcoma mamario son las que peor pronóstico presentan (Hellmen *et al.*, 1993). El carcinoma de menor supervivencia es el carcinoma anaplásico, ya que la media de supervivencia tras la cirugía es de 2,5 meses. En general, los carcinomas sólidos presentan menor supervivencia que los tubulares. La proliferación mioepitelial benigna en tumores malignos confiere un mejor pronóstico a las neoplasias que la poseen, como, por ejemplo, los carcinomas complejos, (Peña *et al.*, 2012). Las células miopiteliales podrían actuar reforzando la secreción de membranas basales y fibronectina y dificultando la acción migratoria de las células neoplásicas (Peña *et al.*, 1994, Peña *et al.*, 1995).

En cuanto al desarrollo de recidivas y metástasis, el tipo histológico de peor pronóstico es el carcinoma sólido (40%), seguido del comedocarcinoma (20%), el carcinoma simple (13,3%), el carcinoma adenoescamoso (13,3%), y, por último, el carcinoma complejo (6,7%).

El carcinoma inflamatorio, del que hablaré posteriormente, es un tipo especial de neoplasia mamaria, muy agresiva, que presenta el peor pronóstico y una supervivencia media de 35 días en las perras que lo padecen (Perez Alenza *et al.*, 2001, Peña *et al.*, 2003a),

aunque el tratamiento con quimioterapia aumenta la supervivencia un mes (Clemente *et al.*, 2009).

Grado histológico de malignidad

El grado histológico de malignidad categoriza los tipos histológicos malignos atendiendo a su malignidad y ofrece un gran valor pronóstico. Con este fin, hemos adaptado el grado que se usa en cáncer mamario humano al cáncer mamario de la perra y hemos demostrado su valor pronóstico. Basándonos en el sistema más usado en humana, el método numérico de Elston y Ellis, también conocido como el método Nottingham (Elston and Ellis, 1991), se establece el grado en el cáncer mamario canino, teniendo en cuenta las características peculiares de las neoplasias con proliferación mioepitelial, tales como carcinomas complejos y carcinomas tipo mixto (Peña *et al.*, 2012).

El grado histológico de malignidad se establece basándose en tres parámetros morfológicos: la formación de túbulos, el pleomorfismo nuclear y el recuento de mitosis.

El sistema de gradación histológica no sólo es útil para el pronóstico, sino que también facilita la comunicación con el clínico, facilitando la interpretación histológica. También unifica criterios entre patólogos veterinarios.

Sistema de grado histológico para cáncer mamario canino (Peña *et al.*, 2012)

A. Formación de túbulos ^a	Puntos	
	1	Formación de túbulos en >75%
	2	Formación de túbulos en 10%–75% (formación moderada de túbulos junto con áreas de crecimiento sólido)
	3	Formación de túbulos en <10% (no hay túbulos o la formación es mínima)
B. Pleomorfismo nuclear ^b	1	Núcleos uniformes o regulares, ocasionalmente con nucléolos visibles
	2	Variación moderada del tamaño y forma de los núcleos, núcleos hipercromáticos, presencia de nucléolos (algunos pueden ser prominentes)
	3	Variación marcada del tamaño de los núcleos, núcleos hipercromáticos, a menudo con ≥ 1 nucléolo prominente
C. Mitosis en 10 campos (40X) ^c	1	0–9 mitosis
	2	10–19 mitosis
	3	≥ 20 mitosis
Grado histológico (A+B+C)	Puntos	Grado de malignidad
	3–5	I (bajo, bien diferenciado)
	6–7	II (intermedio, moderadamente diferenciado)
	8–9	III (alto, poco diferenciado)

^a En tumores complejos y mixtos, el porcentaje de formación tubular se considera sólo en áreas epiteliales. En el mioepitelioma maligno la formación tubular es 2 arbitrariamente. En carcinomas mamarios heterogéneos, la formación tubular se considera en la zona maligna más representativa.

^b En tumores complejos y mixtos el pleomorfismo nuclear se evalúa en todos los componentes malignos.

^c Los campos se seleccionan en la periferia o en las partes de la muestra más activas mitóticamente (no sólo células epiteliales). Diámetro del campo de visión= 0,55mm.

Factores pronóstico inmunohistoquímicos

Desafortunadamente y a pesar de las numerosas publicaciones sobre marcadores inmunohistoquímicos que existen en la literatura, la tinción inmunohistoquímica de tumores mamarios caninos no se realiza rutinariamente para

apoyar al diagnóstico y al tratamiento, sobre todo por el elevado coste que sólo algunos propietarios quieren abordar. Además, al contrario de lo que sucede en medicina humana, el tratamiento anti-hormonal adyuvante no se lleva a cabo, ya que la terapia anti-estrógenos tiene efectos secundarios en la especie canina. Existe otro problema añadido, y es que los diversos trabajos publicados sobre marcadores inmunohistoquímicos emplean diferentes técnicas de laboratorio y una muy variada interpretación. Por ello, muchos de los resultados obtenidos hasta el momento han de ser tomados con cautela. Recientemente, he liderado a un grupo de patólogos veterinarios de diferentes países, expertos en cáncer mamario, para la estandarización de las técnicas inmunohistoquímicas en estas neoplasias, incluyendo la metodología empleada y su evaluación (Peña *et al.*, 2014). Esperamos que esta estandarización produzca sus frutos en los próximos años.

A continuación paso a nombrar sólo algunos marcadores inmunohistoquímicos con probado valor pronóstico y otros con potencial interés. Por similitud con medicina humana, los más importantes son: receptor de estrógenos (RE), receptor de progesterona (RP), HER-2, el índice de proliferación Ki-67 y el tipo molecular de neoplasia mamaria.

RE y RP

Al contrario de lo que se cree, existen muy pocos estudios prospectivos fiables que avalen el uso pronóstico de estos marcadores en el cáncer mamario canino. Nuestro grupo fue el primero que publicó el valor del marcaje inmunohistoquímico del RE para el pronóstico (Nieto *et al.*, 2000). El posible uso pronóstico del RP no se ha demostrado fehacientemente. He de decir, sin embargo, que existen varios estudios retrospectivos que les confieren importancia pronóstica a ambos receptores.

HER-2

El receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano ha sido analizado en algunos trabajos que, por el momento, no ofrecen resultados concluyentes. En cáncer mamario humano se emplea su marcaje para el tratamiento con terapias adyuvantes anti-HER-2.

Índice de proliferación tumoral Ki-67

Se ha demostrado el valor pronóstico de la medición de la proliferación tumoral usando el marcador Ki-67. Nuestro trabajo, publicado en 1998 fue pionero en este sentido (Peña *et al.*, 1998). Pienso que la obtención del índice de Ki-67 es de gran utilidad y sólo motivos económicos frena su uso rutinario en el diagnóstico, pues ofrece una valiosa información en cuanto a la evolución de los animales y la efectividad de la quimioterapia.

Tipo molecular de tumor maligno

Mediante el uso de diversos marcadores que incluyen RE, RP, HER-2, y marcadores de células epiteliales basales, se puede determinar el llamado “tipo molecular”. El tipo molecular se asocia al pronóstico en cáncer mamario humano. En cáncer mamario canino se han identificado los cinco tipos básicos moleculares que son: luminal A, luminal B, basal, el que sobre-expresa HER-2 y el tipo “normal”. Las investigaciones en los tipos moleculares de cáncer mamario canino han comenzado hace pocos años y los resultados sobre su valor pronóstico no son concluyentes (Gama *et al.*, 2008, Sassi *et al.*, 2010). Los tipos “normal” y basal son negativos a RE, RP y HER-2 y por ello se conocen como triple negativos. El cáncer mamario triple negativo es, teóricamente, de mal pronóstico.

Otros marcadores

Otros marcadores de potencial interés por indicar mal pronóstico son P53 (un gen supresor tumoral)(Lee *et al.*, 2004) y la enzima ciclooxygenasa 2 (COX-2)(Queiroga *et al.*,

2010b). COX-2 participa en múltiples procesos carcinogénicos como son la angiogénesis y la invasión, pero su interés en la clínica veterinaria oncológica radica en que la terapia anti-COX-2 se puede emplear con cierto éxito como terapia adyuvante. Existen otros marcadores inmunohistoquímicos de interés, pero no considero que pormenorizarlos sea objeto de este discurso.

V. El cáncer mamario canino como modelo para el cáncer mamario humano

Además de la importancia que tiene el cáncer mamario canino en la clínica veterinaria por su frecuencia y repercusión económica, el cáncer mamario canino espontáneo se ha propuesto como modelo de estudio para el cáncer mamario humano (Queiroga *et al.*, 2011). Facilita este hecho el que existan semejanzas clínicas e histopatológicas y que ambas especies convivan en el mismo hábitat y se encuentren expuestas en gran medida a los mismos carcinógenos ambientales (Severe *et al.*, 2015). Por ello, en principio, parecen ser más los factores que se asemejan que los que difieren entre ambas especies.

Pero siendo un poco más estrictos en el planteamiento, deberíamos decir que existen diferencias evidentes. En general, la proporción de tumores malignos en la mujer es superior a la de la perra y también el grado de malignidad en la especie humana es mayor. La supervivencia al cáncer mamario en ambas especies no es comparable ya que en la mujer se instauran terapias adecuadas que pueden incluir, además de cirugía, tratamientos adyuvantes con quimioterapia y otros, mientras que en la especie canina ni siquiera el tratamiento quimioterápico es aplicado en todos los casos necesarios por decisión de los propietarios, generalmente por motivos económicos. Los órganos diana de metástasis tampoco parecen ser exactamente los mismos. Además del pulmón, que es el órgano diana en ambas especies, en la mujer son

comunes las metástasis en hueso y éstas son muy raras en la perra (Clemente *et al.*, 2010b).

Clínicamente, las perras suelen tener hiperplasias/neoplasias múltiples en sus cinco pares de mamas y cada una de ellas puede ofrecer un diagnóstico histopatológico diferente. Sin embargo, las neoplasias bilaterales sincrónicas son muy poco frecuentes en la mujer (0,2-2%) (Tavassoli, 1999).

Ambas especies presentan una gran variedad de tipos histológicos de cáncer mamario y no todos son comparables. También, algunos criterios de malignidad histológica se consideran de forma diferente. La particularidad más singular del cáncer mamario canino, desde el punto de vista histopatológico, es la abundancia de proliferaciones de células mioepiteliales y su transformación frecuente en tejido óseo y cartilaginoso, siendo este hecho inusual en el cáncer mamario humano. Sólo los tipos tumorales sin crecimiento mioepitelial, es decir, carcinomas simples, deberían poder compararse (Liu *et al.*, 2014). En este grupo de carcinomas sin participación mioepitelial se encuadra el cáncer mamario inflamatorio canino, que es un tipo muy especial de cáncer mamario y es excepcionalmente semejante al cáncer inflamatorio mamario humano, siendo un buen modelo para esta gravísima enfermedad de la mujer, como luego explicaré.

Desde un punto de vista hormonal existen diferencias y semejanzas, tal y como hemos puesto de manifiesto en un trabajo reciente (de Andres *et al.*, 2015). La influencia de progestágenos es mayor en la perra, dado su ciclo estral diferente al mensual de la mujer y existen diferencias en la expresión de receptores hormonales y contenido hormonal en las neoplasias. Por ejemplo, la expresión del RE α es más común en las neoplasias mamarias humanas que en las caninas. Por ello, los estudios comparativos entre ambas especies deberían tener en cuenta posibles diferencias hormonales.

Hay una ventaja innegable en el uso del cáncer mamario como modelo: la duración de la vida de esta especie animal es mucho más corta que la de la especie humana y, por tanto, los estudios de seguimiento clínico son mucho más cortos. Así, en un par de años podemos haber obtenido resultados de un estudio prospectivo terminado.

Los investigadores en cáncer mamario canino “necesitamos” la similitud con el cáncer mamario humano. ¿Por qué? La respuesta es muy sencilla: financiación. En el sistema investigador español y europeo es muy difícil encontrar recursos económicos específicos para nuestros estudios, si no los excusamos como una posible fuente de conocimiento para el cáncer mamario humano, y no siempre es así. La financiación privada de compañías farmacéuticas es factible, pero sólo si la investigación interesa a alguno de sus productos y tampoco suele ser el caso. En fin, no voy a llorarles a ustedes con la falta de recursos económicos para nuestras investigaciones porque, la verdad, es que “nos vamos defendiendo como podemos”. ¡Qué distinto resulta ver las financiaciones privadas en los Estados Unidos! Allí existen una gran cantidad de donantes privados, anónimos o no, que participan económicamente en la investigación de enfermedades de los animales de compañía. Termino este párrafo con una alusión tranquilizadora: no se asusten que no voy a pasar un platillo a la salida para que ustedes contribuyan.

VI. El cáncer mamario inflamatorio humano y canino

El cáncer mamario inflamatorio es un tipo especial de cáncer mamario caracterizado por su agresividad, su rápida aparición y su semejanza con una dermatitis o una mastitis. Precisamente, su aspecto de inflamación es lo que ha originado el término “inflamatorio”. Sin embargo, no es una inflamación, es el cáncer mamario de mayor mortalidad; los datos de Estados Unidos indican que sólo un 40% de las mujeres supera los 5 años de vida tras su detección, a pesar

de los avances en el tratamiento, que es multimodal y agresivo. Aunque afortunadamente, es un cáncer de rara presentación en la mujer, el cáncer mamario inflamatorio es de creciente interés entre los profesionales oncólogos y los investigadores, ya que su prevalencia se ha duplicado en los últimos años y, además afecta a mujeres jóvenes.

Nuestros trabajos en el cáncer mamario inflamatorio canino comenzaron a finales de los años 90. En aquel momento se desconocía prácticamente todo sobre esta enfermedad en la especie canina. Yo diría que el “empecinamiento” de la Dra. Pérez Alenza nos llevó a investigarlo. Y es que, como patóloga, el término “cáncer inflamatorio” “chirriaba” en mis oídos de patóloga purista, pues es contradictorio en sí mismo. Además, en aquel entonces esa nomenclatura no estaba incluida en ninguna clasificación histológica humana o canina. Podemos decir, no sin cierto orgullo, que con nuestras investigaciones hemos definido muchos aspectos de esta enfermedad en la especie canina. En la perra es una enfermedad de mayor frecuencia que en la especie humana y es muy dolorosa, por lo que se suele realizar el sacrificio humanitario aproximadamente al mes de su detección si no se instaura ningún tratamiento (Perez Alenza *et al.*, 2001).

Este cáncer mamario dispone de mecanismos carcinogénéticos diferentes del resto de tipos de cáncer mamario, entre ellos, una marcada angiogénesis, linfangiogénesis y el característico linfangiotropismo, responsable en última medida del aspecto externo de la piel y del edema. Cualquier tipo histológico de carcinoma altamente maligno puede ser un carcinoma inflamatorio si presenta la característica clave de su diagnóstico histopatológico: la presencia masiva de émbolos tumorales en los vasos linfáticos de la dermis superficial.

La similitud de las características clínicas e histopatológicas de esta enfermedad en la perra y en la mujer nos llevó a proponer el cáncer mamario inflamatorio

canino como modelo para el estudio de la enfermedad humana en el año 2003 (Peña *et al.*, 2003a). Nuestros trabajos posteriores han corroborado esta afirmación en otros aspectos comparativos (Clemente *et al.*, 2010a, de Andres *et al.*, 2013, Clemente *et al.*, 2013). Pero no sólo nos conformamos con analizar aspectos en estudio en la enfermedad humana, nuestros siguientes trabajos se han dirigido hacia la investigación de facetas novedosas sin evaluar todavía en la especie humana.

Uno de estas facetas no estudiadas en el cáncer mamario inflamatorio de la mujer es el contenido, extraordinariamente elevado, de hormonas que acontece en estas neoplasias en la especie canina. Nuestra colaboración con el grupo del Dr. Illera comenzó, precisamente, para comprobar si la presencia de gotas lipídicas en las células neoplásicas, que es frecuente en este tipo de cáncer, estaba en relación con el contenido de hormonas esteroides. Según nuestras investigaciones, las iniciales y las posteriores, el carcinoma mamario inflamatorio canino presenta una mecanismo hormonal exacerbado, ya que en homogeneizados de tejidos neoplásicos y en el suero de las correspondientes perras, se aprecia un llamativo incremento de hormonas esteroides y proteicas (Peña *et al.*, 2003b, Queiroga *et al.*, 2005, Illera *et al.*, 2005, Queiroga *et al.*, 2008, Queiroga *et al.*, 2009, Queiroga *et al.*, 2010a, Queiroga *et al.*, 2014), que podrían ser sintetizadas por las propias células tumorales que expresan la enzima p450scc (inicio de la cascada esteroidogénica) y las enzimas sulfatasa y aromatasa, que trasforman los andrógenos en estrógenos (Peña *et al.*, 2003b, Sanchez-Archidona *et al.*, 2007, de Andrés *et al.*, 2015). Recientemente, hemos demostrado esta hipótesis de la secreción hormonal por parte de las células de carcinoma mamario inflamatorio, como ya comentaré más adelante.

Dichas hormonas actuarían en la neoplasia como factores promotores del crecimiento, favoreciendo el crecimiento tumoral de forma autocrina y paracrina,

mediante la unión con sus receptores celulares específicos. Como la mayoría de los carcinomas inflamatorios mamarios caninos son negativos al RE α , y positivos al RE β , otra hipótesis que se derivó es que la acción de los estrógenos se llevaría a cabo a través de este último receptor. También las células tumorales sobre-expresan el receptor de andrógenos (RA), por ello y por la abundancia de los andrógenos en los macerados neoplásicos, emitimos la hipótesis de la participación importante de los andrógenos en este tipo de neoplasia tal especial (Illera *et al.*, 2005, Illera *et al.*, 2006). La relevancia del RE β y del RA y los andrógenos fue puesta de manifiesto por nuestro grupo en el carcinoma mamario inflamatorio de la perra en el año 2005 y comprobada en años posteriores. Y ahora les hago a ustedes un guiño simbólico de orgullo veterinario: los primeros trabajos sobre dichos receptores y los andrógenos en el cáncer mamario inflamatorio de la mujer comenzaron a publicarse en el año 2014. Y efectivamente son de gran importancia.

También hemos sido pioneros en la participación de COX-2 en la linfangiogénesis y en la invasividad celular de este tipo de cáncer (Clemente *et al.*, 2013).

Lo que comenzó siendo una colaboración puntual entre dos grupos de investigación se ha consolidado en un grupo de investigación multidisciplinar y cohesionado, que nos ha permitido seguir avanzando en la investigación de este tipo de cáncer mamario. Y de la investigación clínica, anteriormente citada, y sin abandonarla ni mucho menos, hemos pasado a la investigación experimental, primero del cáncer inflamatorio mamario canino y luego de la mujer. Así hemos realizado xenotransplantes de carcinoma mamario inflamatorio canino en ratones inmunodeprimidos, obteniendo los mismos resultados relativos a hormonas y COX-2 que en los tumores caninos espontáneos (Camacho *et al.*, 2013, Camacho *et al.*, 2014).

Por último, dentro de esta faceta experimental, hemos desarrollado la línea celular de carcinoma mamario inflamatorio canino IPC-366, de la que hablaremos a continuación.

La línea celular IPC-366

Para poder demostrar nuestras hipótesis, para estudiar mecanismos intrínsecos de las células tumorales, para probar nuevos tratamientos y, finalmente, para su comparación con líneas celulares de cáncer mamario inflamatorio humano era necesario disponer de una línea celular de cáncer mamario inflamatorio canino. Dicha línea celular ha sido posible gracias al empuje imparable y entrega del Prof. Illera, que en investigación siempre ve “el vaso medio lleno” y desborda confianza, y al buen hacer, perseverancia y dedicación de Sara Cáceres, que realiza con ello su Tesis Doctoral.

A partir de muestras de necropsia de una perra diagnosticada con esta enfermedad en una clínica veterinaria, se obtuvieron células tumorales viables que fueron cultivadas en cultivo primario y, posteriormente, se establecieron en la línea celular. Es una línea celular bajo patente (nº 201400512), que se caracteriza por ser triple negativa, de altísima malignidad histológica, con un elevado número de células madre de cáncer y que recidiva y metastatiza en los ratones xenotransplantados con un crecimiento muy superior al de las líneas humanas establecidas (Caceres *et al.*, 2015a). La línea celular ha generado un buen recibimiento en la comunidad científica y en el primer mes de su publicación ya hemos recibido varias solicitudes. Gracias a la línea celular, hemos podido demostrar la producción “in situ” de las hormonas esteroideas por parte de las células neoplásicas tanto de cáncer inflamatorio canino como humano (Caceres *et al.*, 2015b).

En la última parte de nuestra investigación hemos contado con la colaboración de investigadores del

M.D. Anderson Cancer Centre de Houston (Universidad de Tejas, Estados Unidos). No puedo dejar de comentar como se estableció dicha relación. En el año 2008 recibí un correo electrónico del Prof. Massimo Cristofanilli, una eminencia en cáncer mamario en la mujer, indicando que estaba muy interesado en el modelo canino de cáncer mamario inflamatorio y solicitando nuestra colaboración. Me comunicaba que estaba formando la primera unidad en el mundo para la investigación y tratamiento de este tipo especial de cáncer mamario. Se pueden imaginar ustedes mi estupefacción y alegría. Y no fue en vano. Unos pocos meses más tarde, nos encontramos con él y con el Prof. Reuben en el primer congreso internacional de IBC (en inglés IBC, de “Inflammatory Breast Cancer”). Desde entonces, tres becarias del grupo han realizado estancias en Houston y mantenemos un nivel de colaboración en el trabajo que no habría podido imaginar ni en el mejor de mis sueños.

Y hablando de sueños, finalizo aquí este discurso en el que he abordado lo que para mí ha sido un sueño: el haberme dedicado a lo que he querido durante todos estos años de investigación y docencia. Me gustaría haber transmitido a esta docta audiencia el entusiasmo que para mí ha significado.

Mi más sinceras gracias por recibirme y por su atención.

He dicho

- CACERES, S., PEÑA, L., DE ANDRES, P. J., ILLERA, J. C., LOPEZ, M. S., WOODWARD, W. A., REUBEN, J. M. & ILLERA, J. C. 2015a. Establishment and characterization of a new cell line of canine inflammatory mammary cancer: IPC-366. *PLoS One* (in press).
- CACERES, S., PEÑA, L., DE ANDRES, P. J., MONSALVE, B., ILLERA, M. J., WOODWARD, W. W., REUBEN, J. M., SILVAN, G. & ILLERA, J. C. 2015b. Steroid hormone secretion in inflammatory breast cancer cell lines. *Steroids*, enviado.
- CAMACHO, L., PEÑA, L., GIL, A. G., MARTIN-RUIZ, A., DUNNER, S. & ILLERA, J. C. 2014. Immunohistochemical vascular factor expression in canine inflammatory mammary carcinoma. *Vet Pathol*, 51, 737-48.
- CAMACHO, L., PEÑA, L., GONZALEZ GIL, A., CACERES, S., DIEZ, L. & ILLERA, J. C. 2013. Establishment and characterization of a canine xenograft model of inflammatory mammary carcinoma. *Res Vet Sci*, 95, 1068-75.
- CLEMENTE, M., DE ANDRES, P. J., PEÑA, L. & PEREZ-ALENZA, M. D. 2009. Survival time of dogs with inflammatory mammary cancer treated with palliative therapy alone or palliative therapy plus chemotherapy. *Vet Rec*, 165, 78-81.
- CLEMENTE, M., PEREZ-ALENZA, M. D., ILLERA, J. C. & PEÑA, L. 2010a. Histological, Immunohistological, and Ultrastructural Description of Vasculogenic Mimicry in Canine Mammary Cancer. *Veterinary Pathology*, 47, 265-274.
- CLEMENTE, M., PEREZ-ALENZA, M. D. & PEÑA, L. 2010b. Metastasis of Canine Inflammatory versus Non-Inflammatory Mammary Tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 143, 157-163.
- CLEMENTE, M., SANCHEZ-ARCHIDONA, A. R., SARDON, D., DIEZ, L., MARTIN-RUIZ, A., CACERES, S., SASSI, F., DOLORES PEREZ-ALENZA, M., ILLERA, J. C., DUNNER, S. & PEÑA, L. 2013. Different role of COX-2 and angiogenesis in canine inflammatory and non-inflammatory mammary cancer. *Vet J*, 197, 427-32.
- CHANG, S. C., CHANG, C. C., CHANG, T. J. & WONG, M. L. 2005. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). *J Am Vet Med Assoc*, 227, 1625-9.
- DE ANDRÉS, P. J., CACERES, S., CLEMENTE, M., MONSALVE, B., ILLERA, M. J., PÉREZ-ALENZA, M. D., ILLERA, J. C. & PEÑA, L. 2015. Increased aromatase immunoexpression in canine inflammatory mammary cancer: a potential therapeutic target. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* (enviado).
- DE ANDRES, P. J., CLEMENTE, M., ILLERA, M. J., MORENO, A., ROMÁN, J. M., PÉREZ-ALENZA, M. D., ILLERA, J. C. & PEÑA, L. 2015. Canine mammary cancer as a model for human breast

- cancer: Hormonal homologies and differences. *PLoS One*, (enviado).
- DE ANDRES, P. J., ILLERA, J. C., CACERES, S., DIEZ, L., PEREZ-ALENZA, M. D. & PEÑA, L. 2013. Increased levels of interleukins 8 and 10 as findings of canine inflammatory mammary cancer. *Vet Immunol Immunopathol*, 152, 245-51.
- ELSTON, C. W. & ELLIS, I. O. 1991. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19, 403-10.
- 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.
- GOLDSCHMIDT, M., PEÑA, L., RASOTTO, R. & ZAPPULLI, V. 2011. Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. *Veterinary Pathology*, 48, 117-131.
- GOLDSCHMIDT, M. H., PEÑA, L. & ZAPPULLI, V. 2015. Mammary neoplasms of the dog and cat. In: MEUTEN, D. J. (ed.) *Tumors in domestic animals*. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.
- GRUNTZIG, K., GRAF, R., HASSIG, M., WELLE, M., MEIER, D., LOTT, G., ERNI, D., SCHENKER, N. S., GUSCETTI, F., BOO, G., AXHAUSEN, K., FABRIKANT, S., FOLKERS, G. & POSPISCHIL, A. 2015. The Swiss Canine Cancer Registry: A Retrospective Study on the Occurrence of Tumours in Dogs in Switzerland from 1955 to 2008. *J Comp Pathol*.
- HELLMEN, E., BERGSTROM, R., HOLMBERG, L., SPANGBERG, I. B., HANSSON, K. & LINDGREN, A. 1993. Prognostic Factors in Canine Mammary-Tumors - a Multivariate Study of 202 Consecutive Cases. *Veterinary Pathology*, 30, 20-27.
- ILLERA, J. C., PEREZ-ALENZA, M. D., NIETO, A., JIMENEZ, M. A., SILVAN, G., DUNNER, S. & PEÑA, L. 2006. Steroids and receptors in canine mammary cancer. *Steroids*, 71, 541-548.
- ILLERA, J. C., SILVAN, G., PEREZ-ALENZA, M. D., SANCHEZ-ARCHIDONA, A. R., NIETO, A. & PEÑA, L. 2005. The possible role of IGF-I and androgens in the development of canine inflammatory mammary carcinoma. *Hormonal Carcinogenesis Iv*, 436-442.
- KRISTIANSEN, V. M., PEÑA, L., KRONTVEIT, R., SKJERVE, E., BREEN, A. M., COFONE, M. A., LANGE LAND, M., TEIGE, J., GOLDSCHMIDT, M. H. & SORENMO, K. U. Year. Hormonal factors and histological grade predict response to ovariectomy in dogs with mammary carcinoma. In: *Veterinary Cancer Society Annual Conference, 2014 San Luis, Missouri, Estados Unidos*.

- LANA, S. E., RUTTEMAN, G. R. & WITHROW, S. J. 2007. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S. J. & VAIL, D. M. (eds.) *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 4 ed. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
- LEE, C. H., KIM, W. H., LIM, J. H., KANG, M. S., KIM, D. Y. & KWEON, O. K. 2004. Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *J Vet Sci*, 5, 63-9.
- LIU, D., XIONG, H., ELLIS, A. E., NORTHRUP, N. C., RODRIGUEZ, C. O., JR., O'REGAN, R. M., DALTON, S. & ZHAO, S. 2014. Molecular homology and difference between spontaneous canine mammary cancer and human breast cancer. *Cancer Res*, 74, 5045-56.
- MISDORP, W., ELSE, R. W., HELLMEN, E. & LIPSCOMB, T. P. 1999. *Histologic Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat*, Washington DC, Armed Force Institute of Pathology and World Health Organization.
- NIETO, A., PEÑA, L., PEREZ-ALENZA, M. D., SANCHEZ, M. A., FLORES, J. M. & CASTANO, M. 2000. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: Clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Veterinary Pathology*, 37, 239-247.
- NIETO, A., PEREZ-ALENZA, M. D., DEL CASTILLO, N., TABANERA, E., CASTANO, M. & PEÑA, L. 2003. BRCA1 expression in canine mammary dysplasias and tumours: Relationship with prognostic variables. *Journal of Comparative Pathology*, 128, 260-268.
- OWEN, L. N. 1980. *TNM classification of tumours in domestic animals* Geneva, World Health Organization
- PEÑA, L., CASTANO, M., SANCHEZ, N. A., RODRIGUEZ, A. & FLORES, J. M. 1995. Immunocytochemical Study of Type-Iv Collagen and Laminin in Canine Mammary-Tumors. *Journal of Veterinary Medicine Series a-Zentralblatt Fur Veterinarmedizin Reihe a-Physiology Pathology Clinical Medicine*, 42, 50-61.
- PEÑA, L., DE ANDRES, P. J., CLEMENTE, M., CUESTA, P. & PEREZ-ALENZA, M. D. 2012. Prognostic Value of Histological Grading in Noninflammatory Canine Mammary Carcinomas in a Prospective Study With Two-Year Follow-Up: Relationship With Clinical and Histological Characteristics. *Vet Pathol*.
- PEÑA, L., FLORES, J. M., CASTANO, M. & GONZALEZ, M. 1990. Intermediate filaments in DMBA-induced mammary adenocarcinomas in rats. *Zentralbl Veterinarmed A*, 37, 614-21.
- PEÑA, L., FLORES, J. M., GONZALEZ, M., PIZARRO, M. & GOMEZ, M. 1991. Flow cytometric analysis of oestrogen receptors in relation to histopathologic characteristics of DMBA-induced mammary tumours in rats. *Exp Pathol*, 43, 221-8.
- PEÑA, L., GAMA, A., GOLDSCHMIDT, M. H., ABADIE, J., BENAZZI, C., CASTAGNARO, M., DIEZ, L., GARTNER, F., HELLMEN, E.,

- KIUPEL, M., MILLAN, Y., MILLER, M. A., NGUYEN, F., POLI, A., SARLI, G., ZAPPULLI, V. & DE LAS MULAS, J. M. 2014. Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. *Vet Pathol*, 51, 127-45.
- PEÑA, L., NIETO, A., ALENZA, M. D. P., RODRIGUEZ, A., SANCHEZ, M. A. & CASTANO, M. 1994. Expression of Fibronectin and Its Integrin Receptor Alpha-5-Beta-1 in Canine Mammary-Tumors. *Research in Veterinary Science*, 57, 358-364.
- PEÑA, L., PEREZ-ALENZA, M. D., RODRIGUEZ-BERTOS, A. & NIETO, A. 2003a. Canine inflammatory mammary carcinoma: histopathology, immunohistochemistry and clinical implications of 21 cases. *Breast Cancer Research and Treatment*, 78, 141-148.
- PEÑA, L., SILVAN, G., PEREZ-ALENZA, M. D., NIETO, A. & ILLERA, J. C. 2003b. Steroid hormone profile of canine inflammatory mammary carcinoma: a preliminary study. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 84, 211-216.
- PEÑA, L. L., NIETO, A. I., PEREZ-ALENZA, D., CUESTA, P. & CASTANO, M. 1998. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10, 237-246.
- PEREZ ALENZA, M. D., RUTTEMAN, G. R., KUIPERSDIJKSHOORN, N. J., PEÑA, L., MONTOYA, A. & CORNELISSE, C. J. 1995. DNA Flow-Cytometry of Canine Mammary-Tumors - the Relationship of DNA-Ploidy and S-Phase Fraction to Clinical and Histological Features. *Research in Veterinary Science*, 58, 238-243.
- PEREZ ALENZA, M. D., RUTTEMAN, G. R., PEÑA, L., BEYNEN, A. C. & CUESTA, P. 1998. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 12, 132-139.
- PEREZ ALENZA, M. D., TABANERA, E. & PEÑA, L. 2001. Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995-1999). *J Am Vet Med Assoc*, 219, 1110-4.
- PHILIBERT, J. C., SNYDER, P. W., GLICKMAN, N., GLICKMAN, L. T., KNAPP, D. W. & WATERS, D. J. 2003. Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. *J Vet Intern Med*, 17, 102-6.
- QUEIROGA, F. L., PEREZ-ALENZA, D., SILVAN, G., PEÑA, L. & ILLERA, J. C. 2009. Positive correlation of steroid hormones and EGF in canine mammary cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 115, 9-13.
- QUEIROGA, F. L., PEREZ-ALENZA, D., SILVAN, G., PEÑA, L., LOPES, C. S. & ILLERA, J. C. 2010a. Serum and intratumoural GH and

- IGF-I concentrations: Prognostic factors in the outcome of canine mammary cancer. *Research in Veterinary Science*, 89, 396-403.
- QUEIROGA, F. L., PEREZ-ALENZA, M. D., GONZALEZ GIL, A., SILVAN, G., PEÑA, L. & ILLERA, J. C. 2014. Clinical and prognostic implications of serum and tissue prolactin levels in canine mammary tumours. *Vet Rec*, 175, 403.
- QUEIROGA, F. L., PEREZ-ALENZA, M. D., SILVAN, G., PEÑA, L., LOPES, C. & ILLERA, J. C. 2005. Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 94, 181-187.
- QUEIROGA, F. L., PEREZ-ALENZA, M. D., SILVAN, G., PEÑA, L., LOPES, C. S. & ILLERA, J. C. 2008. Crosstalk between GH/IGF-I axis and steroid hormones (progesterone, 17 beta-estradiol) in canine mammary tumours. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 110, 76-82.
- QUEIROGA, F. L., PIRES, I., LOBO, L. & LOPES, C. S. 2010b. The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. *Res Vet Sci*, 88, 441-5.
- QUEIROGA, F. L., RAPOSO, T., CARVALHO, M. I., PRADA, J. & PIRES, I. 2011. Canine Mammary Tumours as a Model to Study Human Breast Cancer: Most Recent Findings. *In Vivo*, 25, 455-465.
- SANCHEZ-ARCHIDONA, A. R., JIMENEZ, M. A., PEREZ-ALENZA, D., SILVAN, G., ILLERA, J. C., PEÑA, L. & DUNNER, S. 2007. Steroid pathway and oestrone sulphate production in canine inflammatory mammary carcinoma. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 104, 93-99.
- SASSI, F., BENAZZI, C., CASTELLANI, G. & SARLI, G. 2010. Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *Bmc Veterinary Research*, 6.
- SEVERE, S., MARCHAND, P., GUIFFARD, I., MORIO, F., VENISSEAU, A., VEYRAND, B., LE BIZEC, B., ANTIGNAC, J. P. & ABADIE, J. 2015. Pollutants in pet dogs: a model for environmental links to breast cancer. *Springerplus*, 4, 27.
- 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.
- TAVASSOLI, F. A. (ed.) 1999. *Pathology of the Breast*, New York, NY: McGraw-Hill.
- WEBSTER, J. D., DENNIS, M. M., DERVISIS, N., HELLER, J., BACON, N. J., BERGMAN, P. J., BIENZLE, D., CASSALI, G., CASTAGNARO, M., CULLEN, J., ESPLIN, D. G., PEÑA, L., GOLDSCHMIDT, M. H., HAHN, K. A., HENRY, C. J., HELLMEN, E., KAMSTOCK, D., KIRPENSTEIJN, J., KITCHELL, B. E.,

- AMORIM, R. L., LENZ, S. D., LIPSCOMB, T. P., MCENTEE, M., MCGILL, L. D., MCKNIGHT, C. A., MCMANUS, P. M., MOORE, A. S., MOORE, P. F., MOROFF, S. D., NAKAYAMA, H., NORTHRUP, N. C., SARLI, G., SCASE, T., SORENMO, K., SCHULMAN, F. Y., SHOIEB, A. M., SMEDLEY, R. C., SPANGLER, W. L., TESKE, E., THAMM, D. H., VALLI, V. E., VERNAU, W., VON EULER, H., WITHROW, S. J., WEISBRODE, S. E., YAGER, J. & KIUPEL, M. 2011. Recommended guidelines for the conduct and evaluation of prognostic studies in veterinary oncology. *Vet Pathol*, 48, 7-18.
- ZUCCARI, D. A. P. C., SANTANA, A. E., CURY, P. M. & CORDEIRO, J. A. 2004. Immunocytochemical study of Ki-67 as a prognostic marker in canine mammary neoplasia. *Veterinary Clinical Pathology*, 33, 23-28.