



Facultad de Veterinaria  
**Universidad** Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado

NEOPLASIAS MAMARIAS EN LA GATA

Autor/es

ALEJANDRO SORIANO FITA

Director/es

MARCELO DE LAS HERAS GUILLAMÓN

Facultad de Veterinaria

2015

---

# Índice

Índice .....	1
Resumen.....	3
Abstract .....	4
1    Introducción .....	5
2    Justificación y objetivos.....	7
3    Marcadores moleculares con aplicación en el pronóstico de las neoplasias mamarias felinas	8
3.1    Marcadores que indican alteraciones en la proliferación celular .....	8
3.1.1    Proteína Ki-67 .....	8
3.1.2    Regiones argirófilas de organización nucleolar (AgNORs) .....	10
3.1.3    Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) .....	12
3.1.4    Metalotioneínas (MT).....	12
3.2    Marcadores de señales de autosuficiencia en las señales de crecimiento .....	12
3.2.1    Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal tipo 2 (HER-2).....	13
3.2.2    Sobreexpresión del gen <i>stk</i> .....	15
3.2.3    Transductores de señal y activadores de la transcripción (STATs) .....	15
3.2.4    Receptores de hormonas esteroideas .....	16
3.3    Marcadores indicadores de la pérdida de sensibilidad a las señales inhibitorias del crecimiento .....	19
3.3.1    Expresión del homólogo de la fosfatasa y la tensina (PTEN) .....	19
3.3.2    Activación de AKT .....	20
3.3.3    Ciclinas y kinasas dependientes de ciclinas (CDKs) .....	21
3.3.4    Proteína de unión a la Topoisomerasa II $\beta$ (TopBP1) .....	22
3.4    Marcadores indicadores de evasión de la apoptosis .....	23

3.4.1	Proteína p53 .....	23
3.5	Marcadores indicadores del potencial de replicación ilimitado .....	24
3.5.1	Telomerasa .....	24
3.6	Marcadores indicadores de alteraciones en los mecanismos de angiogénesis .....	25
3.6.1	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) .....	25
3.7	Marcadores indicadores de invasión y metástasis.....	26
3.7.1	Expresión de ciclooxygenasa tipo 2 (COX-2) .....	26
4	Conclusiones .....	27
5	Conclusions .....	27
6	Valoración personal .....	28
7	Bibliografía .....	28

## Resumen

### Neoplasias mamarias en la gata

Las neoplasias mamarias representan el tercer tumor más común en la especie felina. La gran mayoría de estos tumores son malignos. Estas neoplasias se diagnostican principalmente entre los 10 y los 12 años de edad. En gatas de raza Siamesa se diagnostican a edades más tempranas. Se ha visto que al igual que ocurre en la perra, hay una influencia hormonal implicada en la carcinogénesis.

Las neoplasias mamarias malignas en la gata son carcinomas de varios tipos histológicos. Dentro de estos, los más comunes son el carcinoma no infiltrativo (*in situ*), el carcinoma tubulopapilar, el carcinoma sólido y el carcinoma cribiforme.

Este tipo de tumores tienen un pronóstico de reservado a desfavorable, con periodos de supervivencia cortos, que generalmente no superan los 2 años.

Los marcadores moleculares tienen valor pronóstico significativo en el cáncer de mama de la mujer. Recientemente en oncología veterinaria ha aumentado el interés por los marcadores moleculares para determinar el pronóstico de las neoplasias mamarias felinas.

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica actualizada sobre los marcadores moleculares, desde la comprensión de su mecanismo de acción hasta la determinación de su valor pronóstico en las neoplasias mamarias felinas.

## Abstract

### Mammary Neoplasms in the Queen

Mammary gland tumors represent the third most common neoplasm in cats. Almost all of them are malignant and are diagnosed at the age between 10 and 12 years old. In Siamese cats are diagnosed at earlier ages. A hormonal influence involved in tumorigenesis has been shown.

Malign mammary neoplasms in the queen are generally carcinomas of different histologic types. The most common are noninfiltrating (in situ) carcinoma, tubulopapillary carcinoma, solid carcinoma and cribriform carcinoma.

Mammary carcinomas have a reserved to unpromising prognostic, with short survival periods, which generally don't reach more than 2 years.

Molecular markers have significant prognostic value in woman's breast cancer. Recently, the interest on molecular markers to define the prognostic of feline mammary neoplasms has been increased.

The aim of this work is to write a review on molecular markers, from the understanding of their mechanism, to their potential prognostic value in feline mammary neoplasms.

# 1 Introducción

Los tumores mamarios en la especie felina son el tercer tipo de neoplasia maligna más frecuente en la especie felina después de los linfosarcomas y las neoplasias de piel y tejido subcutáneo,<sup>1</sup> representando el 16% de los tumores en la especie felina y un 25% de los tumores en la gata.<sup>3</sup> Aproximadamente el 90% de estas neoplasias son de carácter maligno,<sup>2</sup> con metástasis en nódulos linfáticos (83%), pulmones (83%), hígado (25%) y pleura (22%),<sup>5</sup> lo que les hace ser la causa más frecuente de muerte por neoplasia en la especie felina.<sup>4</sup>

La mayoría de las neoplasias mamarias felinas (NMF) son de tipo simple y de origen epitelial (carcinomas), se clasifican como adenocarcinomas. Las neoplasias mamarias más frecuentes en la gata son el carcinoma no infiltrativo (*in situ*), el carcinoma tubulopapilar, el carcinoma sólido y el carcinoma cribiforme. Son menos frecuentes el carcinoma de células escamosas, el carcinoma mucinoso y el carcinosarcoma.<sup>3,5</sup>

Estas neoplasias son diagnosticadas principalmente entre los 10 y 12 años. El riesgo de aparición aumenta con la edad, siendo significativo a partir de los 7-9 años, a partir de los 12-14 años, el riesgo de aparición sigue aumentando todavía más.<sup>3</sup> Excepcionalmente, en las gatas de raza Siamesa se suelen diagnosticar a edades más tempranas ya que tienen el doble de riesgo que el resto de razas.<sup>2</sup>

La exposición a hormonas ováricas ha sido relacionada con la carcinogénesis, lo que hace que la esterilización quirúrgica sea un factor protector frente al desarrollo de carcinomas mamarios.<sup>6,7</sup> Además, se ha demostrado la relación entre la administración continua de progestágenos exógenos con un incremento del riesgo de desarrollar carcinomas mamarios.<sup>6</sup>

Los carcinomas mamarios en la gata tienen un pronóstico de reservado a desfavorable con supervivencias del 31,8% al año del diagnóstico y del 17,7% pasados 2 años.<sup>8</sup> Aun así, se han realizado estudios sobre **factores pronóstico** que permitan estimar la esperanza de vida tras el diagnóstico o la supervivencia posquirúrgica. Estos factores incluyen el estadio clínico (clasificación TNM), el grado histológico y los marcadores moleculares.

El **estadio clínico** se determina mediante una escala modificada del sistema TNM de la Organización Mundial de la Salud para tumores mamarios humanos. En este sistema, la letra T representa la extensión del tumor primario, la letra N describe el estado de los nódulos linfáticos regionales, finalmente la letra M indica la presencia o ausencia de metástasis. Siguiendo estos criterios se clasifican del estadio I al IV. El estadio clínico está significativamente asociado a la

supervivencia, que varía desde 29 meses en tumores de estadio I a 1 mes en tumores de estadio IV.<sup>3,5</sup>

El sistema de determinación del **grado histológico** en los carcinomas mamarios felinos es una adaptación del sistema de Elston y Ellis (1998), en el que se puntúa el grado de formación tubular, el pleomorfismo nuclear y la actividad mitótica, estableciendo tres grados: carcinomas bien diferenciados o de grado I, carcinomas moderadamente diferenciados o de grado II y carcinomas pobremente diferenciados o de grado III. La determinación del grado histológico parece tener buen valor pronóstico en tumores de grado I y III, pero no en los de grado II.<sup>24</sup>

La **proliferación celular** ha sido estudiada mediante el **índice mitótico**, siendo este un indicador del pronóstico de las neoplasias mamarias felinas.<sup>18</sup> Además se han estudiado marcadores moleculares relacionados con la proliferación celular, estos son: la **proteína Ki-67**, las **regiones argirófilas de organización nucleolar (AgNORs)**, el **antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)** y las **metalotioneínas (MT)**.

Hanahan y Weinberg<sup>23</sup> propusieron seis mecanismos de acción básicos que promueven el crecimiento maligno de las neoplasias, estos son autosuficiencia de las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento, evasión de la apoptosis, potencial de replicación ilimitado, estimulación de la angiogénesis e invasión tisular y metástasis. Para facilitar la comprensión, en este trabajo se clasificarán los marcadores moleculares en relación a estos mecanismos de acción, al igual que hicieron Hughes y Dobson<sup>10</sup> en una revisión sobre el valor pronóstico de los marcadores moleculares en las neoplasias mamarias de la gata.

Las células sanas requieren señales de crecimiento para pasar a un estado de proliferación, que se transmiten a través de receptores localizados en las membranas celulares. La célula sana es incapaz multiplicarse independientemente de las señales de crecimiento, es por eso que muchos oncogenes actúan mimetizando las señales de crecimiento provocando una **autosuficiencia de las señales de crecimiento**. Los marcadores relacionados con este mecanismo son los **receptores con actividad tirosin-kinasa (RTKs)**, los **genes transductores de señal y activadores de la transcripción (STAT)** y los **receptores de hormonas esteroideas (ER y PR)**.

En los tejidos sanos existen multitud de señales inhibitorias del crecimiento que mantienen la homeostasis, estas se ejecutan al activarse los receptores celulares asociados a vías de señalización celular que controlan la progresión del ciclo celular. Por lo que en las células neoplásicas hay una **insensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento**. Dentro de este

mecanismo de acción se hará mención a las **ciclinas**, la **proteína de unión a la topoisomerasa IIβ (TopBP1)**, el **gen homólogo de la fosfatasa y la tensina (PTEN)** y la **AKT**.

La capacidad de multiplicarse de las células tumorales no depende únicamente de la proliferación celular, también depende del mecanismo de apoptosis o muerte celular programada, que está presente en las células de forma latente y se desencadena por una serie de señales fisiológicas. En las células neoplásicas la **evasión de la apoptosis** se realiza normalmente por la pérdida de un regulador pro-apoptótico, provocada por una mutación del gen supresor de tumores *p53*, lo que hace a la **proteína p53** objeto de estudio.

Las células sanas están dotadas de un programa intrínseco autónomo que limita la multiplicación celular, siendo necesario que las células neoplásicas desarrollan un **potencial de replicación ilimitado**, que es un mecanismo relacionado con la **telomerasa**.

Las células neoplásicas inicialmente carecen de capacidad de generar nuevos vasos, esto limita su capacidad de expansión, por consiguiente, deberán desarrollar la capacidad de **estimular la formación de nuevos vasos (angiogénesis)**, relacionada con el **factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)**.

La **capacidad de invasión y metástasis**, permite a los tumores primarios generar células que migran e invaden tejidos adyacentes y desde estos, migran a tejidos distantes donde formarán nuevas colonias. La **ciclooxigenasa-2 (COX-2)** ha sido relacionada con este mecanismo.

En medicina humana se utilizan el estadio clínico, el grado histológico y marcadores moleculares como herramientas para determinar el pronóstico del cáncer de mama en la mujer. En cambio, en oncología veterinaria todavía se utiliza principalmente la clasificación morfológica y el grado histológico.

Recientemente en oncología veterinaria, ha aumentado el interés por el estudio de los marcadores moleculares. La evaluación de estos marcadores como factores pronóstico ayudaría a entender la patogenia de las neoplasias mamarias felinas, permitiendo un manejo clínico más adecuado de las mismas. Asimismo, podría tener implicaciones en el uso de la especie felina como modelo del cáncer de mama en la mujer.

## 2 Justificación y objetivos

Este trabajo consiste en la realización de una revisión bibliográfica sobre los marcadores moleculares mencionados, con los objetivos de:



1. Recopilar información sobre el mecanismo de acción y la expresión de los marcadores moleculares en las NMF.
2. Determinar qué marcadores moleculares tienen valor pronóstico en las NMF.
3. Establecer el papel de las hormonas ováricas en el desarrollo de NMF y la ovariectomía como factor protector.

A continuación se agruparán los marcadores de acuerdo con el mecanismo principal alterado en las células neoplásicas.

### 3 Marcadores moleculares con aplicación en el pronóstico de las neoplasias mamarias felinas

#### 3.1 Marcadores que indican alteraciones en la proliferación celular

La proliferación celular consiste en el aumento del número de células por división celular, está controlada por señales extrínsecas o intrínsecas, que estimulan o inhiben la proliferación tanto en condiciones fisiológicas como en condiciones patológicas. Muchas células neoplásicas no responden a estas señales, lo que les permite llevar a cabo su propia replicación independiente.<sup>50</sup>

##### 3.1.1 Proteína Ki-67

La **Ki-67** es una proteína no histónica formada por cadenas polipeptídicas con un peso molecular de 345 y 395 kD.<sup>12</sup> Aunque algunas de las características de Ki-67 predichas por el estudio de su secuencia hayan sido verificadas, su función todavía sigue siendo, en parte, desconocida.<sup>11</sup> Se sabe que la expresión de la proteína Ki-67 está asociada a la proliferación celular. Esta expresada en células que se encuentran en fases activas del ciclo celular ( $G_1$ , S,  $G_2$  y mitosis), pero en las células en estado quiescente ( $G_0$ ) no lo hacen. Durante la interfase su localización es intranuclear y sin embargo, durante la mitosis gran parte se sitúa en la superficie de los cromosomas.<sup>11</sup>

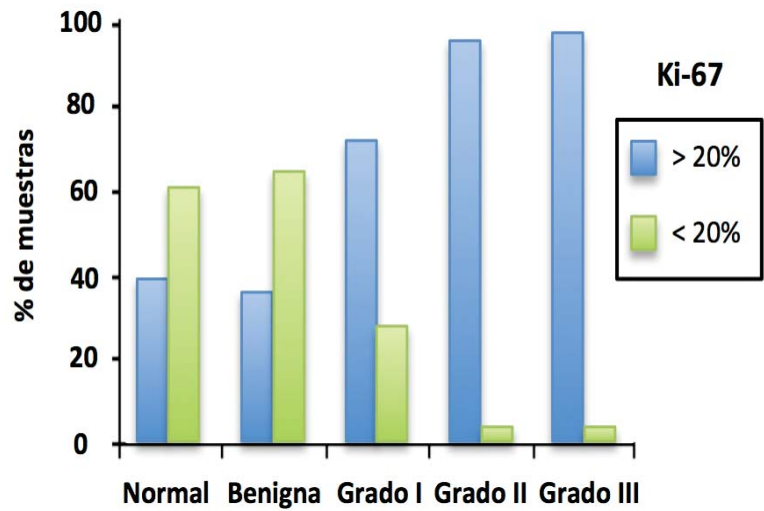
La evaluación de proliferación celular con este marcador se conoce como **índice Ki-67**. El índice se obtiene mediante la tinción inmunohistoquímica con el **anticuerpo monoclonal MIB-1**, específico para la proteína Ki-67. La expresión se evalúa en la periferia del corte histológico o zona donde la proliferación celular parece ser mayor. Se hace un recuento de 1000 células en 10 campos y se calcula el porcentaje de células positivas a la tinción.<sup>13,14</sup>

En las NMF no se han encontrado correlaciones significativas del índice Ki-67 con la edad, el tipo histológico y el tamaño del tumor.<sup>13,14</sup> En cambio, sí se ha encontrado una

correlación con la invasión linfática.<sup>13</sup> Dias Pereira *et al.*<sup>15</sup> encontraron una correlación positiva entre la actividad proliferativa y el grado histológico, siendo el índice Ki-67 mayor en los carcinomas de mayor grado histológico. Posteriormente Morris *et al.*<sup>16</sup> (Figura 1) y Seixas *et al.*<sup>17</sup> obtuvieron resultados similares. Castagnaro *et al.*<sup>14</sup> en un estudio de seguimiento postquirúrgico de un año de duración, establecieron un punto de corte para el índice Ki-67 del 25,2%. Estando los casos con un índice menor o igual al 25,2% asociados significativamente a una mayor supervivencia postquirúrgica. Sin embargo, estudios posteriores (Millanta *et al.*<sup>13</sup> y Preziosi *et al.*<sup>18</sup>) no encontraron una correlación positiva entre el índice Ki-67 y la supervivencia postquirúrgica. La discrepancia de los resultados podría deberse a la exclusión de tumores de bajo grado en algunos estudios.<sup>9</sup>

Parámetro	¿Correlación significativa con Ki-67?	Fuente
Grado Histológico	<b>SÍ</b>	Dias Pereira <i>et al.</i> <sup>15</sup> , Morris <i>et al.</i> <sup>16</sup> , Preziosi <i>et al.</i> <sup>18</sup>
Supervivencia	<b>SÍ</b>	Castagnaro <i>et al.</i> <sup>14</sup> , Soares <i>et al.</i> <sup>48</sup>
	<b>NO</b>	Millanta <i>et al.</i> <sup>13</sup> , Preziosi <i>et al.</i> <sup>18</sup>
Metástasis regional y a distancia	<b>SÍ</b>	Soares <i>et al.</i> <sup>48</sup>

**Tabla 1:** Correlaciones significativas con la proteína Ki-67 (Fuentes: Millanta *et al.*<sup>13</sup>, Castagnaro *et al.*<sup>14</sup>, Dias Pereira *et al.*<sup>15</sup>, Morris *et al.*<sup>16</sup>, Preziosi *et al.*<sup>18</sup>, Soares *et al.*<sup>48</sup>)



**Figura 1:** índice Ki-67 en relación al grado histológico (Fuente: Morris *et al.*<sup>16</sup>)

Recientemente, Soares *et al.*<sup>48</sup> propusieron un nuevo punto de corte óptimo del índice Ki-67 del 14% para identificar tumores con alto riesgo de progresión. Basándose en que los casos con un índice Ki-67 mayor o igual al 14% estaban asociados a un gran tamaño, pobre diferenciación, presencia de áreas necróticas, expresión negativa al receptor de estrógenos (ER) y periodo de supervivencia total corto (Figura 2). Además la expresión de Ki-67 en el tumor

primario era elevada y estaba correlacionada con metástasis regional y metástasis a distancia. Lo que le hace ser un potencial marcador del pronóstico de las neoplasias mamarias felinas.

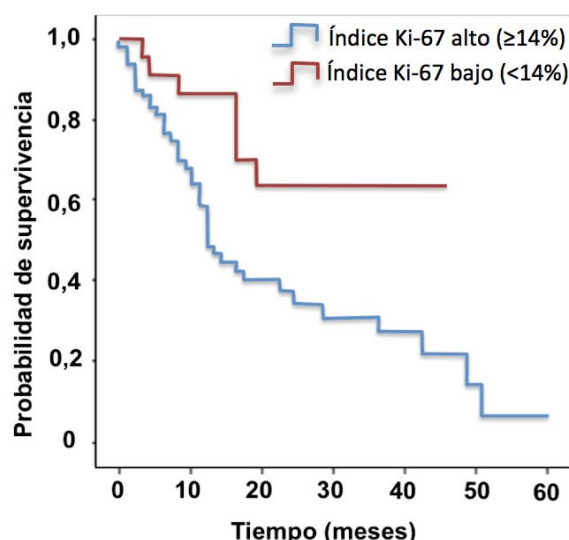


Figura 2: índice Ki-67 en relación a la supervivencia (Fuente: Soares *et al.*<sup>48</sup>)

### 3.1.2 Regiones argirófilas de organización nucleolar (AgNORs)

Las **regiones argirófilas de organización nucleolar (AgNORs)** son unidades estructurales y funcionales de los nucléolos donde se localizan los componentes necesarios para la síntesis del ARN ribosomal. Presentan dos proteínas argirófilas asociadas (nucleína y nucleofosmina), que están implicadas en la transcripción y el procesamiento del ARN ribosomal y permiten la visualización de las AgNORs mediante tinciones de plata. Además el tamaño y el número de las AgNORs podrían estar correlacionadas con la proliferación celular.<sup>21</sup>

El **índice AgNOR** permite evaluar la proliferación celular con este marcador, se calcula contando los puntos de AgNOR teñidos por la tinción de plata a nivel intranuclear y extranuclear sobre un total de 100 células, y se expresa como el valor medio de AgNOR por célula.

Parámetro	¿Correlación significativa con AgNORs?	Fuente
Tipo histológico	NO	De Vico <i>et al.</i> <sup>22</sup>
Estadio clínico	NO	De Vico <i>et al.</i> <sup>22</sup>
Supervivencia postquirúrgica	SÍ	Castagnaro <i>et al.</i> <sup>20</sup> · Preziosi <i>et al.</i> <sup>18</sup>

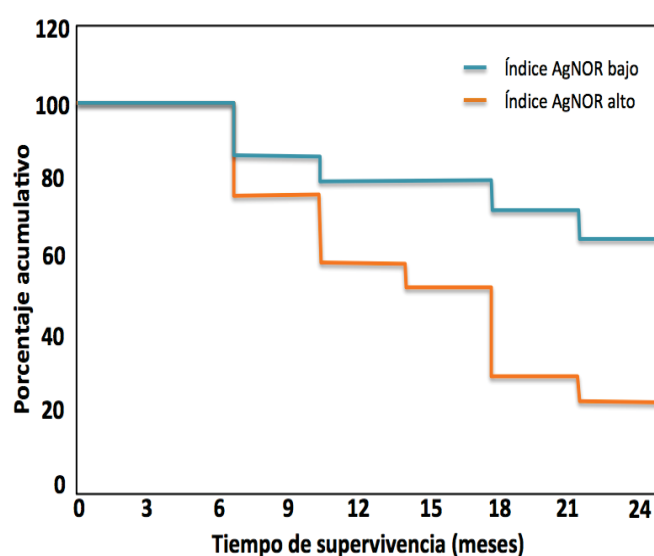
Tabla 2: Correlaciones significativas con las AgNORs (Fuentes: Preziosi *et al.*<sup>18</sup>, Castagnaro *et al.*<sup>20</sup>, De Vico *et al.*<sup>22</sup>)

De Vico *et al.*<sup>22</sup> no se encontraron relación significativa entre el tamaño de las AgNORs y el tipo histológico de tumor, ni con el estadio clínico, por lo que el tamaño de las AgNORs no tendría valor pronóstico significativo.

1 año de supervivencia	Índice AgNOR $\leq 5,9$	Índice AgNOR $> 5,9$
Vivos (%)	21 (78%)	6 (22%)
Muertos (%)	5 (21%)	19 (79%)

**Tabla 3:** Clasificación de las muertes relacionadas con carcinomas mamarios en gatas en 1 año de seguimiento en relación al punto de corte del índice AgNOR de 5,9 (Fuente: Castagnaro *et al.*<sup>20</sup>)

En un estudio posterior de Castagnaro *et al.*<sup>20</sup> se estudiaron 51 casos de carcinomas mamarios felinos con un seguimiento de post-quirúrgico de 1 año, observaron que el número de AgNORs estaba correlacionado significativamente con el tiempo de supervivencia postquirúrgica, relacionando un recuento menor o igual a 5,9 AgNORs por célula con un pronóstico favorable (Tabla 3). Sin embargo, no encontraron ninguna correlación entre la edad y el tipo histológico con el recuento de AgNORs. Preziosi *et al.*<sup>18</sup>, en un estudio sobre 33 casos, que clasificaron según su actividad proliferativa basada en el índice AgNOR, observando diferencias significativas en la supervivencia del grupo de baja actividad proliferativa en relación a la del grupo con alta actividad proliferativa (Figura 3).



**Figura 3:** Curvas de supervivencia de grupos de casos con índice AgNOR alto e índice AgNOR bajo (Fuente: Preziosi *et al.*<sup>18</sup>)

Al no utilizar los mismos criterios en estos trabajos, se obtienen resultados diferentes, por lo que habría que realizar más estudios con más casos para determinar definitivamente el papel de las AgNORs como factor pronóstico de los carcinomas mamarios felinos.<sup>18</sup>

### 3.1.3 Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA)

El **PCNA** también conocido como **proteína asociada a la polimerasa  $\delta$** , es una subunidad auxiliar de la ADN-polimerasa implicada en la reparación del ADN, su máxima concentración se alcanza en las fases G<sub>1</sub> y S del ciclo celular y desciende en las fases G<sub>2</sub> y M.

La tinción inmunohistoquímica es una herramienta potencial para el estudio de la proliferación celular a través de este marcador, aunque su importancia todavía es cuestionable debido a que su vida media puede variar de 8 a 20 h, permitiendo la persistencia de proteínas no degradadas en células que han terminado el ciclo celular recientemente.<sup>19</sup>

Preziosi *et al.*<sup>19</sup> detectaron un aumento significativo de las células PCNA-positivas en las neoplasias malignas en comparación con las benignas, pero no entre la glándula mamaria normal y las lesiones benignas. Finalmente concluyeron que la determinación del PCNA mediante tinción inmunohistoquímica con el **anticuerpo PC10** es un método objetivo para evaluar la actividad proliferativa en neoplasias benignas y malignas.

### 3.1.4 Metalotioneínas (MT)

Las **metalotioneínas (MT)** son proteínas de bajo peso molecular (10.000 Da) y un alto contenido en cistina (30%). Se caracterizan por su afinidad selectiva a metales pesados (principalmente zinc y cobre). Además tienen un papel en la proliferación celular, y adicionalmente en la apoptosis.

Dincer *et al.*<sup>45</sup> observaron que el 30% de los tumores mamarios malignos expresaban MT, en cambio los tumores benignos y la hiperplasia fibroadenomatosa no las expresaban.

## 3.2 Marcadores de señales de autosuficiencia en las señales de crecimiento

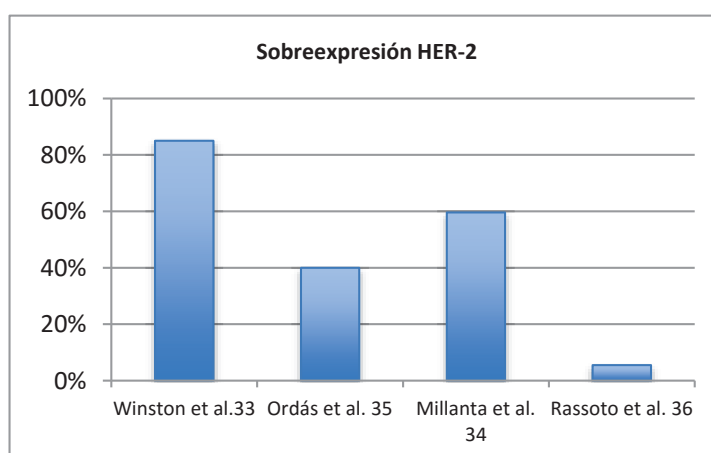
La capacidad de las células para mantener la proliferación de una manera crónica es probablemente el mecanismo más importante en el desarrollo de una neoplasia. En condiciones normales, las células se comunican entre ellas mediante sistemas de señales. Cuando hay una mutación en alguna de las moléculas reguladoras de la vía de señalización, esta puede mantener señales de crecimiento prolongadas en ausencia de la señal iniciadora. Los genes que codifican las proteínas promotoras del crecimiento normal son los **proto-oncogenes**, que cuando mutan se denominan **oncogenes**, estos dotan a la célula de autosuficiencia en las señales de crecimiento.<sup>49</sup>

### 3.2.1 Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal tipo 2 (HER-2)

El **HER-2** es una proteína transmembrana de 185 kD codificada por el proto-oncogén **HER-2/neu** o **c-erbB-2**. Se localiza en las células epiteliales de la glándula mamaria y forma parte de la familia de receptores del factor de crecimiento epidermal.<sup>33,34,36</sup>

La **familia de los receptores del factor de crecimiento epidermal** está formada por cuatro receptores (HER-1, HER-2, HER-3 y HER-4), son receptores con actividad tirosin-kinasa, que participan en el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia celular. Así, cuando se produce la unión ligando-receptor, se activa una cascada de fosforilaciones para la transducción de señales reguladoras de la transcripción de genes relacionados con la proliferación y supervivencia celular. En situaciones en las que hay una sobreexpresión de HER-2, puede aumentar la sensibilidad celular a los factores de crecimiento, permitiendo a la célula proliferar de forma exagerada y produciendo un crecimiento tumoral. HER-2 es el único receptor de los HER, que no tiene un ligando específico, por consiguiente, los factores de crecimiento de los demás receptores, actúan indirectamente como ligandos de HER-2, este receptor regula la proliferación celular y la supervivencia celular.<sup>29</sup>

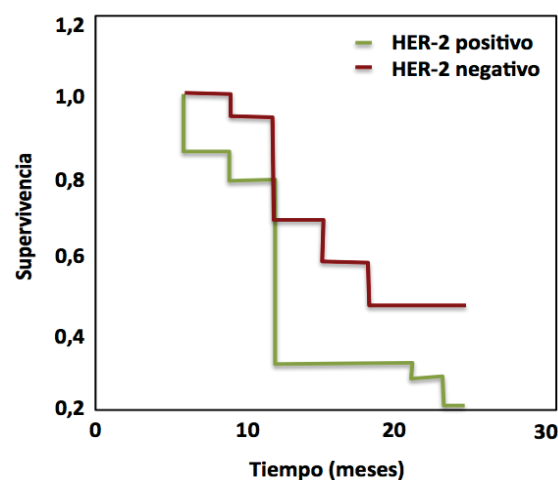
En la mujer se demostró que en un 25-30% de los tumores mamarios HER-2 está sobreexpresado. Esto ocurre de forma secundaria a la amplificación del oncogén **HER-2/neu**. La amplificación y la sobreexpresión de HER-2 parecen estar relacionadas con la carcinogénesis y la metástasis en la especie humana. Los carcinomas mamarios humanos positivos a HER-2 normalmente son tumores poco diferenciados. También se ha considerado como factor pronóstico independiente en pacientes con metástasis en nódulos linfáticos regionales.<sup>29,33,34,35,36</sup>



**Figura 4:** Sobreexpresión de HER-2 en carcinomas mamarios felinos (Fuentes: Winston *et al.*<sup>33</sup>, Ordás *et al.*<sup>35</sup>, Millanta *et al.*<sup>34</sup>, Rassoto *et al.*<sup>36</sup>)

La secuenciación del gen *HER-2/neu* en la gata, reveló una homología del 95% con la especie humana, lo que ha llevado al estudio de la sobreexpresión de HER-2 como factor pronóstico de los carcinomas mamarios felinos.<sup>29</sup> Los resultados publicados son muy dispares y las conclusiones son también muy diferentes. De este modo, Winston *et al.*<sup>33</sup> basándose en la hipótesis de que los carcinomas mamarios felinos podrían sobreexpresar HER-2 en las células neoplásicas epiteliales mamarias, obtuvieron una expresión de HER-2 superior al 85%. Ordás *et al.*<sup>35</sup> hallaron una sobreexpresión de HER-2 en el 40% de los carcinomas mamarios felinos que estudiaron y en el trabajo de Millanta *et al.*<sup>34</sup> la sobreexpresión de HER-2 era del 59,6%. Esta discrepancia entre los resultados podría deberse a la selección de los anticuerpos para las tinciones inmunohistoquímicas, los criterios de valoración de la expresión de HER-2 y otros aspectos relacionados con los protocolos utilizados en cada estudio.<sup>10</sup>

Millanta *et al.*<sup>34</sup> demostraron que la sobreexpresión de HER-2 estaba correlacionada con periodos cortos de supervivencia (Figura 5), lo que sugiere que la evaluación de este marcador podría aportar valor pronóstico. Sin embargo, no encontraron correlaciones significativas con el tipo histológico, ni con el grado histológico ni la invasión linfática.



**Figura 5:** Curvas de supervivencia en carcinomas mamarios HER-2 positivos y HER-2 negativos (Fuente: Millanta *et al.*<sup>34</sup>)

Ordás *et al.*<sup>35</sup> a pesar de que encontraron una sobreexpresión del 40% en los carcinomas mamarios felinos, solo encontraron una amplificación del oncogén del 16,6%, un porcentaje mucho menor que el observado en los carcinomas mamarios humanos (85-90%), proponiendo los carcinomas mamarios felinos como modelo animal para el 10-15% de los carcinomas mamarios humanos en los que hay sobreexpresión de HER-2 pero no se observa amplificación del oncogén.

A pesar de los resultados anteriores, Rassoto *et al.*<sup>36</sup> realizaron un estudio con cinco protocolos diferentes de tinción inmunohistoquímica sobre 73 carcinomas mamarios felinos, obteniendo una sobreexpresión solamente en el 5,5% de los casos, lo que sugiere que HER-2 no tendría un papel significativo en la carcinogénesis y el pronóstico de las neoplasias mamarias felinas.

### 3.2.2 Sobreexpresión del gen *stk*

En el cáncer de colon, de mama, de ovario y de pulmón en humanos, se ha descrito la sobreexpresión de un receptor de la tirosin-kinasa, **el receptor de la proteína estimulante de macrófagos (RON)**. El homólogo de este receptor en el ratón es el *stk*.<sup>10</sup>

El **gen *stk*** y su expresión en los carcinomas mamarios felinos han sido estudiados por De Maria *et al.*<sup>37</sup>, que describieron una gran homología entre las secuencias del gen *stk* felino y del gen *RON* humano. El gen *stk* fue identificado en 10 de 34 carcinomas mamarios felinos, lo que sugiere que el patrón de expresión y distribución de la proteína *stk* en la gata se podría superponer al patrón del receptor RON en la especie humana. No obstante, son necesarios más estudios para determinar el valor pronóstico de la expresión de *stk* en los carcinomas mamarios felinos.<sup>10</sup>

### 3.2.3 Transductores de señal y activadores de la transcripción (STATs)

La familia de los **genes transductores de señal y activadores de la transcripción (STATs)** codifica factores de transcripción citoplasmáticos en estado latente, que transducen señales desde la membrana celular al núcleo (STATs). Los STATs tienen funciones importantes en el control de la proliferación, diferenciación, supervivencia celular y apoptosis. Las citoquinas, los factores de crecimiento y la estimulación de los receptores hormonales inducen la activación de los STATs por fosforilación, que provoca la dimerización de la proteína, posteriormente esta migra rápidamente del citoplasma al núcleo, donde es competente para unirse al ADN.<sup>10,43</sup>

El **STAT3** es un factor de transcripción citoplasmático que tiene un papel en las fases G<sub>1</sub> a S del ciclo celular. Interfiere con los procesos celulares que promueven el crecimiento y la supervivencia de las células neoplásicas, regulando genes importantes implicados en esos mecanismos.<sup>10,43</sup>

Petterino *et al.*<sup>43</sup> en un estudio sobre la expresión del **STAT3 fosforilado en tirosina 705 (STAT3-p-tyr705)** en los carcinomas mamarios felinos, observaron que la expresión de la proteína en las células neoplásicas se correlacionaba con el grado histológico, la formación tubular y la actividad mitótica. En otro estudio posterior sobre la expresión del **STAT3 fosforilado**



en serina 727 (STAT3-p-ser727) en carcinomas mamarios felinos<sup>44</sup>, vieron que la expresión de la proteína estaba correlacionada con un aumento del pleomorfismo, de la actividad mitótica y del grado histológico. Aunque ambos estudios plantean la posibilidad de que la activación aberrante de los STATs podría tener un papel en el desarrollo y la progresión de los tumores mamarios felinos, las conclusiones que se pueden sacar son limitadas debido a que la información sobre el seguimiento clínico de los casos era escasa.<sup>10</sup>

### 3.2.4 Receptores de hormonas esteroideas

En la glándula mamaria normal, las hormonas esteroideas y sus receptores están implicados en su desarrollo y diferenciación. Así, los estrógenos están relacionados con los mecanismos de proliferación y supervivencia de las células epiteliales mamarias. El **receptor de los estrógenos (ER)** está localizado principalmente a nivel nuclear, cuando se une al estradiol, se estimula la proliferación y la supervivencia celular. También aumenta la expresión del **receptor de progesterona (PR)**. La progesterona interviene en el desarrollo alveolar y ductal, su receptor (PR) es de localización nuclear. Además regula la expresión de la **hormona de crecimiento (GH)**.<sup>29</sup> La GH tiene efectos directos sobre el tejido mamario, e indirectos aumentando el **factor de crecimiento insuline-like 1 (IGF-1)**, que estimula la proliferación y supervivencia de las células epiteliales en la glándula mamaria.<sup>3</sup>

El efecto protector de la ovariectomía y la presencia de lesiones neoplásicas y displásicas en gatas tratadas con progestágenos, sugieren que las hormonas esteroideas están implicadas en el desarrollo de carcinomas mamarios en la gata. Sin embargo, la información sobre el mecanismo de acción de las hormonas esteroideas en el desarrollo de tumores mamarios todavía es escasa.<sup>28</sup>

La expresión de los receptores de estrógenos y progesterona no se correlaciona con otros parámetros histológicos ni con la supervivencia. Por lo que la expresión de los receptores de hormonas esteroideas actualmente no se puede considerar como factor pronóstico en las neoplasias mamarias felinas. En cambio, la determinación de estos receptores podría servir para valorar la posibilidad de utilizar terapia endocrina y desarrollar protocolos basados en la administración de un antagonista de PR.<sup>10,27</sup> Misdorp *et al.*<sup>6</sup> en un estudio sobre los factores hormonales implicados en el desarrollo de neoplasias mamarias concluyeron que la ovariectomía era un factor protector contra los tumores malignos pero no contra los tumores benignos. Posteriormente, Overley *et al.*<sup>7</sup> realizaron un estudio para evaluar la influencia de la esterilización quirúrgica en el desarrollo de carcinomas mamarios. Los resultados indicaron que las gatas esterilizadas antes de los 6 meses y antes del año de edad presentaban una reducción

del riesgo de desarrollar carcinomas mamarios respecto a las gatas enteras del 91% y del 86%, respectivamente (Tabla 4). Concluyeron que las gatas esterilizadas antes del año de edad presentan una disminución significativa del riesgo de desarrollar carcinomas mamarios.

Edad en que se realiza la esterilización quirúrgica	Casos		Controles		Reducción del riesgo de desarrollo de carcinomas mamarios
	N	%	N	%	
<6 meses	11	7	49	37	91%
7-12 meses	16	11	46	35	86%
13-24 meses	28	19	13	10	11%
>24 meses	54	36	6	5	No hay beneficio
Gatas enteras	41	27	17	13	—

**Tabla 4:** Influencia de la edad en que se realiza la ovariectomía sobre el desarrollo de carcinomas mamarios (Fuente: Overley *et al.*<sup>7</sup>)

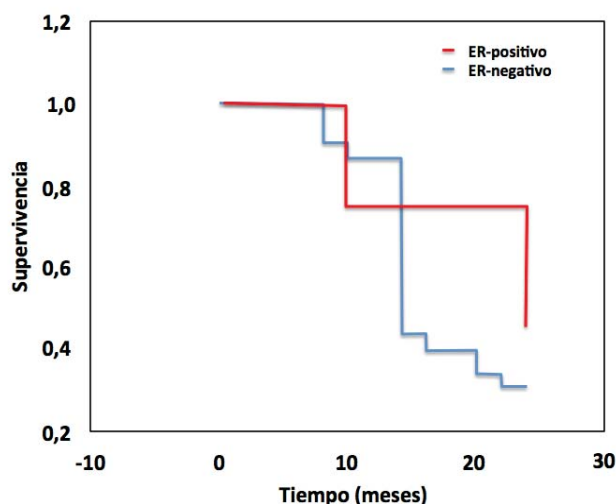
La administración regular de progestágenos exógenos se ha visto asociada al desarrollo de neoplasias mamarias benignas y malignas. Sin embargo, una duración corta del tratamiento o una administración irregular, aunque inducen cambios en la glándula mamaria, se reduce la probabilidad de desarrollar neoplasias malignas.<sup>3</sup> Es necesaria una administración regular y prolongada de progestágenos para el desarrollo de tumores mamarias malignos.<sup>6</sup>

En la actualidad, a diferencia de la especie humana, las determinaciones de ER y PR en las especies canina y felina, no se utilizan de manera rutinaria para determinar el pronóstico de los carcinomas mamarios, ni tampoco se utiliza terapia endocrina.<sup>22</sup>

En cuanto a la expresión del **receptor de estrógenos (ER)**, se ha visto que la mayoría de los tejidos mamarios normales expresan el receptor (76,9%). Dentro de las lesiones benignas, el 25% son ER-positivas. Solo una pequeña parte de las neoplasias mamarias malignas expresan el receptor, siendo ER-positivos 2 de 6 (33,3%) y 4 de 47 (8,5%) carcinomas *in situ* y carcinomas invasivos respectivamente.<sup>27,28</sup> Por lo que la expresión del receptor ER es significativamente mayor en tejidos sanos, lesiones benignas y tumores benignos, que en tumores malignos, siendo ER-negativas algunas lesiones benignas y la mayoría de carcinomas mamarios felinos.<sup>27</sup>

Además se ha detectado que en las áreas displásicas o de tejido normal situado en los alrededores de la lesión principal hay una expresión del 47,7% y del 25% respectivamente.<sup>25</sup> Millanta *et al.*<sup>28</sup> también encontraron lóbulos sanos o hiperplásicos que eran ER-positivos alrededor de lesiones malignas ER-negativas.

Añadiremos, que en gatas que mueren a causa de carcinomas mamarios, la expresión de ER es significativamente menor que en gatas que tienen carcinomas mamarios y siguen vivas (Figura 6).<sup>27</sup>



**Figura 6:** Curvas de supervivencia de gatas con carcinomas mamarios ER-positivos y ER-negativos (Fuente: Millanta *et al.*<sup>27</sup>)

En relación a la expresión del **receptor de progesterona (PR)**, según Martín de las Mulas *et al.*<sup>26</sup> el 38,5% de los carcinomas mamarios felinos expresan el receptor, por lo que parece que las lesiones mamarias benignas, siendo un 66,7% PR-positivas, tienen mayor expresión de PR que las malignas. De forma similar Millanta *et al.*<sup>27</sup> han descrito una expresión de PR significativamente mayor en la hiperplasia epitelial, en el cambio fibroadenomatoso y en los carcinomas *in situ*, que en los tumores malignos. En este mismo trabajo hay discrepancias con un 61% de los carcinomas invasivos PR-positivos a diferencia de los resultados obtenidos por Martín de las Mulas *et al.*<sup>26</sup>

Existe una relación significativa entre la baja expresión del PR y la ovariectomía tanto en lesiones benignas como en malignas.<sup>26</sup>

Según Martín de las Mulas *et al.*<sup>26</sup> el 25% de los carcinomas no expresaba el receptor de estrógenos pero sí el de progesterona (ER-/PR+), el 54% no expresaba ni ER ni PR (ER-/PR-), el 16% era positivo a ambos receptores (ER+/PR+) y el 4% solamente expresaba ER (ER+/PR-). Según estos resultados, aproximadamente la mitad de los carcinomas mamarios felinos (45,8%) expresan al menos uno de los dos receptores, por lo que son tumores hormono-dependientes. Los casos ER+/PR+ y ER-/PR-, representan 2/3 de los casos e indicarían la integridad de la vía molecular de los ER, mediante la cual se induce la expresión de PR.

En otro trabajo, Millanta *et al.*<sup>27</sup> obtuvieron en sus resultados que un 57,4% de las neoplasias invasivas solo expresaban el receptor de progesterona (ER-/PR+), el 34% no expresaba ninguno de los receptores (ER-/PR-), El 4,25% expresaba ambos receptores (ER+/PR+) y el 4,25 solo expresaba ER (ER+/PR-).

	ER+/PR-	ER-/PR+	ER+/PR+	ER-/PR-
Martin de las Mulas <i>et al.</i> <sup>26</sup>	4%	25%	16%	54%
Millanta <i>et al.</i> <sup>27</sup>	4,25%	57,4%	4,25%	34%

**Tabla 5:** Expresión de los receptores ER y PR en los carcinomas mamarios felinos (Fuentes: Martín de las Mulas *et al.*<sup>26</sup>, Millanta *et al.*<sup>27</sup>)

Estas discrepancias entre Martín de las Mulas *et al.*<sup>26</sup> y Millanta *et al.*<sup>27</sup>, sugieren que la expresión de los receptores de progesterona en los carcinomas mamarios no sería necesariamente un buen indicador de la integridad de la vía molecular de los ER.<sup>27</sup>

La gran proporción de carcinomas ER-negativos es una característica que comparten los carcinomas mamarios felinos con los carcinomas mamarios hormono-independientes de la mujer, lo que llevaría a la especie felina a ser apta como modelo animal de este tipo de carcinomas doblemente negativo a marcadores hormonales (ER-/PR-).<sup>27</sup>

### 3.3 Marcadores indicadores de la pérdida de sensibilidad a las señales inhibitorias del crecimiento

Las células neoplásicas deben evadir los mecanismos inhibitorios que regulan la proliferación celular. Las señales inhibitorias son frecuentemente lanzadas por los productos de los **genes supresores de tumores**, que regulan la actividad de promoción del crecimiento de los proto-oncogenes y suele actuar en conjunto con estos. La pérdida de función de uno o varios genes supresores de tumores ocurre prácticamente en todos los cánceres.<sup>49</sup>

#### 3.3.1 Expresión del homólogo de la fosfatasa y la tensina (PTEN)

El **PTEN** es un gen supresor de tumores implicado en mecanismos que tratan de impedir la transformación y progresión tumoral. El PTEN se opone a la actividad de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K), cuya activación en las neoplasias mamarias de la mujer parece estar relacionada con la iniciación y la progresión tumoral. Por consiguiente, la pérdida de expresión del PTEN se ha asociado a periodos de supervivencia cortos tanto en la especie humana como en la especie canina.<sup>10,41</sup> El PTEN también está implicado en la estabilización de las uniones intercelulares que interaccionan con las proteínas de la familia guanilato-quinasa, cuya pérdida de funcionalidad

está relacionada con un aumento de la capacidad de invasión de las células tumorales. Además interacciona con la **p53**, aumentando la transcripción de esta proteína.<sup>41</sup>

	Nº (%) de casos de carcinomas mamarios felinos	
	PTEN-positivo	PTEN-negativo
Con invasión linfática	0 (0%)	9 (100%)
Sin invasión linfática	4 (50%)	4 (50%)

**Tabla 6:** Relación entre la expresión del PTEN y la invasión linfática en gatas con carcinomas mamarios (Fuente: Ressel *et al.*<sup>41</sup>)

Ressel *et al.*<sup>41</sup> realizaron un estudio sobre la expresión de PTEN en los carcinomas mamarios felinos, donde un 76% de los casos resultaron ser negativos. Aunque observaron una correlación significativa entre la pérdida de expresión de PTEN y la presencia de invasión linfática (*Tabla 6*), no encontraron una correlación significativa entre la supervivencia y la pérdida de expresión del PTEN. Esta falta de correlación podría deberse al pequeño número de casos estudiados, por lo que sería necesario un estudio con una población mayor para determinar si la expresión del PTEN es un marcador de pronóstico.

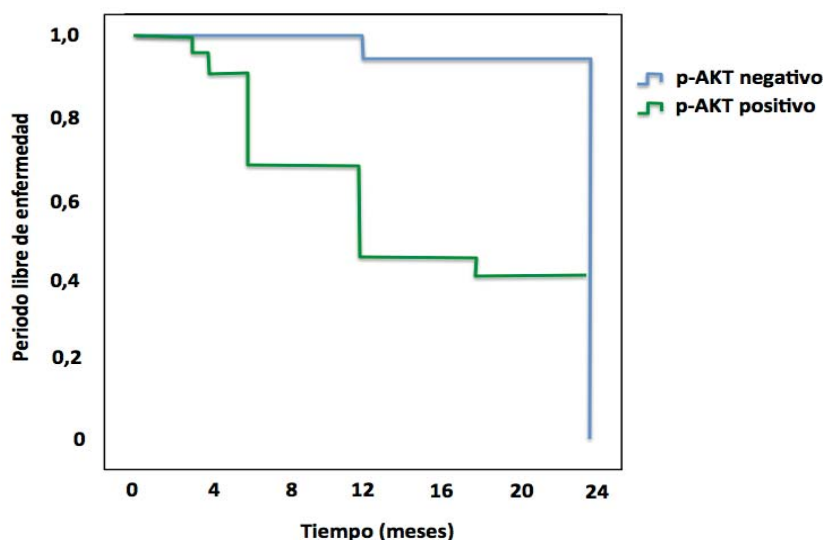
### 3.3.2 Activación de AKT

La **AKT** o **protein-kinasa B**, es una serina/threonina protein-kinasa, que al activarse por fosforilación (**p-AKT**) promueve crecimiento, proliferación, migración y supervivencia celular. La AKT está implicada en la supervivencia celular mediante la fosforilación directa de factores de transcripción que controlan la expresión de genes anti-apoptóticos. La AKT se activa por varios receptores de tirosin-kinasas.

La forma activada de la **fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K)** puede generar **fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3)**, que activa la AKT. En condiciones normales los niveles de PIP3 están regulados por el **PTEN** y otras fosfatasas. En muchas neoplasias humanas, las activaciones aberrantes de la **vía PI3K/AKT/PTEN** están relacionadas con el desarrollo tumoral, la progresión y la resistencia a los tratamientos. Esta activación aberrante se debe a que los factores de crecimiento de la familia del factor de crecimiento epidermal utilizan la vía para activar los receptores de estrógenos (ER) aportando a la neoplasia un crecimiento hormono-independiente.<sup>29,42</sup>

Maniscalco *et al.*<sup>42</sup> investigaron la vía PI3K/AKT/PTEN y la expresión de AKT en 39 neoplasias mamarias, hallando correlaciones positivas entre la expresión de p-AKT con la malignidad del tumor, la pérdida de diferenciación histológica y la aparición de recidivas. Además vieron que los tumores que expresaban p-AKT presentaban un periodo libre de

enfermedad más corto que los tumores que no lo expresaban (Figura 7). Asociaron la expresión de AKT con la expresión de HER-2 y la pérdida de regulación del PTEN. Sin embargo, no encontraron relaciones entre AKT y los receptores de hormonas esteroideas.



**Figura 7:** Relación entre la expresión de p-AKT y la supervivencia (Fuente: Maniscalco *et al.*<sup>42</sup>)

### 3.3.3 Ciclinas y kinasas dependientes de ciclinas (CDKs)

El ciclo celular se encuentra bajo el control de proteínas reguladoras, siendo la mayoría de estas proteínas las **ciclinas** y las **kinasas dependientes de ciclinas (CDKs)**. Las kinasas están presentes a niveles constantes en la célula en crecimiento, pero permanecen de forma inactiva gran parte del tiempo. Para que las kinasas estén activas necesitan unirse a una ciclina, por eso se llaman kinasas dependientes de ciclinas, la actividad de las CDKs varía a lo largo del ciclo celular, siendo las ciclinas las que regulan la actividad de las CDKs.<sup>29</sup>

Mientras que los niveles de CDKs permanecen constantes, los niveles de ciclinas se controlan a nivel de su transcripción y de su catabolismo, lo que hace plantear la hipótesis de que una expresión aberrante de ciclinas podría estar relacionada con el pronóstico de las neoplasias mamarias de la gata.<sup>10</sup>

Son escasos los estudios de estas proteínas reguladoras del ciclo celular en las NMF. Una de estas, la **ciclina A** se expresa en las fases S, G<sub>2</sub> y M del ciclo celular. La ciclina A puede detectarse en la fase S, y aumenta durante la progresión a la fase G<sub>2</sub>. En un estudio de Murakami *et al.*<sup>39</sup> detectaron la ciclina A en un 48,6% de carcinomas mamarios felinos, en cambio, no encontraron expresión de ciclina A en los tumores mamarios benignos (Tabla 7). Lo que sugiere que la ciclina A podría tener un papel en la proliferación de los carcinomas mamarios felinos.

	Nº (%) de casos que expresan ciclina A
Adenosis	0 de 4 (0%)
Fibroadenoma	0 de 2 (0%)
Carcinoma	18 de 37 (48,6%)

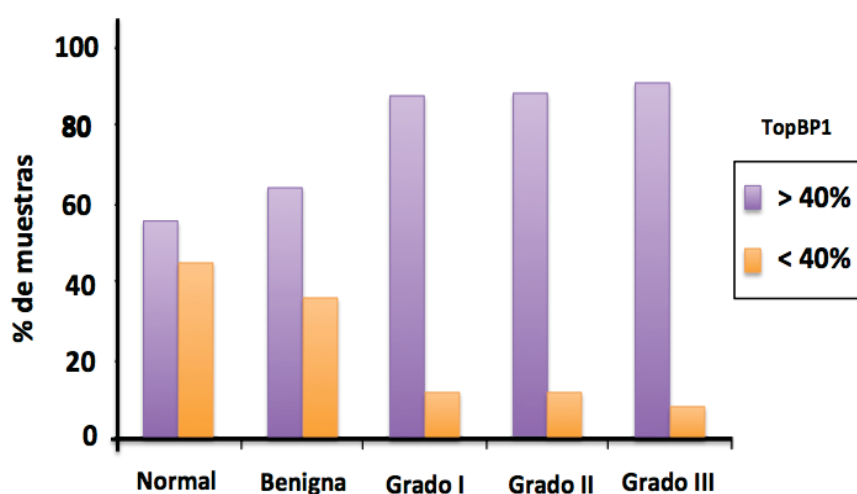
**Tabla 7:** Expresión de ciclina A en lesiones mamarias felinas (fuente: Murakami *et al.*<sup>33</sup>)

### 3.3.4 Proteína de unión a la Topoisomerasa II $\beta$ (TopBP1)

La **proteína de unión a la topoisomerasa II $\beta$  (TopBP1)** interacciona con la ADN polimerasa siendo necesaria para la replicación del ADN.<sup>10</sup>

La TopBP1 tiene similitudes funcionales y estructurales con el **gen *BRCA1***, un gen supresor de tumores cuya mutación se ha detectado en el cáncer de mama familiar y cáncer de ovario en la especie humana. Tanto la TopBP1 como BRCA1 son proteínas nucleares que participan en la fase S del ciclo celular en el origen de la replicación, donde tienen la función del mantenimiento de la horquilla de replicación.<sup>16</sup>

Morris *et al.*<sup>16</sup> describieron una correlación positiva entre la expresión de la TopBP1 y el grado histológico del tumor (Figura 8). Además, muchas neoplasias que sobreexpresaban la p53 o no expresaban el receptor de estrógenos, expresaban la TopBP1. Este estudio, también planteó la posibilidad de que la sobreexpresión de la TopBP1 podría deberse a una mutación en el gen *TopBP1*.



**Figura 8:** Expresión de TopBP1 en relación al grado histológico (Fuente: Morris *et al.*<sup>16</sup>)

### 3.4 Marcadores indicadores de evasión de la apoptosis

La **apoptosis** es una forma de muerte celular programada que puede deberse a un proceso fisiológico normal o como respuesta a un estímulo patológico. Un daño en el ADN puede inducir el mecanismo de apoptosis, que se desencadena por la proteína p53.<sup>50</sup>

La evasión de la apoptosis es una característica esencial que adquiere cualquier cáncer. Puede ocurrir por la pérdida de genes supresores de tumores pro-apoptóticos como el gen *p53* o el gen *PTEN*, reduciendo así la expresión de la proteína p53.<sup>49</sup>

#### 3.4.1 Proteína p53

La **proteína p53** juega un papel importante en la supresión del crecimiento celular y la formación de tumores. Actúa como factor de transcripción, induciendo la expresión de genes implicados en el control del ciclo celular. Además se le han atribuido funciones que podrían participar en la supresión del crecimiento como la regulación de la transcripción, la diferenciación celular y la inhibición de la angiogénesis.

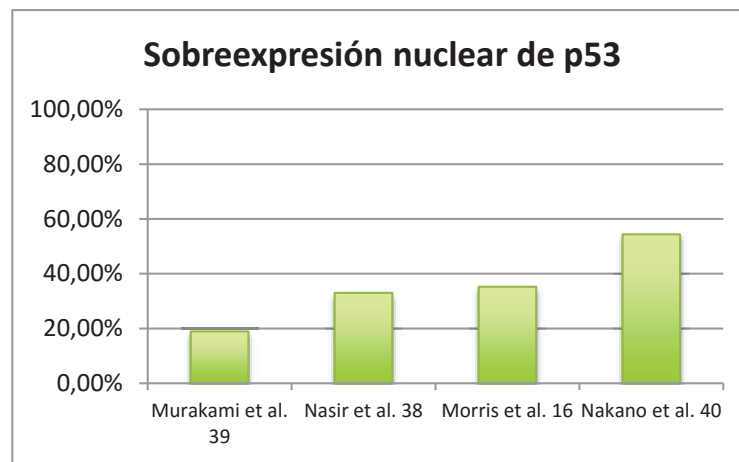
Los niveles de p53 se incrementan cuando existe un daño en el ADN, esta proteína actúa como punto de control del ciclo celular, provocando un bloqueo de la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular, para facilitar la reparación del ADN antes de la replicación. Cuando la reparación no es posible, se activa el mecanismo de apoptosis con el objetivo de eliminar la célula potencialmente tumoral. La p53 actúa a nivel celular a modo de supresor tumoral, por lo que una pérdida en la expresión de p53, tendría como consecuencia una proliferación celular continua. En el cáncer de mama de la mujer se han observado disminuciones o pérdida de la expresión y la actividad de p53.<sup>29,38</sup>

La detección de esta proteína mediante tinciones inmunohistoquímicas, generalmente está asociada a la presencia de una mutación en el gen que la codifica, ya que la proteína p53 cuando no presenta mutaciones, tiene una vida media corta y no se puede detectar por tinción inmunohistoquímica.<sup>29,40</sup> Se han realizado varios estudios utilizando tinciones inmunohistoquímicas para la detección de la sobreexpresión nuclear de p53 en carcinomas mamarios felinos, obteniendo resultados de 18,9%<sup>39</sup>, 33%<sup>38</sup>, 35,2%<sup>16</sup> o 54,5%<sup>40</sup>. Así, Murakami *et al.*<sup>39</sup> concluyeron que p53 podría estar asociada con la carcinogénesis de los carcinomas mamarios felinos. Además, Nakano *et al.*<sup>40</sup> describieron que la sobreexpresión nuclear de p53 era más frecuente en los adenocarcinomas mamarios que en los adenomas.

Mientras que los resultados de Nakano *et al.*<sup>40</sup> sugieren que las alteraciones en la expresión de p53 podrían ser significativamente diferentes entre neoplasias mamarias benignas



y malignas, actualmente no existe ninguna evidencia clara de que la evaluación de la expresión de p53 tenga valor pronóstico para las neoplasias mamarias felinas.<sup>10</sup> Serían necesarios la estandarización de protocolos para la tinción inmunohistoquímica y del sistema de puntuación, además de estudios de seguimientos de casos.<sup>9</sup>



**Figura 9:** Sobreexpresión nuclear de p53 en carcinomas mamarios felinos (Fuentes: Murakami *et al.*<sup>39</sup>, Nasir *et al.*<sup>38</sup>, Morris *et al.*<sup>16</sup>, Nakano *et al.*<sup>40</sup>)

### 3.5 Marcadores indicadores del potencial de replicación ilimitado

Las células normales son capaces de replicarse un número limitado de veces, una vez la célula llega a su límite de replications se induce la senescencia replicativa, cuando la célula llega a este punto no se induce la muerte celular, sino que la célula mantiene la homeostasis y persiste funcional pero sufren cambios genéticos causados por la erosión de los telómeros. Las células neoplásicas deben mantener la integridad de los telómeros para poder continuar replicándose, ya que estos protegen los cromosomas de su destrucción.<sup>49</sup>

#### 3.5.1 Telomerasa

La **telomerasa** es un enzima embrionario, que permite la replicación de los telómeros. La mayoría de las células adultas no expresan la telomerasa, por lo que tienen un número de divisiones limitado hasta que los telómeros se acortan hasta un punto en que se impide la división. Las células neoplásicas son capaces de volver a expresar la telomerasa, lo que les permite seguir multiplicándose de manera ilimitada.<sup>10</sup>

Fusaro *et al.*<sup>46</sup> realizaron un estudio cuantitativo de la telomerasa en los tejidos mamarios de la gata, en el que trataron de establecer el papel de la telomerasa en los carcinomas mamarios felinos mediante protocolo de amplificación de repetición de la telomerasa (TRAP) y tinciones inmunohistoquímicas, sin obtener resultados relevantes. En consecuencia, todavía son

necesarios más estudios para establecer el potencial valor pronóstico de la actividad y la expresión de la telomerasa en los tumores mamarios felinos.

### 3.6 Marcadores indicadores de alteraciones en los mecanismos de angiogénesis

El mecanismo de **angiogénesis** es un proceso que consiste en la formación de nuevos vasos a partir de una red vascular preexistente. Es un mecanismo esencial para el crecimiento, la invasión y la metástasis de los tumores.<sup>31</sup>

#### 3.6.1 Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF)

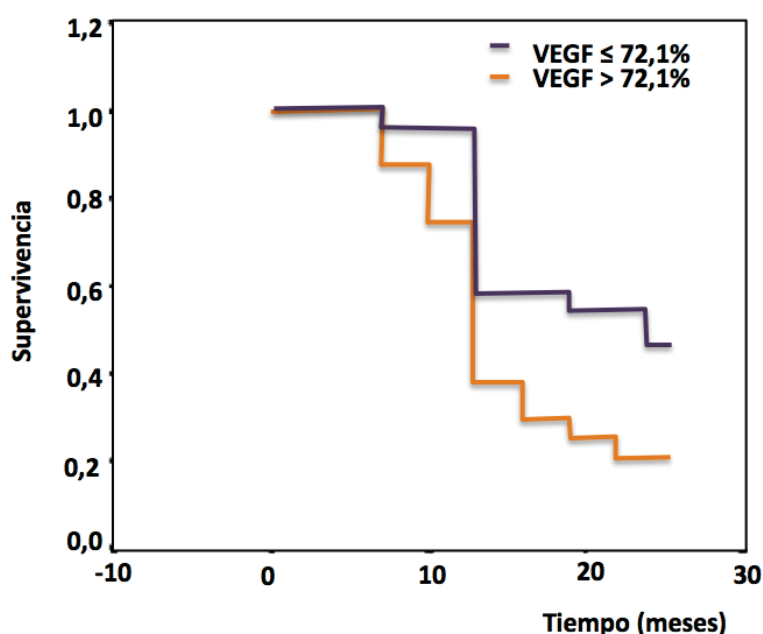
Uno de los factores que juegan un papel importante en la angiogénesis es el **factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)**. El VEGF actúa en las células endoteliales uniéndose selectivamente a sus receptores de alta afinidad, con actividad tirosin-kinasa, estos son los receptores **FIt-1 o receptor VEGF-1** y el **KDR o receptor VEGF-2**. El VEGF provoca la apertura de los canales de calcio para aumentar el calcio intracelular e induce la angiogénesis aumentando la permeabilidad celular y estimulando la mitosis de las células endoteliales.<sup>31</sup>

Millanta *et al.*<sup>31</sup> realizaron un estudio sobre la expresión del VEGF en los carcinomas mamarios felinos. La expresión del VEGF estaba significativamente correlacionada con el tipo histológico con proporciones de células positivas a VEGF superiores en carcinomas papilares y sólidos. En relación al grado histológico, la expresión de VEGF era superior en carcinomas pobremente diferenciados (grado III) que en carcinomas bien diferenciados (grado I), por lo que estaba significativamente relacionada con el grado histológico. En cuanto al pronóstico, las gatas con valores de VEGF superior o igual al 45 % tenían peor pronóstico que las que presentaban un valor de VEGF menor al 45%. Por consiguiente, la producción de VEGF era significativamente mayor en gatas con peor pronóstico.

Parámetro	¿Correlación significativa con VEGF?	Fuente
Tipo histológico	SÍ	Millanta <i>et al.</i> <sup>31</sup>
Pronóstico	SÍ	
Grado histológico	SÍ	Millanta <i>et al.</i> <sup>31</sup> , Millanta <i>et al.</i> <sup>32</sup>
Supervivencia	SÍ	

**Tabla 8:** Correlaciones significativas con el VEGF (Fuentes: Millanta *et al.*<sup>31</sup>, Millanta *et al.*<sup>32</sup>)

Además se ha observado una relación significativa entre la supervivencia total y valores de VEGF. Las gatas con una expresión de VEGF inferior al 72,1% presentaban una supervivencia de  $18,4 \pm 1,3$  meses, en cambio las gatas que presentaban valores mayores de 72,1 % tenían una supervivencia de  $14,2 \pm 1,2$  meses (Figura 10).



**Figura 10:** Expresión del VEGF en relación a la supervivencia (Fuente: Millanta *et al.*<sup>31</sup>)

Posteriormente, en otro estudio de Millanta *et al.*<sup>32</sup> se confirmó la correlación significativa entre la expresión del VEGF con el grado histológico y con la supervivencia total. Asimismo, vieron que la expresión del VEGF y su receptor se observa frecuentemente en los compartimientos epiteliales, endoteliales y estromales de los carcinomas mamarios felinos.

### 3.7 Marcadores indicadores de invasión y metástasis

La **metástasis** es un proceso que requiere la invasión previa de la matriz extracelular, la entrada a vasos sanguíneos o linfáticos, la extravasación de las células tumorales, y finalmente la colonización metastásica.<sup>50</sup>

#### 3.7.1 Expresión de ciclooxygenasa tipo 2 (COX-2)

El **sistema enzimático de la ciclooxygenasa** está formado por dos isoenzimas, la **ciclooxygenasa 1 (COX-1)** y la **ciclooxygenasa 2 (COX-2)**. Ambas enzimas participan en la síntesis de **prostaglandinas** a partir del **ácido araquidónico**. La COX-1 se expresa en casi todos los tejidos y está implicada en actividades fisiológicas normales del organismo (protección de la mucosa gástrica, regulación del flujo sanguíneo renal, agregación plaquetaria). La COX-2 se activa en

respuesta a factores de crecimiento, promotores tumorales, hormonas, endotoxinas bacterianas y citoquinas.

La COX-2 parece estar implicada en procesos de transformación maligna y progresión tumoral, afectando la proliferación celular, la mitosis, la adhesión celular, la apoptosis, la inmunidad y la angiogénesis. La expresión de la COX-2 se ha descrito en varios tumores humanos y en algunos tumores caninos y felinos.<sup>47</sup>

Millanta *et al.*<sup>47</sup> realizaron un estudio sobre la expresión de la COX-2 en carcinomas invasivos caninos y felinos, donde hallaron que en la especie felina los tejidos sanos carecían de expresión de COX-2 mientras que el 96% de los carcinomas expresaban la enzima. Además vieron que en la gata la sobreexpresión de COX-2 estaba correlacionada significativamente con la carencia de expresión de ER y la sobreexpresión de PR, además de la angiogénesis (valorada por la expresión del VEGF).

Aunque aparentemente la expresión de COX-2 podría tener un valor pronóstico en las neoplasias mamarias felinas, existe discrepancia entre estudios debido a la variedad de técnicas utilizadas para valorar la expresión de COX-2.<sup>10</sup>

## 4 Conclusiones

En base a los objetivos planteados en esta revisión, se pueden sacar las siguientes conclusiones:

1. El índice Ki-67 y la expresión del VEGF podrían ser buenos indicadores del pronóstico de las NMF.
2. En la mayoría de los marcadores estudiados, a pesar de haber correlaciones significativas con parámetros histológicos o con el pronóstico, hay discrepancias entre estudios o la información es escasa. Por consiguiente, para establecer el valor pronóstico de estos marcadores serán necesarios más estudios y la estandarización de métodos de valoración.
3. Aproximadamente la mitad de las NMF son hormono-dependientes, sin embargo la expresión de ER y PR no se consideran factor pronóstico, pero se plantea la posibilidad de estudiar posibles terapias endocrinas basadas en antagonistas del PR. La ovariectomía es un buen factor protector siempre y cuando se realice antes del primer año de vida.

## 5 Conclusions

Considering the suggested goals of this review, we can make the following conclusions:

1. Ki-67 index and VEGF expression could be good prognostic markers in feline mammary neoplasms.
2. Despite the fact that most of the molecular markers studied are significantly correlated with histological parameters or prognostic, there are divergences among studies or the information is lacking. Consequently, a standardization of assessment methods and more studies are needed in order to assess the prognostic potential of these markers.
3. About the half of feline mammary neoplasms are hormone-dependent. Nevertheless, ER and PR expression are not considered prognostic markers, but the option of endocrine treatment using antagonists of PR may be studied. Finally, neutering has a good protective effect if is done before the first year.

## 6 Valoración personal

Me decidí a realizar el trabajo de fin de grado sobre este tema porque me interesa el campo de la oncología veterinaria y me pareció interesante estudiar la patogenia de las NMF a nivel molecular.

El hecho de que determinados marcadores moleculares pueden tener implicaciones en la determinación del pronóstico me pareció muy interesante, ya que como hemos visto, las NMF tienen un pronóstico de desfavorable a reservado, por lo que requiere medios para valorar el pronóstico y poder aplicar la terapia adecuada para cada caso, teniendo siempre en cuenta la calidad de vida del paciente.

Aunque actualmente la normalización del uso de marcadores moleculares en la clínica de animales de compañía resulte inviable, en un futuro podría ser una herramienta útil para valorar el pronóstico y también para el desarrollo de terapias moleculares dirigidas.

También he querido hacer referencia en este trabajo a la ovariectomía como factor protector, ya que es un procedimiento quirúrgico que no implica un riesgo importante para el animal y que reduce el riesgo de desarrollo de NMF además de otras patologías del aparato reproductor.

## 7 Bibliografía

1. Dorn, C.R., Taylor, D.O.N., Frye, F.L., Hibbard, H.H., 1968. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa counties, California. I. Methodology and description of cases. *Journal of the National Cancer Institute* 40, 295–305.
2. Hayes, H.M.J., Milne, K.L., Mandell, C.P., 1981. Epidemiological features of feline mammary carcinoma. *The Veterinary Record* 108, 476–479.

3. Sorenmo, K.U., Worley, D.R., Goldschmidt, M.H., 2013. Tumors of the mammary gland, in: *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. Elsevier-Saunders, St Louis (Missouri).
4. Egenvall, A., Nodtvedt, A., Häggström, J., Ström Holst, B., Möller, L., Bonnett, B.N., 2009. Mortality of life-insured swedish cats during 1999-2006: age, breed, sex and diagnosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23, 1175–1183.
5. Giménez, F., Hecht, S., Craig, L.E., Legendre, A.M., 2010. Early detection, Aggressive therapy: optimazing the management of feline mammary masses. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 12, 214–224.
6. Misdorp, W., Romijn, A., Hart, A.A., 1991. Feline mammary tumors: a case-control study of hormonal factors. *Anticancer Research* 11, 1793–1797.
7. Overley, B., Shofer, F.S., Goldschmidt, M., Sherer, D., Sorenmo, K.U., 2005. Association between Ovarihysterectomy and Feline Mammary Carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 19, 560–563.
8. Ito, T., Kadosawa, T., Mochizuki, M., Matsunaga, S., Nishimura, R., Sasaki, N., 1996. Prognosis of malignant mammary tumour in 53 cats. *Journal of Veterinary Medical Science* 58, 723–726.
9. Zappulli, V., Rassotto, R., Caliari, D., Mainenti, M., Peña, L., Goldschmidt, M.H., Kiupel, M., 2015. Prognostic evaluation of feline mammary carcinomas: a review of literature. *Veterinary Pathology* 52, 46–60.
10. Hughes, K., Dobson, J.M., 2012. Prognostic histopathological and molecular markers in feline mammary neoplasia. *The Veterinary Journal* 194, 19–26.
11. Scholzen, T., Gerdes, J., 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology* 182, 311–322.
12. Gerdes, J., Li, L., Schlueter, C., Duchrow, M., Wohlenberg, C., Gerlach, C., Stahmer, I., Kloth, S., Brandt, E., Flad, H.-D., 1991. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *American Journal of Pathology* 138, 867–873.
13. Millanta, F., Lazzeri, G., Mazzei, M., Vannozzi, I., Poli, A., 2002. MIB-I labeling index in feline dysplastic and neoplastic mammary lesions and its relationship with postsurgical prognosis. *Veterinary Pathology* 39, 120–126.
14. Castagnaro, M., de Maria, R., Bozzetta, E., Ru, G., Casalone, C., Biolatti, B., Caramelli, M., 1998. Ki-67 index as indicator of the post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *Research in Veterinary Science* 65, 223–226.
15. Dias Pereira, P., Carvalheira, J., Gärtner, F., 2004. Cell proliferation in feline normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissue - an immunohistochemical study. *The Veterinary Journal* 168, 180–185.

16. Morris, J.S., Nixon, C., Bruck, A., Nasir, L., Morgan, I.M., Philbey, A.W., 2008. Immunohistochemical expression of TopBP1 in feline mammary neoplasia in relation to histological grade, ki67, ER $\alpha$  and p53. *The Veterinary Journal* 175, 218–226.
17. Seixas, F., Palmeira, C., Pires, M., Bento, M., Lopes, C., 2011. Grade is an independent prognostic factor for feline mammary carcinomas: A clinicopathological and survival analysis. *The Veterinary Journal* 187, 65–71.
18. Preziosi, R., Sarli, G., Benazzi, C., Mandrioli, L., Marcato, S., 2002. Multiparametric survival analysis of histological stage and proliferative activity in feline mammary carcinomas. *Research in Veterinary Science* 73, 53–60.
19. Preziosi, R., Sarli, G., Benazzi, C., Marcato, P.S., 1995. Detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in canine and feline mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology* 113, 301–313.
20. Castagnaro, M., Casalone, C., Ru, G., Nervi, G.C., Bozzetta, E., Caramelli, M., 1998. Argyrophilic nucleolar organiser regions (AgNORs) count as indicator of post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *Research in Veterinary Science* 64, 97–100.
21. Derenzini, M., 2000. The AgNORs. *Micron* 31, 117–120.
22. De Vico, G., Maiolino, P., Restucci, B., 1995. Silver-stained nucleolar (Ag-NOR) cluster size in feline mammary carcinomas: lack of correlation with histological appearance, mitotic activity, tumour stage, and degree of nuclear atypia. *Journal of Comparative Pathology* 113, 69–73.
23. Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.
24. Castagnaro, M., Casalone, C., Bozzetta, E., de Maria, R., Biolatti, B., Caramelli, M., 1998. Tumour grading and the one-year post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *Journal of Comparative Pathology* 119, 263–275.
25. Martín de las Mulas, J., van Niel, M., Millán, Y., Blankenstein, M.A., van Mil, F., Misdorp, W., 2000. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in feline mammary gland benign and malignant lesions: comparison with biochemical assay. *Domestic Animal Endocrinology* 18, 111–115.
26. Martín de las Mulas, J., van Niel, M., Millán, Y., Ordás, J., Blankenstein, M.A., van Mil, F., Misdorp, W., 2002. Progesterone receptors in normal, dysplastic and tumorous feline mammary glands. Comparison with oestrogen receptors status. *Research in Veterinary Science* 72, 153–161.
27. Millanta, F., Calandrella, M., Vannozzi, I., Poli, A., 2006. Steroid hormone receptors in normal, dysplastic and neoplastic feline mammary tissues and their prognostic significance. *Veterinary Record* 158, 821–824.
28. Millanta, F., Calandrella, M., Bari, G., Niccolini, M., Vannozzi, I., Poli, A., 2005. Comparison of steroid hormone receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Research in Veterinary Science* 79, 255–232.

29. Peñafiel, C., 2013. Estudio inmunocitoquímico de los tumores de mama de la gata. Universidad de Murcia.
30. Rutteman, G.R., Misdorp, W., 1993. Hormonal background of canine and feline mammary tumours. *Journals of Reproduction and Fertility* 47, 483–487.
31. Millanta, F., Lazzeri, G., Vannozzi, I., Viacava, P., Poli, A., 2002. Correlation of vascular endothelial growth factor expression to overall survival in feline invasive mammary carcinomas. *Veterinary Pathology* 39, 690–696.
32. Millanta, F., Silvestri, G., Vaselli, C., Citi, S., Pisani, G., Lorenzi, D., Poli, A., 2006. The role of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk-1/KDR in promoting tumour angiogenesis in feline and canine mammary carcinomas: A preliminary study of autocrine and paracrine loops. *Research in Veterinary Science* 81, 350–357.
33. Winston, J., Craft, D.M., Scase, T.J., Bergman, P.J., 2005. Immunohistochemical detection of HER-2/neu expression in spontaneous feline mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology* 3, 8–15.
34. Millanta, F., Calandrella, M., Citi, S., Santa, D. Della, Poli, A., 2005. Overexpression of HER-2 in feline invasive mammary carcinomas: an immunohistochemical survey and evaluation of its prognostic potential. *Veterinary Pathology* 42, 30–34.
35. Ordás, J., Millán, Y., Dios, R., Reymundo, C., Martín de las Mulas, J., 2007. Proto-oncogene HER-2 in normal, dysplastic and tumorous feline mammary glands: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *BMC Cancer* 7, 179.
36. Rassotto, R., Caliari, D., Castagnaro, M., Zanetti, R., Zappulli, V., 2011. An immunohistochemical study of HER-2 expression in feline mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology* 144, 170–179.
37. De Maria, R., Maggiora, P., Biolatti, B., Prat, M., Comoglio, P.M., Castagnaro, M., di Renzo, M.F., 2002. Feline STK gene expression in mammary carcinomas. *Oncogene* 21, 1785–1790.
38. Nasir, L., Krasner, H., Argyle, D.J., Williams, A., 2000. Immunocytochemical analysis of the tumour suppressor protein (p53) in feline neoplasia 155, 1–7.
39. Murakami, Y., Tateyama, S., Rungsipipat, A., Uchida, K., Yamaguchi, R., 2000. Immunohistochemical analysis of cyclin A, cyclin D1 and p53 in mammary tumors, squamous cell carcinomas and basal cell tumors of dogs and cats. *Journal of Veterinary Medical Science* 62, 743–750.
40. Nakano, M., Wu, H., Taura, Y., Inoue, M., 2006. Immunohistochemical detection of Mdm2 and p53 in feline mammary gland tumors. *Journal of Veterinary Medical Science* 68, 421–425.
41. Ressel, L., Millanta, F., Caleri, E., Innocenti, V.M., Poli, A., 2009. Reduced PTEN protein expression and its prognostic implications in canine and feline mammary tumors. *Veterinary Pathology* 46, 860–868.



42. Maniscalco, L., Iussich, S., Martín de las Mulas, J., Millán, Y., Biolatti, B., Sasaki, N., Nakagawa, T., de Maria, R., 2012. Activation of AKT in feline mammary carcinoma: A new prognostic factor for feline mammary tumours. *The Veterinary Journal* 191, 65–71.
43. Petterino, C., Ratto, A., Podestà, G., Drigo, M., Pellegrino, C., 2007. Immunohistochemical evaluation of STAT3-p-tyr705 expression in feline mammary gland tumours and correlation with histologic grade. *Research in Veterinary Science* 82, 218–224.
44. Petterino, C., Podestà, G., Ratto, A., Drigo, M., Pellegrino, C., 2007. Immunohistochemical study of phospho-Stat3-ser727 expression in feline mammary gland tumours. *Veterinary Research Communications* 31, 173–184.
45. Dincer, Z., Jasani, B., Haywood, S., Mullins, J.E., Fuentealba, I.C., 2001. Metallothionein expression in canine and feline mammary and melanotic tumours. *Journal of Comparative Pathology* 125, 130–136.
46. Fusaro, L., Panarese, S., Brunetti, B., Zambelli, D., Benazzi, C., Sarli, G., 2009. Quantitative analysis of telomerase in feline mammary tissues. *Brief Research Reports* 21, 369–373.
47. Millanta, F., Citi, S., Della Santa, D., Porciani, M., Poli, A., 2006. COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Breast Cancer Research and Treatment* 98, 115–120.
48. Soares, M., Ribeiro, R., Carvalho, S., Peleteiro, M., Correia, J., Ferreira, F., 2015. Ki-67 as a prognostic factor in feline mammary carcinoma: what is the optimal cutoff value? *Veterinary Pathology* 16, 1–7.
49. Modiano, J.F., 2013. The etiology of cancer, in: Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. Elsevier-Saunders, St Louis (Missouri).
50. Zachary, J.F., McGavin, M.D., 2012. Pathologic basis of veterinary disease, 5th ed. Elsevier Mosby, St. Louis, Missouri.