



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**Sistema de Diagnóstico Citopatológico e  
Histopatológico de Neoplasias de Glándula  
Mamaria en Caninos.**

**T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA  
P R E S E N T A:  
Lima Carrasco Diana Karen**

**ASESOR: Dr. Guillermo Valdivia Anda**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO,**

**2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES-CUAUTITLÁN

**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**



DEPARTAMENTO DE  
EXÁMENES PROFESIONALES

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

**Sistema de Diagnóstico Citopatológico e Histopatológico de Neoplasias de  
Glándula Mamaria en Caninos.**

Que presenta la pasante: DIANA KAREN LIMA CARRASCO

Con número de cuenta: 30628136-3 para obtener el Título de la carrera: Medicina Veterinaria y Zootecnia

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 05 de agosto de 2019.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Guillermo Valdivia Anda	
<b>VOCAL</b>	M. en C. Juan Sebastián Barrientos Padilla	
<b>SECRETARIO</b>	M.V.Z. Iris Pastrana Aguilar	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. Ana María Hernández Villalobos	
<b>2do. SUPLENTE</b>	M.V.Z. David Ramírez Martínez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Este trabajo fue realizado con el equipo e instalaciones del:  
Laboratorio de Diagnóstico Integral Veterinario (DIVET®)

Laboratorio de Patogenicidad Microbiana (L-3) de la Unidad de Investigación  
Multidisciplinaria de la FESC, Campo 4.

Laboratorio de Patogenicidad Microbiana (L-2) de la Unidad de Investigación  
Multidisciplinaria en Salud Animal (UIMSA) de la FESC, Campo 4.

El trabajo se realizó dentro de las actividades del PROYECTO PAPIME:

PE209615

DESARROLLO DE LABORATORIOS Y TALLERES VIRTUALES COMO APOYO  
PARA MEJORAR LA ENSEÑANZA EN LAS ASIGNATURAS DE LAS ÁREAS DE  
LABORATORIO CLÍNICO, PATOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA DEL PLAN DE  
ESTUDIO DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA EN LA FESC.

## DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a mis padres; por su amor, comprensión y sabiduría, por apoyarme todo el tiempo, por generar siempre ese impulso para luchar por mis sueños. Por inculcarme la empatía por los animales desde pequeña. Quedan cortas las palabras para agradecerles por todo, gracias a ustedes he llegado hasta aquí.

A mis hermanas; Olga y Cinthya, por motivarme a ser una mejor persona e inspirarme a crecer profesionalmente y no ser conformista, por ser mis consejeras, y también por ayudarme en cualquier momento sin siquiera dudarlo.

A Benja por apoyarme en mis proyectos y no permitir que me rinda, por tu compañía y amor, por los afectuosos momentos, viajes y experiencias compartidas.

A mi familia, por auxiliarme en toda ocasión, por siempre estar unidos ya sea en las buenas o malas circunstancias.

A Ana por ser mi mejor amiga, por ser mi confidente durante tantos años, por la confianza, por las risas y regaños.

A mis amigos y compañeros por compartir agradables momentos a lo largo de toda la carrera, en especial a Richie, por ser el “homie”, por los buenos ratos, por tus consejos y la confianza.

Y sin dejar a un lado, dedico este trabajo a todas mis mascotas, las cuales han avivado el amor a esta hermosa carrera.

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a la UNAM, la “máxima casa de estudios” por darme las bases necesarias desde el Colegio de Ciencias y Humanidades, y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por toda la experiencia y conocimientos adquiridos a lo largo de esta hermosa carrera.

A mi asesor, el Doctor Guillermo Valdivia Anda, por el tema asignado y su interés en la elaboración de esta tesis.

A los miembros del jurado: M. C. Juan Sebastián Barrientos Padilla, MVZ. Iris Pastrana Aguilar, M. C. Ana María Hernández Villalobos, MVZ. David Ramírez Martínez, por sus observaciones para mejorar este trabajo y por el tiempo dedicado a la revisión de la presente tesis.

Mi gratitud a todos mis profesores de la carrera, quienes me instruyeron, y me ayudaron a mejorar mi formación profesional y personal.

Gracias al apoyo otorgado en el laboratorio Divet®, gracias a Héctor e Irais quienes me facilitaron herramientas para realizar este trabajo, y a mis compañeros con quienes pasé momentos gratos.

“Por mi raza hablará mi espíritu”

# ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE CUADROS.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMEN.....	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Neoplasias de glándula mamaria.....	2
1.2. Etiología.....	3
1.3. Diagnóstico.....	3
1.4. Citopatología.....	4
1.5. Histopatología.....	5
1.6. Técnicas de diagnóstico avanzadas: Inmunohistoquímica.....	6
1.7. Pronóstico.....	7
2. ANTECEDENTES.....	8
3. JUSTIFICACIÓN.....	13

4. HIPÓTESIS.....	14
5. OBJETIVOS.....	15
5.1. Objetivo general.....	15
5.2. Objetivos específicos.....	15
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
6.1. Ubicación.....	16
6.2. Equipo y Material Utilizados.....	16
6.3. Tipo de investigación.....	16
6.4. Investigación científica documental retrospectiva.....	16
6.5. Obtención y revisión de los registros con diagnóstico de neoplasias mamarias de las muestras del laboratorio.....	18
6.6. Investigación y desarrollo tecnológico (sistema digital).....	19
6.7. Investigación científica observacional.....	22
6.8. Análisis entre la evaluación histológica emitida en el laboratorio y la evaluación histológica emitida con el sistema digital.....	23
7. RESULTADOS.....	24
7.1. Resultados de estudios de histopatología.....	34
7.2. Resultados de estudios de citopatología.....	38

7.3. Análisis entre diagnósticos.....	40
8. DISCUSIÓN.....	44
9. CONCLUSIONES.....	51
10. OBSERVACIONES.....	52
11. BIBLIOGRAFÍA.....	53

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de las neoplasias mamarias según el tipo histológico.....	10
Cuadro 2. Grados histológicos de los tumores mamarios caninos.....	12
Cuadro 3. Cuadro 3. Criterios morfo histológicos y citológicos del parénquima y estroma de la glándula mamaria.....	24
Cuadro 4. Criterios morfo citológicos en acines, células ductales y células mioepiteliales.....	25
Cuadro 5. Neoplasias diagnosticadas en el laboratorio y con el sistema digital desarrollado.....	40
Cuadro 6. Escala de valoración de la concordancia; Landis y Koch (1977)....	40
Cuadro 7. Neoplasias benignas de glándula mamaria diagnosticadas en el laboratorio y con el sistema digital desarrollado.....	41
Cuadro 8 . Neoplasias malignas de glándula mamaria diagnosticadas en el laboratorio y con el sistema digital desarrollado.....	42
Cuadro 9. Neoplasias epiteliales malignas de glándula mamaria diagnosticadas en el laboratorio y con el sistema digital desarrollado.....	43
Cuadro 10. Neoplasias benignas diagnosticadas en el laboratorio y con el sistema digital desarrollado.....	43
Cuadro 11. Neoplasias malignas diagnosticadas en el laboratorio y con el sistema digital desarrollado.....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de neoplasias mamarias propuesta por Hampe y Misdorp.....	17
Figura 2. Clasificación de neoplasias mamarias propuesta por Moulton.....	17
Figura 3. Clasificación de neoplasias mamarias propuesta por Goldschmidt y col.....	17
Figura 4. Neoplasias mamarias benignas.....	19
Figura 5. Neoplasias mamarias malignas.....	19
Figura 6. Hojas utilizadas en el programa Excel.....	25
Figura 7. Lectura de laminillas.....	26
Figura 8. Hoja de evaluación de laminillas.....	27
Figura 9. Hoja de sumatorias con los diagnósticos de GM.....	28
Figura 10. Diagnóstico de laminillas. ....	28
Figura 11. Condicionantes de lectura de laminillas.....	29
Figuras 12 y 13. Sección histológica de GM donde se observa anisocitosis en los acines glandulares.....	30

Figuras 14 y 15. Sección histológica de GM donde se observa anisocariosis en los túbulos.....	30
Figuras 16 y 17. Sección histológica de GM que muestra núcleos pleomórficos y mitosis típica en los túbulos.....	31
Figura 18. Sección histológica de GM donde se observa relación N/C aumentada, y material proteináceo en la luz de los acines.....	31
Figuras 19 y 20. Sección histológica de GM que muestra papilas ductales....	32
Figura 21. Sección histológica de GM que muestra matriz cartilaginosa, donde se observan condrocitos.....	32
Figura 22. Células ductales de GM donde se observa anisocitosis.....	33
Figura 23. Células ductales de GM que muestra anisocariosis.....	33
Figura 24. Frecuencia de razas caninas de las muestras histopatológicas recibidas en el laboratorio que son más afectadas con neoplasias mamarias	34
Figura 25. Caninas afectadas con neoplasias mamarias benignas y malignas (edad).....	35
Figura 26. Neoplasias mamarias benignas según el diagnóstico emitido.....	36
Figura 27. Neoplasias mamarias malignas según la clasificación desarrollada.....	37
Figura 28. Neoplasias mamarias según el tamaño (cm) .....	38

Figura 29. Frecuencia de razas de las muestras enviadas al laboratorio con NM en diagnosticadas por citopatología.....	38
Figura 30. Caninos afectados con NM benignas y malignas de acuerdo a la edad en la que enviaron el estudio.....	39
Figura 31. Frecuencia de neoplasias mamarias diagnosticadas con el sistema.....	39

## **ABREVIATURAS**

IHQ	Inmunohistoquímica
MBE	Medicina Basada en Evidencias
NGM	Neoplasias de Glándula Mamaria
NM	Neoplasias Mamarias
OMS	Organización Mundial de la Salud
SD	Sistema Digital
TM	Tumores Mamarios
TMC	Tumores Mamarios Caninos
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México

## RESUMEN

Los tumores mamarios (TM) representan el 50% de todas las neoplasias que afectan a caninos hembras. Debido a su comportamiento similar el canino ha sido propuesto como modelo animal para el estudio del cáncer de mama en mujeres, por ello, las neoplasias mamarias (NM) son de interés para la oncología veterinaria y humana.

El presente trabajo tuvo la finalidad de desarrollar un sistema digital de diagnóstico citopatológico e histopatológico de neoplasias de glándula mamaria en caninos, que fue aplicado a las muestras recibidas en el laboratorio Divet® en el periodo de febrero a junio de 2018. Para ello se realizó la revisión de 120 cortes histológicos y de 15 muestras citológicas pertenecientes a neoplasias de glándula mamaria (NGM), las cuales ya tenían previamente un diagnóstico dentro del laboratorio. Se estableció la comparación entre ambos resultados.

Los resultados con el sistema digital desarrollado muestran que los tumores mamarios benignos 55% (66/120) fueron casi igualmente frecuente que los malignos 45% (54/120), las muestras citopatológicas e histopatológicas de la raza más enviada y afectada fue la Poodle, representando el 21.7% (26/120) de la población, y la edad de presentación más frecuente fue en perras de 13 años, con un 14.2% de la población estudiada.

Se obtuvo una sensibilidad, especificidad e índice de concordancia kappa de (1,00) entre el diagnóstico emitido por el laboratorio y el sistema digital desarrollado para las neoplasias benignas y malignas de glándula mamaria.

Palabras clave: glándula mamaria, neoplasias mamarias, sistema digital.

## INTRODUCCIÓN

La glándula mamaria es un órgano integrado por tejido apócrino modificado presente sólo en mamíferos, consiste en una red de ductos rodeados por un estroma rico en tejido fibrovascular y adiposo. El desarrollo de esta glándula es único y su etapa final del crecimiento se da en la hembra adulta durante la preñez, donde proliferan los ductos y se diferencian en acinos productores de leche; al final de la lactación involuciona preservando su estructura ductal. Las neoplasias originadas a partir de la glándula mamaria representan en Medicina Veterinaria la forma más común de enfermedad neoplásica en perras enteras (Salas y col., 2018).

Una neoplasia es un crecimiento descontrolado de las células cuando falla uno de los mecanismos de control del ciclo celular, está caracterizado porque las células transformadas escapan de los límites normales de la división celular, llegan a ser independientes de estimuladores externos de crecimiento y factores inhibitorios, y pierden su susceptibilidad a señales apoptósicas, esto resulta en un desbalance entre la división celular, la muerte celular y un aumento neto en el tamaño del tumor (Zachary y McGavin, 2012). Además, estas células pueden migrar e invadir tejidos lejanos, donde encuentran un nicho apropiado para continuar su crecimiento originando una metástasis que en muchas ocasiones es la causa de muerte de los individuos afectados (Sánchez, 2013).

El proceso por el cual las células normales se transforman en cancerosas se denomina carcinogénesis. El rol de las alteraciones genéticas en la carcinogénesis fue puesto de manifiesto al descubrir en el genoma humano, genes homólogos a genes retrovirales relacionados previamente con el desarrollo de tumores. En células normales estos genes se denominan protooncogenes y se relacionan con el crecimiento y proliferación de las células normales. Cuando se encuentran

mutados se denominan oncogenes y su mutación es de tipo dominante, es decir, sólo es necesario que uno de los alelos sufra una mutación para que la proteína que codifica gane funcionalidad. Esto generalmente se traduce en aumento de supervivencia y proliferación (Sánchez, 2013).

Las neoplasias en general, incluyendo las variedades benignas y malignas difieren de otros tipos de crecimiento tisulares en al menos cuatro aspectos: no tienen un fin determinado, lo cual significa que no tienen una utilidad determinada para el huésped; tienden a ser atípicos, es decir, que sus patrones microscópicos, sus células individuales son estructuralmente y funcionalmente anormales, en diferentes grados; tienden a ser autónomos, esto es, pretenden escapar de los controles que regulan el crecimiento y tienden a ser agresivos (Lleonart y col., 2000).

### **1.1. Neoplasias de glándula mamaria**

Debido a su comportamiento similar, las neoplasias mamarias (NM) en perras son de interés para la oncología humana, y han sido propuestas como modelo animal para el estudio del cáncer de mama en mujeres (Salas y Romero, 2013). Al igual que sus contrapartes humanas, estos tumores ocurren casi exclusivamente en hembras, y raramente en machos (Cassali y col., 2006). Después de los tumores cutáneos, las NM son los tumores más frecuentes en caninos (Raskin y Meyer, 2010).

Los perros tienen cinco pares de glándulas, las cuales todas pueden desarrollar uno o más tumores, benignos o malignos (Withrow y Vail, 2009). Las mamas abdominales caudales e inguinales son las de mayor desarrollo en cada ciclo y las más propensas a desarrollar desórdenes proliferativos. Las neoformaciones

múltiples se originan de manera simultánea o sucesiva, en la misma u otra mama (Meuten, 1990).

## **1.2. Etiología**

Existen diversas hipótesis respecto a los factores desencadenantes de los tumores mamarios en caninos (TMC), estas incluyen: alteración de genes supresores de tumores como el P53, activación de oncogenes y trastornos relacionados con las hormonas sexuales (Cruz y col., 2015).

Múltiples estudios relacionan la actividad hormonal propia del ciclo sexual con la frecuencia de aparición de NM, llegando a establecer cifras de un 0.5% de tumores en perras esterilizadas antes del primer celo, un 8% para perras esterilizadas entre el primer y segundo celo, y subiendo el porcentaje de aparición de tumores a un 26% en hembras esterilizadas a partir del segundo celo (Romairone y Cartagena, 2014).

Se han identificado receptores de estrógenos y progesterona en el tejido mamario normal, hiperplásico/displásico, y en la mayoría de las NM. Interesadamente la expresión del receptor hormonal, que es una característica típica de las células epiteliales mamarias maduras, tiende a ser reducido o a estar ausente, en tumores pobremente diferenciados y en lesiones metastásicas (Raskin y Meyer, 2010).

## **1.3. Diagnóstico**

Los tumores mamarios (TM) en caninos han aumentado considerablemente en los últimos años, lo que exige un diagnóstico rápido y un tratamiento eficaz para determinar la supervivencia del animal (Andrade y Figueiroa, 2010).

El diagnóstico precoz de los TM se debe realizar en la clínica y también entrenando al propietario en la exploración de su mascota, sobre todo en hembras enteras, en los periodos posteriores al celo (Romairone y Cartagena, 2014). Durante el examen clínico, deben explorarse las dos cadenas mamarias y los ganglios linfáticos regionales. El estatus de los linfonodos regionales tiene un fuerte impacto en la supervivencia de los pacientes (Salas, y col., 2018); (Hellmen y col., 1993).

#### **1.4. Citopatología**

La citología puede indicar si se trata de un proceso neoplásico, quístico o inflamatorio, obteniéndose resultados en tan solo minutos sin tener que esperar los resultados del examen histopatológico y de esta manera orientar al médico en su decisión terapéutica (Núñez y Montes, 2012).

Las lesiones de la glándula mamaria suponen un reto especial debido a la diversidad de tipos celulares que pueden estar involucrados y a la frecuente superposición de poblaciones celulares dentro de las lesiones hiperplásicas, displásicas, neoplasias benignas y malignas (Cowell y col., 2009).

Una desventaja es que muchos procesos inflamatorios o hiperplásicos presentan características similares a los tumores benignos o malignos bien diferenciados. Además, muchos TM son mixtos; con componente epitelial y conjuntivo. Por último, si el tumor mamario presenta zonas quísticas, las células de revestimiento de estas áreas pueden presentar más atipias que el propio tejido sólido neoplásico. Por todo ello, no se recomienda basar el diagnóstico de los TM en el estudio citológico. La principal utilidad del diagnóstico citológico es establecer un diagnóstico diferencial con otros tumores cutáneos o subcutáneos localizados en el área mamaria (lipomas, mastocitomas); (Martínez, 2008).

## **1.5. Histopatología**

Cuando se efectúan comparaciones, evaluaciones y estimaciones del diagnóstico, el “estándar de oro” continúa siendo el diagnóstico histopatológico, debido a que permite conocer datos referidos a la extensión local de la neoplasia, invasión vascular, presencia de necrosis y otros. La descripción de éstas y otras características histológicas tienen, en mayor o menor medida, valor pronóstico (Rosciani y col., 2015). Nos permite determinar el tipo del tumor, el carácter benigno contra maligno, grado histológico y así establecer un pronóstico más preciso (Meuten, 1990).

Si la neoplasia es muy voluminosa es preferible remitir múltiples porciones del tumor que incluyan los límites visibles del mismo y el tránsito con el tejido aparentemente sano periférico, ya que en estas zonas se evaluará el tipo de crecimiento (expansivo o infiltrativo) y la presencia de fenómenos de embolización vascular. En caso de presentación múltiple de tumores es recomendable la extirpación de un número representativo de ellos, dado que en caninos es común que puedan aparecer en el mismo animal tumores de diferente naturaleza y malignidad (Cartagena, 2011).

La evaluación de los márgenes quirúrgicos en el estudio histopatológico es de suma importancia, los márgenes laterales, profundos y superficiales deben ser evaluados para la presencia de células neoplásicas. Por último, para determinar la estadificación clínica precisa de la neoplasia se deben realizar radiografías de tórax en tres posiciones: ventrodorsal, latero lateral derecho e izquierdo, como un procedimiento estándar de diagnóstico para la evaluación de la enfermedad pulmonar metastásica, debido a que la observación de metástasis a distancia se asocia con un pronóstico grave (Salas y col., 2018).

No es posible diferenciar clínicamente entre tumor benigno o maligno de mama. No obstante, algunos signos clínicos (rápido crecimiento, ulceración, tamaño del tumor y fijación a los tejidos circundantes) pueden indicar malignidad (Meuten, 1990). Ocasionalmente resulta un problema diagnosticar las neoplasias verdaderamente malignas, para ello es de utilidad tener presente el tipo de tumor, el grado de pleomorfismo celular y nuclear, el índice mitótico, la presencia de áreas de necrosis, invasión microvascular y metástasis a linfonodos regionales (Goldschmidt y col., 2011).

### **1.6. Técnicas de diagnóstico avanzadas: Inmunohistoquímica**

El auge de la oncología veterinaria y el desarrollo de técnicas diagnósticas en la actualidad van de la mano con el uso de biomarcadores, entendiendo como biomarcador aquellas moléculas, caracteres o genes, que debido a su asociación con otras moléculas pueden ser detectados con el fin de indicar expresión de otros genes y permitir un efecto cuantificable. Uno de los ejemplos más sencillos es el uso de anticuerpos para inmunohistoquímica (IHQ) con el fin de detectar receptores que se encuentran en el núcleo, citoplasma o membrana citoplasmática de las células transformadas (Salas y Romero, 2016). La IHQ reconoce antígenos en cortes histológicos mediante la incubación de los cortes con anticuerpos específicos y pone de manifiesto la reacción inmunológica mediante una reacción histoquímica (enzima-sustrato) colorimétrica (visible); (Raskin y Meyer, 2010).

Entre las principales aplicaciones de esta técnica se encuentran: lesiones proliferativas epiteliales, lesiones papilares, carcinoma "*in situ*" ductal contra lobulillar, lesiones esclerosantes y carcinoma "*in situ*" contra carcinoma invasor (Vilches y col., 2010).

Desafortunadamente y a pesar de las numerosas publicaciones sobre marcadores inmunohistoquímicos que existen en la literatura, la tinción IHQ para TMC no se realiza rutinariamente para apoyar al diagnóstico y tratamiento, debido al elevado costo que sólo algunos propietarios quieren aceptar (Nieto y col., 2000).

### **1.7. Pronóstico**

La gravedad y pronóstico de los TM dependerá de varios factores: tamaño del tumor, tipo histológico, grado histológico, implicación ganglionar y comprobación de metástasis (Romairone y Cartagena, 2014). El grado histológico es un factor pronóstico importante. Estudios recientes, indican que el tiempo medio de supervivencia para TM de grado I es de más de 37 meses, de grado II es de 32 meses y de grado III de 18 meses aproximadamente (Peña y col., 2012).

Los tumores benignos se controlan con facilidad mediante escisión quirúrgica y por lo general conllevan un excelente pronóstico. Aquellas neoplasias con presencia de células mioepiteliales (complejas) tienen mejor pronóstico que las simples. Para animales con tumores malignos la sobrevida total es de 4 a 17 meses. Estos suelen causar metástasis durante los 2 años posterior a la cirugía (más comúnmente 1 a 9 meses). Además, las perras que desarrollaron tanto tumores benignos como malignos están en mayor riesgo de desarrollar tumores malignos en un futuro cercano; por lo tanto debe realizarse un seguimiento periódico en todos los casos (con una frecuencia de 3 a 6 meses para tumores benignos o malignos respectivamente), (Herms y col., 2005).

## 2. ANTECEDENTES

Hasta hace poco tiempo, la clasificación más empleada en el diagnóstico de las NM era la aceptada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), que fue creada por Misdorp y sus colaboradores en 1999 (Misdorp y Organización Mundial de la Salud (Washington), “*Collaborating Center for Comparative Oncology*”, 1999).

En 1950, Bloom propuso un método para evaluar NGM en mujeres, éste evaluaba diversos parámetros como: la formación de túbulos, la regularidad en forma, tamaño, tinción nuclear, la hipercromasia nuclear y actividad mitótica. Basándose en una evaluación subjetiva de estas características determinó que los tumores podrían ser de bajo, moderado o alto grado de malignidad.

Años más tarde, también para evaluar las NGM en mujeres, Bloom y Richardson (1957) decidieron reevaluar el método, para facilitar e intentar unificar los criterios, instaurando un método de puntuaciones.

En 1974, Hampe y Misdorp (OMS) utilizaron una clasificación para los TMC, en esta se utilizan tres métodos principales para clasificar los TM: 1) histogenético, 2) descriptivo histológico y 3) pronóstico. Esta clasificación se empleó en varios estudios clínicos (pronóstico) e investigativos en Europa y Estados Unidos.

En 1990, Moulton utilizó una clasificación para displasias, tumores benignos y malignos de la glándula mamaria del perro y el gato, elaborada para estas especies ya que los TM en estos animales domésticos son más frecuentes. La clasificación se basa principalmente en la morfología descriptiva.

Tras varios años con otras propuestas de gradación tumoral, Elston y Ellis decidieron modificar el método de Bloom y Richardson (Elston y Ellis, 1991) utilizado actualmente en NM en mujeres, conocido como sistema Nottingham, este método introduce un cambio significativo en lo relativo a la evaluación de la hiper cromasia nuclear y actividad mitótica. Pero por la dificultad de reconocer la verdadera hiper cromasia y distinguirla de los núcleos picnóticos, decidió eliminarlo de la evaluación, y redefinió el método para contar figuras mitóticas.

Las NGM se caracterizan por su heterogeneidad histológica, por lo cual las clasificaciones utilizadas sufren constantes revisiones. La OMS ha venido proponiendo revisiones sucesivas, como las de los años 1974 y 1999, y debido a la falta de acuerdo en el diagnóstico de las neoplasias mamarias caninas, se ha publicado recientemente otra clasificación propuesta por el "*American College of Veterinary Pathologist's Oncology Committee*" avalada por la "*World Small Animal Veterinary Association*", tras el consenso de reconocidos patólogos veterinarios fue elaborada en 2011 por Goldschmidt, Peña, Rasotto y Zappulli (Cuadro 1), esta nueva clasificación incorpora nuevos subtipos histológicos de NM caninas que no se describen en la clasificación previa (Misdorp y col., 1999). Esta es la clasificación vigente, contiene seis nuevos subtipos morfológicos de carcinomas mamarios caninos en comparación con la clasificación de la OMS de 1999: el carcinoma micropapilar invasor, comedocarcinoma, carcinoma ductal, carcinoma papilar intraductal, carcinoma y mioepitelioma malignos (Rosciari y col., 2015). La mayoría de los TM son de origen epitelial. Algunos tumores están formados tanto de tejido epitelial, como mioepitelial, con zonas de cartílago y hueso y algunos pocos tumores tienen un origen mesenquimatoso (Raskin, 2010).

**Cuadro 1. Clasificación de las neoplasias mamarias según el tipo histológico.**

**1: Neoplasias epiteliales malignas**

Carcinoma–*in situ*

Carcinoma–simple

- a. Tubular
- b. Túbulo-papilar
- c. Quístico-papilar
- d. Cribriforme

Carcinoma–micropapilar invasivo

Carcinoma–sólido

Comedocarcinoma

Carcinoma–anaplásico

Carcinoma rodeando un adenoma complejo (tumor mixto)

Carcinoma–complejo

Carcinoma y mioepitelioma maligno

Carcinoma–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: Neoplasias Malignas Epiteliales y Mesenquimales**

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 (Enfermedad de “Paget-like”)

#### **8: Hiperplasia/Displasia del pezón**

Melanosis de la piel del pezón

Propuesta de Clasificación Histológica (Goldschmidt y col., 2011).

Para la clasificación de las NM se han utilizado parámetros clínicos como velocidad de crecimiento, tamaño, recurrencia posquirúrgica y los parámetros histológicos que incluyen; tejido de origen, morfología celular, morfología nuclear, forma de crecimiento, figuras mitóticas por campo, invasión de vasos sanguíneos,

invasión de ganglios linfáticos regionales y metástasis a distancia, los cuales se consideran generales para muchas otras neoplasias. Pero los más aceptados son: la clasificación histológica y la clasificación clínica de los TM (Torres y Eslava, 2007).

Una vez establecida la neoplasia mamaria como maligna y con la finalidad de establecer un pronóstico, se puede hacer uso de un método reciente de gradación histológica de carcinomas mamarios caninos adaptado por Peña (Peña y col., 2012). Este sistema considera la heterogeneidad de los TM caninos, la forma de evaluar tumores complejos y mixtos y se adapta para evaluar la gran variabilidad de núcleos y nucléolos (Cuadro 2). El grado tumoral junto con el subtipo histológico es predictivo del comportamiento biológico de los carcinomas mamarios.

**Cuadro 2. Grados histológicos de los tumores mamarios caninos**

A. Formación de túbulos <sup>a</sup>	Puntos 1 2 3	Abundantes túbulos (< de 75%) Moderada formación de túbulos 10-75% Mínima o ausencia de formación (<10%)
B. Pleomorfismo nuclear <sup>b</sup>	1 2 3	Núcleo pequeño uniforme o regular e ocasional nucléolo. Grado moderado de variación nuclear en tamaño y forma, núcleo hipercromático y presencia de nucléolo. Marcada variación en los tamaños de los núcleos, son hipercromáticos con 1 o más prominentes nucléolos.
C. Mitosis en 10 campos/HPF <sup>c</sup>	1 2 3	0-9 mitosis 10/HPF 10-19 mitosis 10/HPF ≥ 20 mitosis 10/HPF
Grado Histológico de Malignidad	Puntos 3-5 6-7 8-9	Grado de Malignidad I (Bajo, Bien diferenciado) II (Intermedio, Moderadamente diferenciado) III (Alto, Pobremente 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 (Peña y col., 2012).

\*HPF: high-power field (campo de alta potencia).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El creciente interés de la sociedad por el bienestar animal ha causado una mayor demanda y preocupación por parte de los dueños de mascotas en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades que afectan a sus animales; además, el avance científico de la Medicina Veterinaria ha permitido mejorar las técnicas de diagnóstico de laboratorio y la creación de laboratorios especializados de diagnóstico (Chau, 2013).

Las clasificaciones actuales requieren de datos morfo citológicos, histológicos y clínicos para establecer el tipo de neoplasia, y el pronóstico de los animales, en ambos casos se requiere una gran experiencia profesional para establecer adecuadamente los parámetros. La medicina basada en evidencias (MBE) emplea evidencias previamente publicadas y datos científicos para establecer el diagnóstico clínico, de laboratorio y final; por ello, la experiencia del profesional será mínima, lo que requiere es manejar todo este cúmulo de información publicada en las revistas científicas, por lo que los sistemas que manejan una gran cantidad de datos, basados en la informática, pueden ser de gran valor para apoyar la toma de decisiones de diagnóstico histopatológico en una forma rápida. Además con el uso de estos sistemas y la telepatología (apoyo de expertos patólogos a distancia para la interpretación), se aumenta la capacidad de trabajo de los laboratorios de diagnóstico.

La finalidad del presente estudio, es aportar un sistema digital (SD), útil y práctico, el cual podrá brindar a los Médicos Veterinarios Zootecnistas un diagnóstico oportuno de las NGM, basado en la MBE, que disminuya los tiempos de interpretación, que no requiera una gran experiencia en los diagnósticos de las neoplasias y permita la asesoría en la clínica a los médicos veterinarios mediante el uso de la telepatología.

## **4. HIPÓTESIS**

Es posible modificar el diagnóstico de neoplasias de glándula mamaria que se realiza actualmente en el laboratorio, el cual es cualitativo y basado en la experiencia profesional, por un diagnóstico cuantitativo, que sea basado en estadística y la medicina basada en evidencias.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo general**

Desarrollar un sistema digital que sea práctico para el diagnóstico citopatológico e histopatológico de las neoplasias de glándula mamaria en caninos.

### **5.2. Objetivos específicos**

1. Integrar y analizar las clasificaciones actuales de las neoplasias de glándula mamaria en caninos mediante una investigación documental.
2. Desarrollar un SD de identificación y clasificación citopatológico e histopatológico para neoplasias de glándula mamaria en caninos, fundamentado en los análisis morfo histológicos.
3. Clasificar las neoplasias mamarias caninas de la base de datos del laboratorio, del periodo de febrero a junio de 2018 empleando el sistema desarrollado.
4. Determinar la frecuencia de los tipos de neoplasias de glándula mamaria previamente reportados en el laboratorio del periodo de febrero a junio de 2018.
5. Comparar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo y factores de error entre el diagnóstico emitido por el sistema desarrollado y el diagnóstico previamente emitido en el laboratorio.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1. Ubicación**

El presente trabajo se realizó en la empresa de Especialidades en Diagnóstico S.A de C.V, laboratorio Divet®, ubicado en Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

### **6.2. Equipo y Material Utilizados**

- a. Laminillas de cortes histológicos pertenecientes a glándula mamaria de caninas, teñidas con Hematoxilina-Eosina (H-E), realizadas en el periodo de febrero a junio de 2018.
- b. Laminillas con muestras citológicas teñidas con Papanicolaou y Diff-Quik, realizadas en el periodo de febrero a junio de 2018.
- c. Microscopio óptico (Carl Zeiss Standard 25).
- d. Programa de cómputo Open Office Excel.

### **6.3. Tipo de investigación**

El estudio corresponde con una investigación científica documental retrospectiva, una investigación de desarrollo tecnológico (sistema digital) y una investigación científica observacional (evaluación de neoplasias).

### **6.4. Investigación científica documental retrospectiva**

El estudio se basó en una investigación documental retrospectiva, esta se llevó a cabo en la biblioteca de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4, donde se hizo la revisión en libros y revistas, de igual manera se buscaron libros, artículos y revistas científicas de la base de datos de la biblioteca digital UNAM.

La estrategia a seguir fue recopilar la información, esta se hizo revisando y analizando cada una de las clasificaciones documentales de las NM en caninos. De las clasificaciones obtenidas se seleccionaron 3; la primer propuesta de Hampe y Misdorp (1974); (Figura 1), la segunda de Moulton (1990); (Figura 2), al final se empleó una bibliografía donde se menciona la clasificación vigente; la cual fue elaborada en 2011 por Goldschmidt y col. (Figura 3), se tomó en cuenta esta bibliografía ya que es la clasificación más actual e íntegra.

**Figura 1. Clasificación de neoplasias mamarias propuesta por Hampe y Misdorp.**

MISDORP 1974							
	BENIGNAS	BENIGNAS	BENIGNAS	BENIGNAS	BENIGNAS	MALIGNAS	
	Adenoma	Papiloma	Papilomatosis duc	Fibroadenoma	Tumor mixto ben	Carcinoma	Adenocarcinoma
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							

**Citoplasma:**  
 Células cuboidales o cúbicas  
 Células columnares  
 Células poligonales  
 Células redondas  
 Células pequeñas

Clasificación propuesta en 1974.

**Figura 2. Clasificación de neoplasias mamarias propuesta por Moulton.**

MOULTON 1990						
	BENIGNAS	BENIGNAS	BENIGNAS	MALIGNAS	MALIGNAS	
	Adenoma, lobular y papiloma	Tumor mixto benigno	Carcinoma (infiltrante y no infiltrante)	Carcinoma (infiltrante y no infiltrante)	Carcinoma (infiltrante y no infiltrante)	Carcinoma (infiltrante)
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						

Carcinoma lobular  
 Carcinoma papilar, incluye tipo quístico papilar  
 Carcinoma de células escamosas  
 Carcinoma escirótico (fibroepitelioma)

Clasificación propuesta en 1990.

**Figura 3. Clasificación de neoplasias mamarias propuesta por Goldschmidt y col.**

	AH	AI	AJ	AK	AL	AM	AN
1	GOLDSCHMIDT 2011						
2	BENIGNAS	BENIGNAS	BENIGNAS	BENIGNAS	BENIGNAS	BENIGNAS	BENIGNAS
3	Adenoma simple	Adenoma papilar intraductal (Papiloma ductal)	Adenoma ductal (adenoma basalóide)	Fibroadenoma	Mioepitelioma	Adenoma Complejo (Adenomioepitelioma)	Tumor mixto
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							

Clasificación propuesta en 2011.

Una vez que la información obtenida fue revisada y analizada, se procedió a la organización y clasificación de las NM con base a los criterios establecidos, para complementar las características se fueron agregando más criterios histológicos de las otras dos clasificaciones. De esta manera se pudo dar un orden a la clasificación de NM y así se generó una propuesta de clasificación en formato electrónico de dichas neoplasias. Primero se desarrolló la propuesta en un libro de Excel donde se agregaron los criterios morfo citológicos e histopatológicos que mencionan los autores en sus clasificaciones y después se introdujeron los algoritmos adecuados.

#### **6.5. Obtención y revisión de los registros con diagnóstico de neoplasias mamarias de las muestras del laboratorio**

Se hizo la recolección en el periodo de febrero de 2018 a junio de 2018 y se trabajó con 120 laminillas de cortes histológicos de glándula mamaria y con 15 laminillas con muestras citológicas de caninos que fueron previamente diagnosticadas como NM en el laboratorio. La información clínica de los casos de las laminillas se obtuvo de la bitácora de registro y posteriormente los datos fueron capturados mediante el uso del programa de cómputo Excel. De cada estudio, se obtuvo la información básica de los pacientes como; raza, edad, región afectada y tamaño de la neoplasia.

De forma previa, los cortes histológicos y los diagnósticos fueron elaborados y evaluados por los patólogos del laboratorio. Brevemente, el proceso consistió en que los tejidos fueron fijados en formol buferado al 10% durante 24 horas, se procesaron por el método convencional de inclusión en parafina, fueron cortados a 5 micras de espesor mediante el uso de microtomo, y posteriormente fueron teñidos mediante Hematoxilina y Eosina (H-E). Las laminillas de muestras citológicas fueron obtenidas mediante la técnica de Aspiración con Aguja Fina (AAF) y teñidas con Papanicolaou y/o Diff-Quik.

## 6.6. Investigación y desarrollo tecnológico (sistema digital)

El primer paso fue trabajar en un libro de Excel, se agregó una fila y en esta se colocó la clasificación de Goldschmidt y col. (2011) y en una columna se acomodaron las características histológicas y citológicas a evaluar.

En las filas se encuentra la clasificación de NM, esta se encuentra dividida en dos grupos; en el primer grupo se ubican las neoplasias mamarias benignas (Figura 4) y en el segundo grupo las neoplasias mamarias malignas (Figura 5). Las neoplasias benignas consideradas fueron: adenoma simple, adenoma papilar intraductal (papiloma ductal), adenoma ductal (adenoma basaloide), fibroadenoma, mioepitelioma, adenoma complejo (adenomioepitelioma) y el tumor mixto benigno. Las neoplasias malignas están subdivididas en cuatro grupos: 1) neoplasias epiteliales malignas tipos simples de carcinoma, 2) neoplasias epiteliales malignas: tipos especiales, 3) neoplasias epiteliales malignas: sarcomas y 4) carcinosarcoma: tumor mamario mixto maligno.

**Figura 4. Neoplasias mamarias benignas.**

BENIGNAS										
CARACTERÍSTICA CITOPATOLÓGICA E HISTOLÓGICA										
Adenoma simple	Adenoma papilar intraductal (Papiloma ductal)	Adenoma ductal (adenoma basaloide)	Fibroadenoma	Mioepitelioma	Adenoma Complejo (Adenomioepitelioma)	Tumor mixto benigno	Carcinoma-In Situ	Carcinoma tubular		

Clasificación de Goldschmidt y col., 2011.

**Figura 5. Neoplasias mamarias malignas.**

MALIGNAS												
2	2. Neoplasias Epiteliales Malignas: Tipos Especiales					Neoplasias de células fusiformes		3. Neoplasias Epiteliales Malignas—Sarcomas				
3	Carcinoma papilar intraductal	Carcinoma de células escamosas	Carcinoma adenoescamoso	Carcinoma mucinoso	Carcinoma rico en lípidos	Mioepitelioma maligno	Carcinoma inflamatorio	Osteosarcoma	Condrosarcoma	Fibrosarcoma	Hemangiosarcoma	

Clasificación de Goldschmidt y col., 2011.

En las columnas se colocaron las características histopatológicas y citológicas, también divididas en diversos grupos, esta división se hizo en un orden lógico para observar cada laminilla utilizando la MBE.

En el primer grupo se encuentra el tejido que corresponde al parénquima, dividido a su vez en tres subgrupos; el primero corresponde a la disposición de tejido en donde se encuentra diversos criterios como: si tiene apariencia a una criba, si tiene forma papilar sésil o pediculada, si está revestido de 1 a 3 células de espesor, revestido por solo 1 capa de células, túbulos irregulares, sin formación tubular, células que forman grupos compactos, formación de nódulos, papilas se extienden a la luz, si tienen cavitaciones quísticas y si hay necrosis (focal, zonal). En el segundo subgrupo se colocaron los acinos (alvéolos), dividido a su vez en; citoplasma, núcleo, relación núcleo/citoplasma aumentado o disminuido y nucléolo, cada uno con criterios para evaluar. El tercer subgrupo corresponde a los conductos, divididos en; citoplasma, núcleo, relación núcleo/citoplasma aumentado o disminuido y nucléolo, también cada uno con criterios para evaluar.

El segundo grupo corresponde al estroma tanto interlobulillar como intralobulillar, dividido en cinco subgrupos; en el primer subgrupo se encuentra cartílago y/o hueso, osteoblastos, matriz extracelular eosinofílica densa (osteoide), colágeno, tejido adiposo, calcio, tejido conectivo fibroso, matriz condroide, matriz fibrófila basófila (mixoide). En el segundo subgrupo se encuentran las células mioepiteliales contráctiles; las cuales se dividen en: citoplasma, núcleo y nucléolo, cada uno con diversos criterios histológicos. El tercer subgrupo pertenece a los fibrocitos, fibroblastos, y miofibroblastos. El cuarto subgrupo concierne a los vasos sanguíneos, aquí se divide en: congestión, hemorragia, o infiltración de células neoplásicas. Por último, el quinto subgrupo compete a los glóbulos blancos los cuales se dividen en: linfocitos, monocitos (macrófagos), neutrófilos, eosinófilos, basófilos / mastocitos y células plasmáticas.

A cada grupo se le asignaron posibles valores (1, 2, 3) obtenidos del análisis de la bibliografía consultada, a cada subgrupo se insertó la función de sumatoria para observar las puntuaciones de cada neoplasia de glándula mamaria y así poder darle un valor a dicha neoplasia.

En cada subgrupo se agregaron diversos criterios, los de importancia en la interpretación son los nucleares y los nucleolares (Núñez, 2007), aunque en orden los primeros que se observan son los criterios celulares, los que se tomaron en cuenta son:

- Anisocitosis: presencia de células de diferente tamaño.
- Pleomorfismo celular: células de diferente forma.

De los criterios nucleares los más frecuentes de evaluar son:

- Anisocariosis o diferencia en el tamaño de los núcleos.
- Núcleos de forma irregular.
- Incremento del tamaño nuclear, lo que conduce a un aumento de la relación núcleo:citoplasma.
- Incremento del contenido en cromatina y distribución irregular de la misma (cromatina condensada o heterogénea).
- Un índice mitótico elevado indica malignidad. Mucho más definitivo que el incremento del índice mitótico es la presencia de mitosis atípicas que siempre es indicativa de malignidad.
- Los nucléolos de las células normales deben ser únicos, redondos y de pequeño tamaño (1-2 $\mu$ m). La presencia de nucléolos múltiples, de formas anormales y/o de gran tamaño (>5 $\mu$ m) es signo de malignidad (Martínez, 2008).

## 6.7. Investigación científica observacional

Cuando se tuvo en orden la clasificación en el SD desarrollado se procedió a la lectura de las laminillas recolectadas implementando dicho sistema, los cortes histológicos y laminillas de citopatología fueron revisadas sin tomar en cuenta el diagnóstico emitido previamente. Se hizo la revisión de los 120 cortes histológicos de glándula mamaria. Cada corte histológico se observó en el microscopio óptico.

En la revisión de cortes histológicos, se hizo la clasificación según su aspecto histológico, examinado en primer lugar sí el tejido tenía transformación o no, para este trabajo todos los tejidos tenían transformación, en segundo lugar se observó si la transformación era benigna o maligna, y en tercer lugar se examinó dónde estaba dicha transformación, si era perteneciente del parénquima, del estroma, o de ambas, con la finalidad de poder definir su histogénesis (epitelial, mesenquimal y/o tipo mixto), para después determinar su grado de diferenciación y evidencia de invasión (estromal y vascular), y su clasificación morfológica.

En cada grupo, el cual se empezó por el parénquima y después por el estroma, se le fue asignando un valor de 0 a 1, donde el 0 corresponde a que no presentaba el criterio descrito, y el 1 a que sí lo presentaba. Se evaluaron los criterios del citoplasma, del núcleo si este presentaba mitosis atípica o mitosis típica, la mitosis típica se evaluó con una puntuación del 1 al 3, donde 1 representa de 1 a 9 mitosis por 10 campos de 40 X, 2 representa de 10 a 19 mitosis por 10 campos de 40 X y el 3 representa de 20 a más mitosis por 10 campos de 40 X, se evaluó la relación núcleo/citoplasma: aumentado o disminuido, y los criterios del nucléolo. En la sección del estroma se hizo la evaluación con una puntuación del 1 al 3, donde 1) es escaso, 2) moderado y el 3) abundante, esto se realizó en los subgrupos que pertenecen a los fibrocitos, fibroblastos y miofibroblastos, así como en los vasos sanguíneos y los glóbulos blancos.

## **6.8. Análisis entre la evaluación histológica emitida en el laboratorio y la evaluación histológica emitida con el SD**

Con los resultados obtenidos, se realizó una valoración de prueba diagnóstica para determinar la sensibilidad, especificidad y la correlación entre el diagnóstico emitido por el laboratorio y el emitido por el SD desarrollado. Esta valoración se clasificó de acuerdo a lo establecido por Landis y Koch (1977), en la cual mencionan que existen varios índices de concordancia propuestos, el más preciso es la proporción de acuerdos observados, es decir  $(a + d)/N$ . Este índice es muy intuitivo y fácilmente interpretable: tomará valores entre (0) total desacuerdo y (1) máximo acuerdo. Sin embargo como indicador de reproducibilidad tiene el inconveniente de que aun en el caso de que los dos observadores clasifiquen con criterios independientes se produciría un cierto grado de acuerdo por azar. Es deseable que un índice de concordancia indique el grado de acuerdo que existe por encima del esperado por azar. En este sentido, el índice más usado es el propuesto por Cohen (1960) denominado *índice kappa* ( $k$ ).

Finalmente, se sometieron a estudio de frecuencia la edad, raza, comportamiento biológico, después esta información se presentó en tablas y gráficas.

## 7. RESULTADOS

En los cuadros (3, 4) se muestran algunos criterios histológicos y citológicos que se encuentran en la base de datos desarrollado en Excel, se mencionan algunos criterios que tuvieron mayor relevancia para obtener un diagnóstico.

**Cuadro 3. Criterios morfo histológicos y citológicos del parénquima y estroma de la GM.**

<b>Parénquima</b> <i>///</i> <b>Estroma</b>	<b>Acines</b> <b>(alvéolos),</b> <b>conductos</b> <i>///</i> <b>y células</b> <b>mioepiteliales</b>	Citoplasma	Anisocitosis
			Pleomorfismo
		Núcleo:	Anisocariosis
			Pleomorfismo
			Multinucleación
			<b>Mitosis Atípica</b>
			Mitosis Típica
		Relación N/C	Aumentada/disminuida
		Nucléolo	Macronucleolo

**Cuadro 4. Criterios morfo citológicos en acines, células ductales y células mioepiteliales.**

<b>Acines / Células ductales y Células mioepiteliales</b>	Citoplasma	Anisocitosis
		Pleomorfismo
	Núcleo:	Anisocariosis
		Pleomorfismo
		Multinucleación
		<b>Mitosis Atípica</b>
		Mitosis Típica
	Relación N/C	Aumentada / disminuida
Nucléolo	Macronucleolo	

El sistema digital desarrollado fue accesible y práctico de utilizar, a continuación se explica la manera de utilizarlo.

Paso 1. Se abre el programa Open Office Excel en el cual aparecen 4 hojas (Figura 6), nombradas como: hoja 1) clasificación de las neoplasias benignas y malignas, hoja 2) laminillas de los casos observados, hoja 3) evaluación de las laminillas, y hoja 4) sumatorias para el diagnóstico.

**Figura 6. Hojas utilizadas en el programa Excel.**



En la primera hoja se encuentra la clasificación de las neoplasias benignas y malignas con las puntuaciones en los criterios citológicos e histopatológicos.

Paso 2. En la segunda hoja se ubican los criterios para la revisión de las laminillas, en esta hoja se anexa una puntuación conforme se va observando cada laminilla, se inserta una puntuación de 1 a 3 en los criterios como: anisocitosis, pleomorfismo celular y nuclear, anisocariosis, mitosis típicas, (donde 1 significa escaso, 2 moderado, y 3 abundante); (Figura 7).

Figura 7. Lectura de laminillas.

	A	B	C	D	E	F	G
4				Casos	20800-Q	21037-Q	20560-Q
5							
6	Parenquima		DISPOSICIÓN	Parecida a una criba			
7				Sin formación tubular			
8				Revestidos de 1 a 3			
9				Revestidos por 1 capa de	1		
10				Túbulos irregulares			
11				Formación de nódulos			
12				Células neoplásicas hacia			
13				Cavitaciones Quísticas			
14				Cuboidales o cúbicas	1	1	1
15				Células columnares			
16				Células poligonales			
17				Células redondas			
18				Parenquima	Acinos (alvéolos)	Citoplasma:	Células fusiformes -
19	Basofilo (1, 2, 3)						
20	Eosinofilo (1, 2, 3)	1	1				1
21	Anisocitosis (1, 2, 3)		1				1
22	Pleomorfismo (1, 2, 3)						
23	Vacuolas						
24	Redondo						
25	Ovalado - Fusiforme	1	1				1
26	Alargados ("forma de						
27	Pleomorfo (1, 2, 3)						
28	Basal						
29	Parenquima	Acinos (alvéolos)	RELACIÓN N/C	Anisocariosis (1, 2, 3)	1	1	1
30				Binucleado			
31				Multinucleación			
32				Cromatina finamente	1	1	1
33				Cromatina agrupada			
34				Mitosis Atípica			
35				Mitosis Típica (1, 2, 3)		1	
36				AUMENTADA			
37				DISMINUIDA			
38							Basofilo/prominente (apare

Paso 3. Una vez que se termina de leer la laminilla, se copia la columna de la laminilla observada, y se procede a pasar a la hoja 3) evaluación.

Paso 4. En la hoja #3 se pega la columna seleccionada en el primer recuadro debajo del número de caso (Figura 8).

Figura 8. Hoja de evaluación de laminillas.

	A	B	C	D	E	F	G
1				CASO #	1	18	30
2					20800-Q	21037-Q	20560-Q
3	Parenquima		DISPOSICIÓN	Parecida a una criba			
4				Sin formación tubular			
5				Revestidos de 1 a 3 células de			
6				Revestidos por 1 capa de células	1		
7				Túbulos irregulares			
8	Parenquima		Citoplasma:	Fomacion de nódulos			
9				Células neoplásicas hacia la luz			
10				Cavitaciones Quísticas			
11				Células cuboidales o cúbicas	1	1	1
12				Células columnares			
13				Células poligonales			
14				Células redondas			
15				Células fusiformes - ovaladas			
16				Basofilo (1,2,3)			
17				Eosinofilo (1,2,3)	1	1	1
18	Anisocitosis (1,2,3)		1	1			
19	Pleomorfismo (1,2,3)						
20	Parenquima	Acines (alveolos)	RELACIÓN N/C	Vacuolas			
21				Redondo			
22				Ovalado - Fusiforme	1	1	1
23				Alargados ("forma de cigarro")			
24				Pleomorfico (1,2,3)			
25				Basal			
26				Anisocariosis (1,2,3)	1	1	1
27				Binucleado			
28				Multinucleación			
29				Cromatina finamente punteada	1	1	1
30	Cromatina agrupada						
31	Mitosis Atípica						
32	Mitosis Típica (1, 2, 3)		1				
33	Parenquima	Acines (alveolos)	RELACIÓN N/C	AUMENTADA			
34				DISMINUIDA			
35				Basofilo / Prominente	1	1	
36				Unico	1		1
37				Múltiples			

Paso 5. Posteriormente pasar a la hoja de sumatorias (Figuras 9 y 10), en esta hoja se observará que puntuación se obtiene, la cual se marcan con color verde las neoplasias con más coincidencias, de un color verde más marcado se indica la neoplasia que tiene mayor puntuación.

Figura 9. Hoja de sumatorias con los diagnósticos de GM.

A	B	C	D	E	F	G	H
			Caso 1 "20800	Adenoma simple	Adenoma papilar intraductal (Papiloma ductal)	Adenoma ductal (adenoma basaloide)	Fibroadenoma
1			Parecida a una criba	0	0	0	0
Parenquima		DISPOSICIÓN	Sin formación tubular	0	0	0	0
			Revestidos de 1 a 3	0	0	0	0
			Revestidos por 1 capa	1	0	0	0
			Túbulos irregulares	0	0	0	0
			Formacion de nódulos	0	0	0	0
			Células neoplásicas	0	0	0	0
			Cavitaciones Quísticas	0	0	0	0
Parenquima	Acines (alveolos)	Citoplasma:	Células cuboidales o	1	1	1	1
			Células columnares	0	0	0	0
			Células poligonales	0	0	0	0
			Células redondas	0	0	0	0
			Células fusiformes -	0	0	0	0
			Basofilo (1,2,3)	0	0	0	0
			Eosinofilo (1,2,3)	1	0	1	1
			Anisocitosis (1,2,3)	0	0	0	0
			Pleomorfismo (1,2,3)	0	0	0	0
			Vacuolas	0	0	0	0
			Redondo	0	0	0	0
			Ovalado - Fusiforme	1	0	1	1
			Alargados ("forma de	0	0	0	0
			Pleomorfico (1,2,3)	0	0	0	0
Basal	0	0	0	0			
Anisocariosis (1,2,3)	1	0	1	1			
Binucleado	0	0	0	0			

Figura 10. Diagnóstico de laminillas.

99	Estroma	Fibrocitos	macronucleo	0	0	0	0	0
00			Fibroblastos	0	0	0	0	0
01			Miofibroblastos	0	0	0	0	0
02			Mitosis típica	0	0	0	0	0
03	Estroma	Vasos sanguíneos	Congestión	0	0	0	0	0
04			Hiperemia	0	0	0	0	0
05			Hemorragia	0	0	0	0	0
06			Infiltrado de células neoplásicas	0	0	0	0	0
07	Estroma	Glóbulos blancos	Linfocitos	0	0	0	0	0
08			Monocitos (macrófagos)	0	0	0	0	0
09			Neutrófilos	0	0	0	0	0
10			Eosinófilos	0	0	0	0	0
11			Basófilos /mastocitos	0	0	0	0	0
12			Células plasmáticas	0	0	0	0	0
13				9	1	5	7	0

Esto se logra gracias a algoritmos donde se agregaron condicionantes, los cuales indican si la laminilla observada coincide con la puntuación en los criterios citológicos e histopatológicos, también marcará si tiene una puntuación en los criterios donde se hacen valoraciones del 1 a 3, estas coincidencias las toma en cuenta en cada neoplasia de la hoja de clasificación de neoplasias mamarias benignas y malignas ubicada en la hoja #1, posteriormente se hace la comparación y sumatoria en la hoja #4, dando la puntuación final (Figura 11).

Figura 11. Condicionantes de las laminillas.

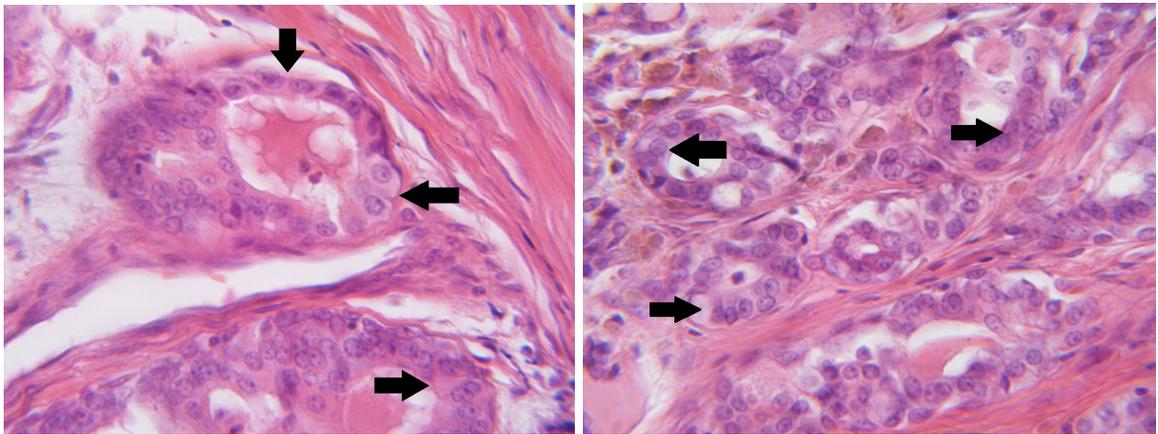
E22		=SI(CLASIFICACIÓN!E24>=1,SI(evaluación!\$E22 = CLASIFICACIÓN!E24,1,0),0)					
A	B	C	D	E	F	G	H
Parenquima	Acines (alveolos)	Cromoplasma:	Basofilo (1,2,3)	0	0	0	0
			Eosinofilo (1,2,3)	1	0	1	1
			Anisocitosis (1,2,3)	0	0	0	0
			Pleomorfismo (1,2,3)	0	0	0	0
			Vacuolas	0	0	0	0
			Redondo	0	0	0	0
			Ovalado - Fusiforme	1	0	1	1
			Alargados ("forma de	0	0	0	0
			Pleomorfico (1,2,3)	0	0	0	0
			Basal	0	0	0	0
			Anisocariosis	1	0	1	1
			Binucleado	0	0	0	0
			Multinucleación	0	0	0	0
			Cromatina finamente	1	0	0	1
		Cromatina agrupada	0	0	0	0	
		Mitosis Atípica	0	0	0	0	
		Mitosis Típica (1, 2,	0	0	0	0	
		RELACIÓN N/C	AUMENTADA	0	0	0	0
			DISMINUÍDA	0	0	0	0
		Nucleólo:	Basofilo / Prominente	1	0	1	1
			Único	1	0	0	1
			Múltiples	0	0	0	0
			Macronucleolo	0	0	0	0
		LUZ	Central	1	0	0	0
			Necrosis focal	0	0	0	0
			Necrosis multifocal	0	0	0	0
			Necrosis zonal	0	0	0	0
		LUZ	Material	0	0	0	0
			Papilas	0	0	0	0
			Granulocitos	0	0	0	0
			Mucina	0	0	0	0
			Cordones y túbulos	0	0	0	0
Restos de queratina	0		0	0	0		
Células cuboidales o	0		0	0	0		
Células redondas	0		0	0	0		
Células fusiformes -	0		0	0	0		
Células columnares	0		0	0	0		

Esta base de datos y las fórmulas empleadas se están desarrollando como programa (Software) para ser patente en otra tesis secuenciada.

Empleando el sistema digital desarrollado se evaluaron las 120 laminillas de cortes histopatológicos y las 15 laminillas de citopatología, cuyo diagnóstico previo fueron neoplasias mamarias.

Las figuras (12 a 23) que a continuación se presentan muestran criterios morfo histológicos y citológicos que son de importancia al momento de revisar las laminillas.

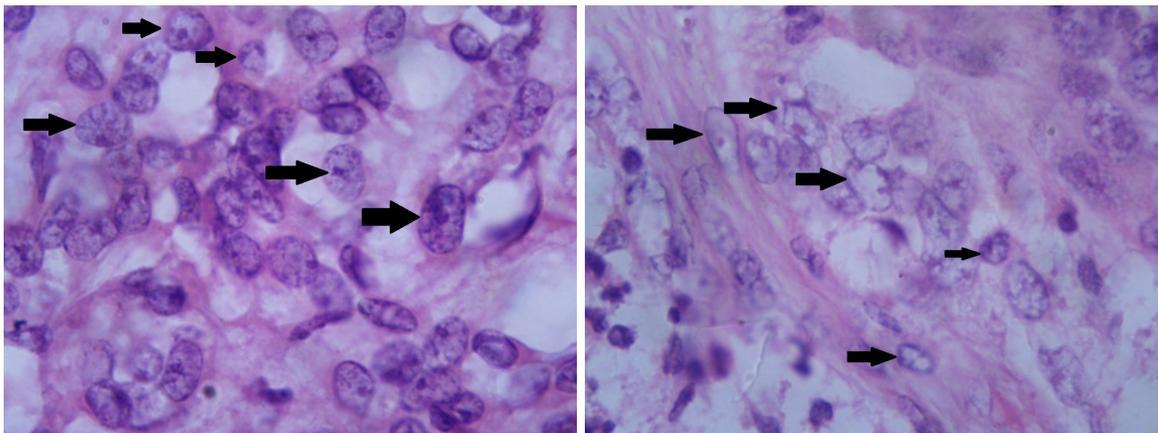
**Figuras 12 y 13. Sección histológica de GM donde se observa anisocitosis en los acines glandulares.**



(Tinción H-E, 40x)

(Tinción H-E, 40x)

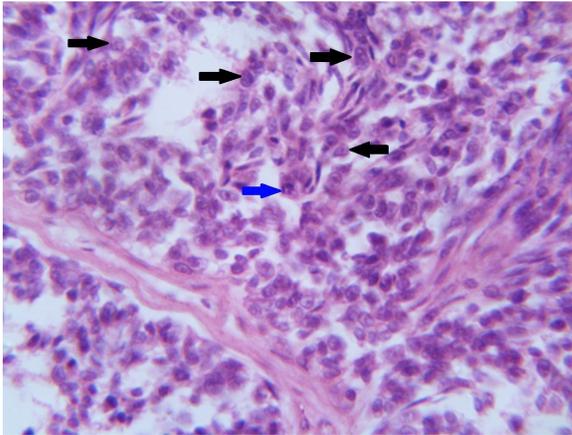
**Figuras 14 y 15. Sección histológica de GM donde se observa anisocariosis en los túbulos.**



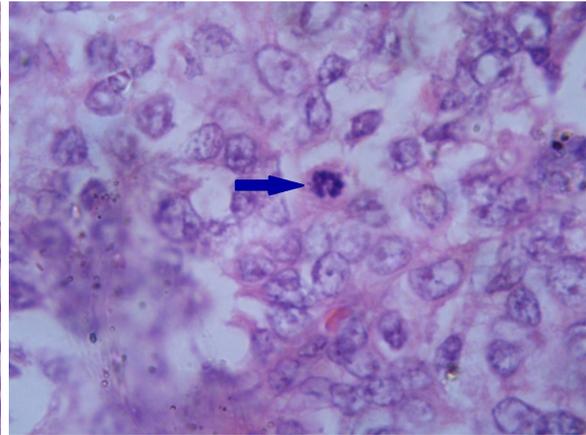
(Tinción H-E, 100x).

(Tinción H-E, 100x).

**Figuras 16 y 17. Sección histológica de GM que muestra núcleos pleomórficos (flechas negras) y mitosis típica (flecha azul) en los túbulos.**

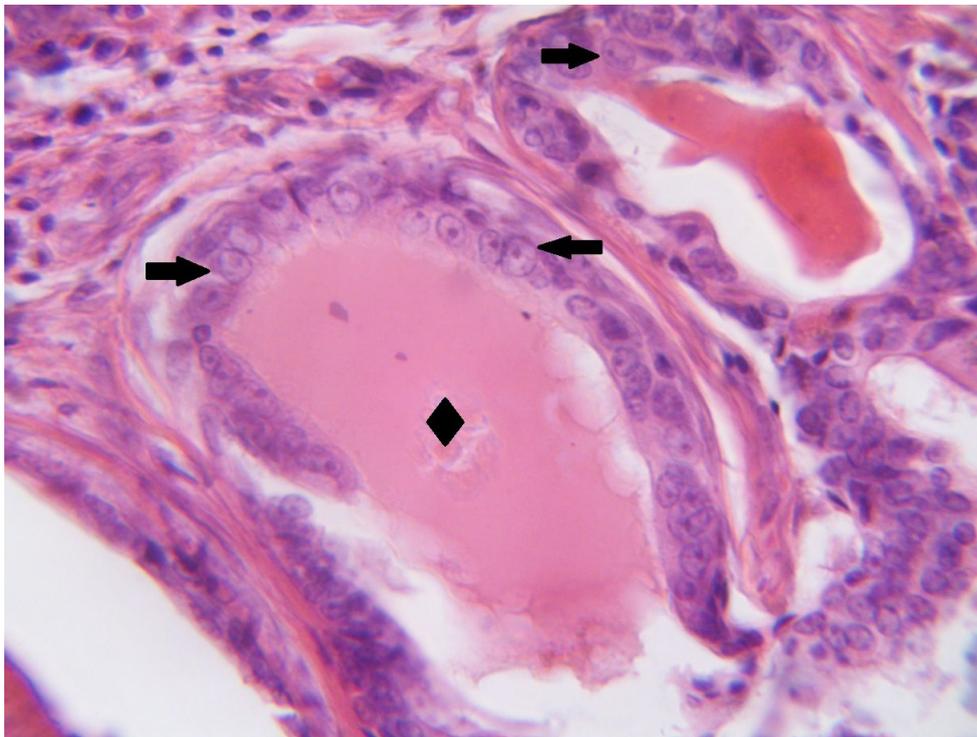


**(Tinción H-E, 40x).**



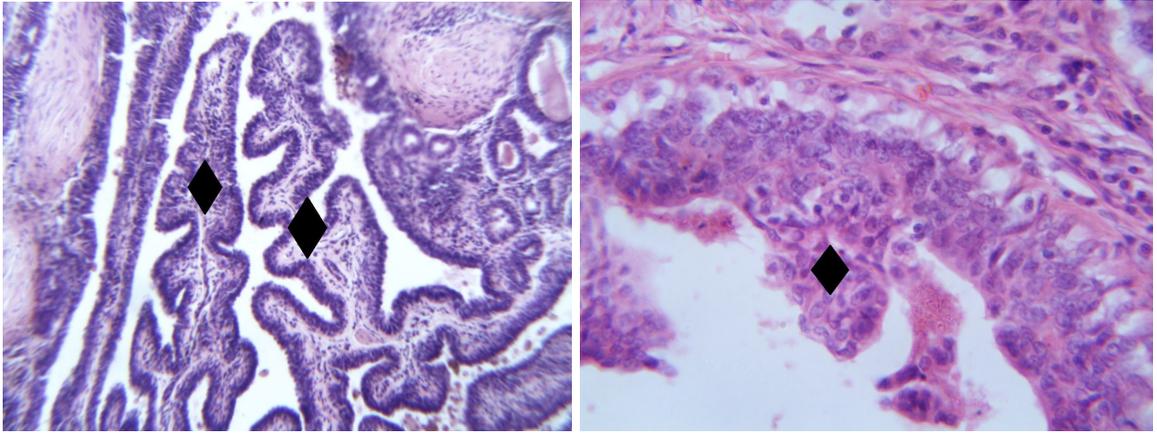
**(Tinción H-E, 100x).**

**Figura 18. Sección histológica de GM donde se observa relación núcleo/citoplasma aumentada (flechas negras), y material proteináceo en la luz de los acines (rombo).**



**(Tinción H-E, 40x)**

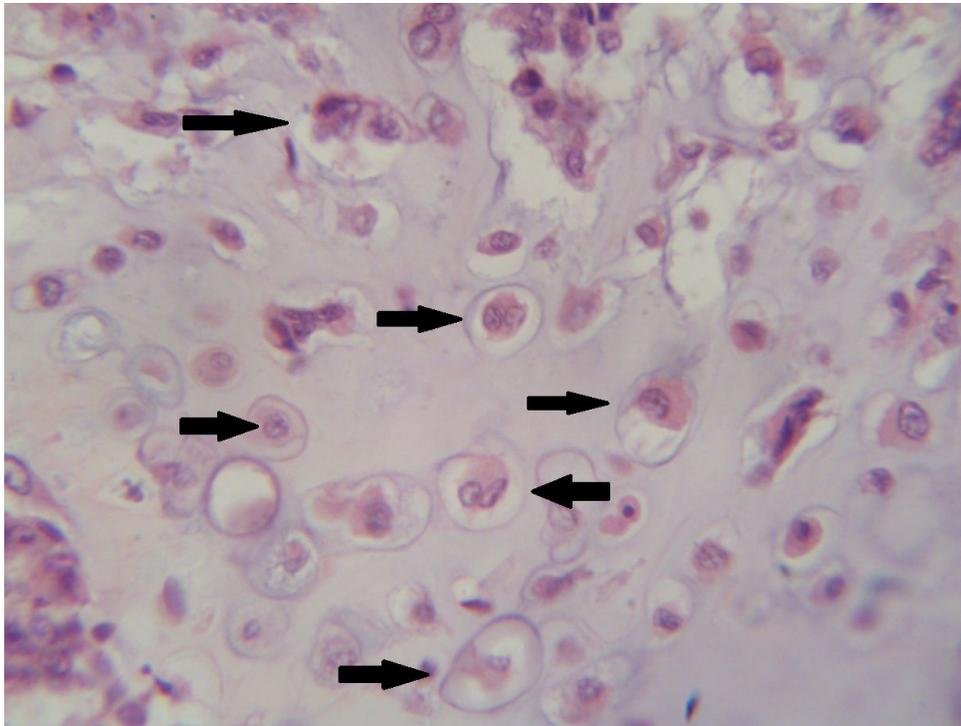
**Figuras 19 y 20. Sección histológica de GM que muestra papilas ductales (rombos).**



**(Tinción H-E, 10x).**

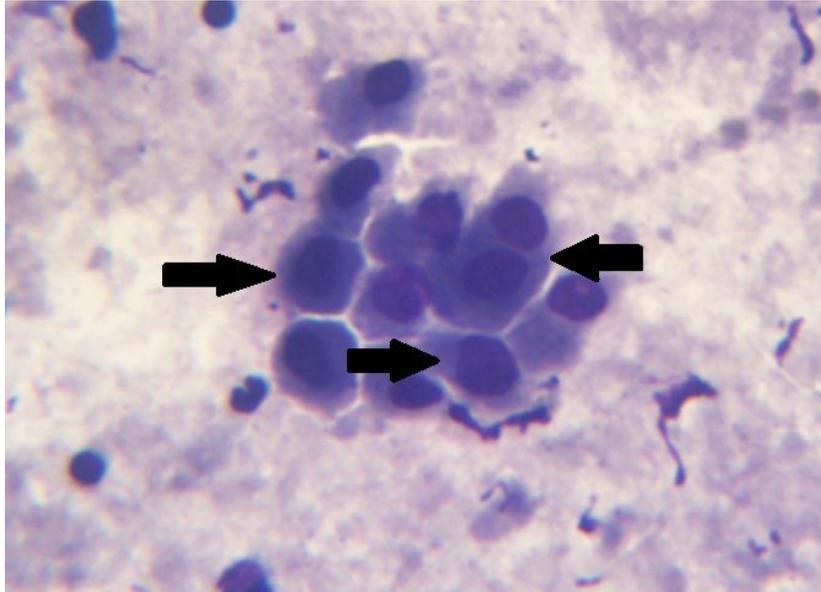
**(Tinción H-E, 40x).**

**Figura 21. Sección histológica de GM que muestra matriz cartilaginosa, donde se observan condrocitos.**



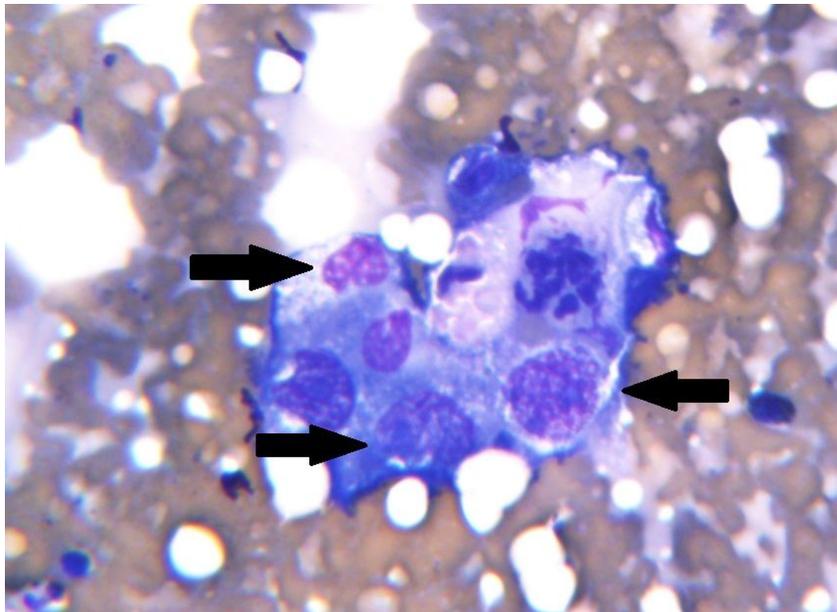
**(Tinción H-E, 100x)**

**Figura 22. Células ductales de GM donde se observa anisocitosis.**



**(Tinción Diff Quik, 40x)**

**Figura 23. Células ductales de GM que muestra anisocariosis y pleomorfismo nuclear.**

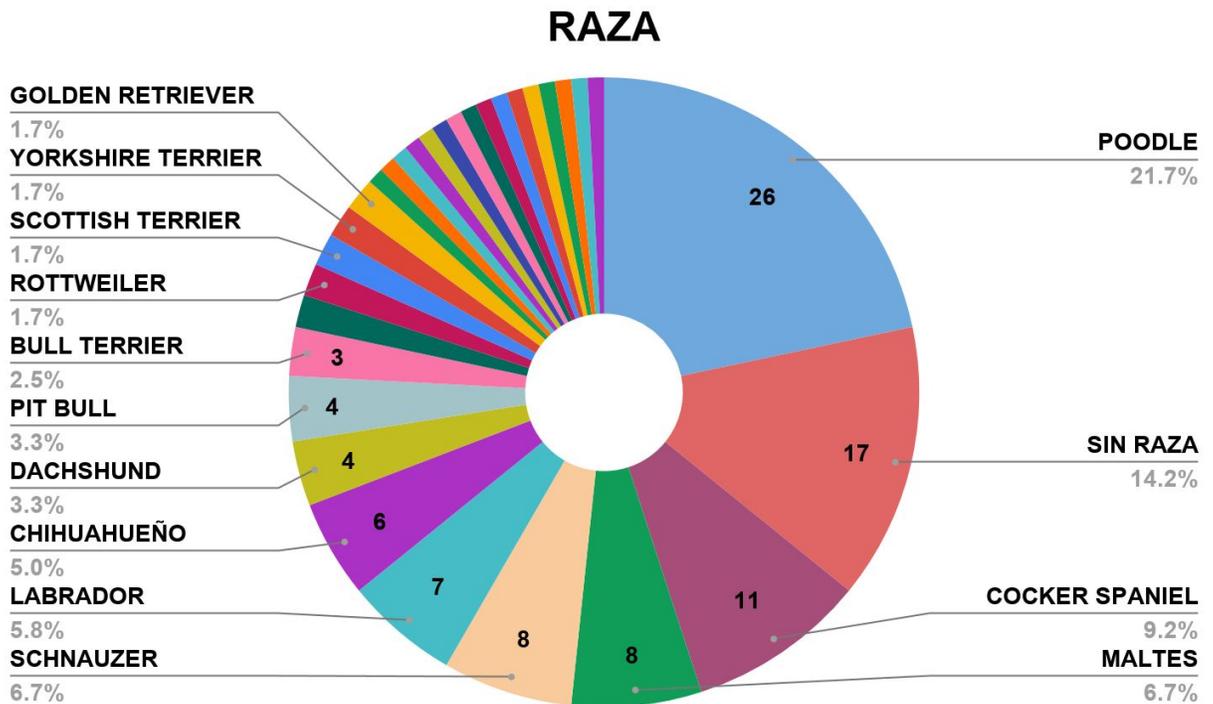


**(Tinción Diff Quik, 40x)**

## 7.1. RESULTADOS DE ESTUDIOS DE HISTOPATOLOGÍA

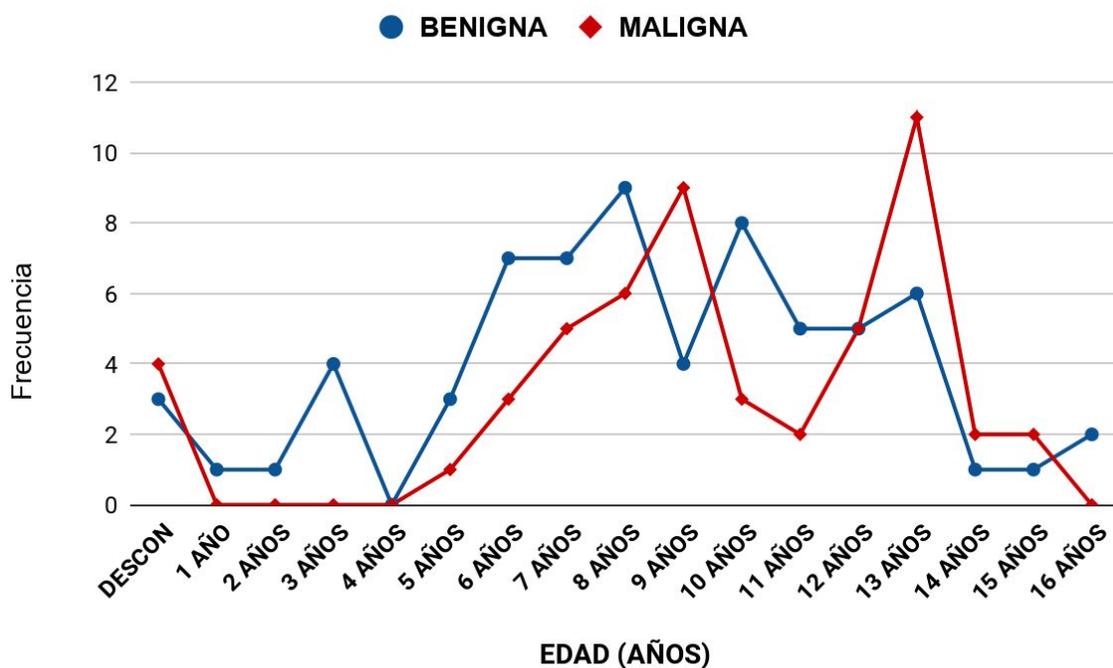
En el análisis de laboratorio, que se llevó a cabo en el programa de Excel; se obtuvieron registros en los cuales se percibió que las neoplasias se presentaron en 31 diferentes razas, siendo la raza Poodle la que tuvo mayor frecuencia con 26 casos (21.7%), seguida de los caninos “sin raza” con 17 casos (14.2%), la raza Cocker Spaniel con 11 casos (9.2%) y a la par las razas Maltés y Schnauzer estándar con 8 casos (6.7%). Las 26 razas restantes representaron 62 casos (48.2%) (Figura 24).

**Figura 24. Frecuencia de razas caninas de las muestras histopatológicas recibidas en el laboratorio, que son más afectadas con neoplasias mamarias.**



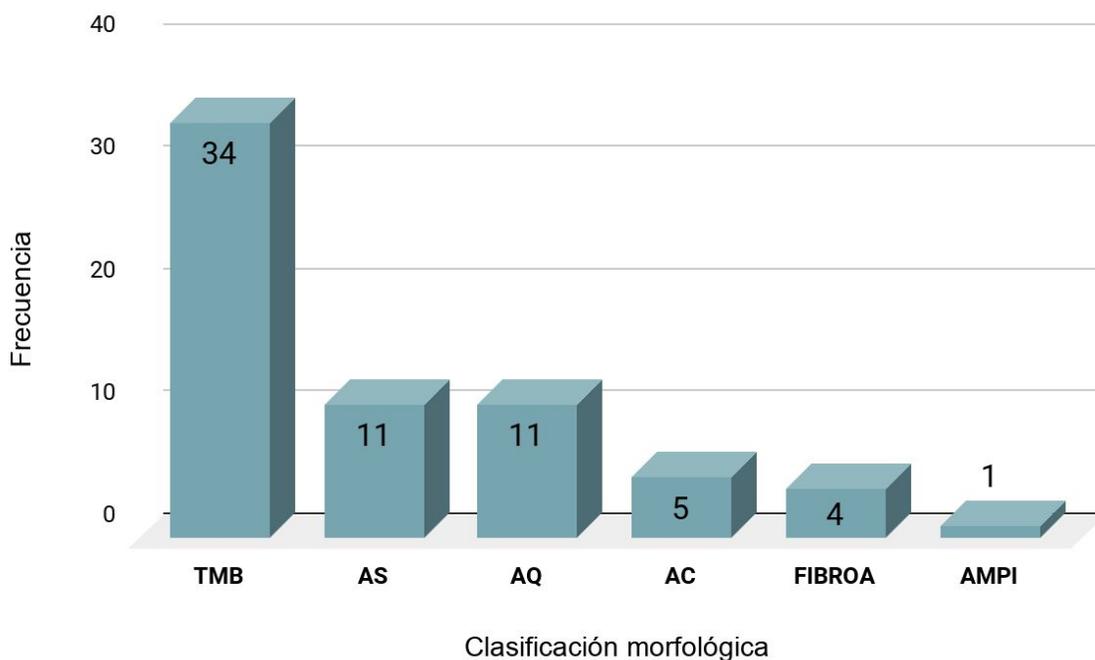
El rango de edades de los caninos con neoplasias mamarias fue amplio (1 año a 16 años), incluyendo la referencia de edad “desconocida”. La mayor recurrencia fue a los 13 años (14.2%), luego a los 8 años (12.5%), a los 9 años (10.8%) y a los 7 años (10%). La mayor concentración de casos benignos fue de 6 a 10 años, la relación aumentó en las neoplasias mamarias malignas en perras de 13 años (Figura 25).

**Figura 25. Caninos afectados con neoplasias mamarias benignas y malignas (edad).**



Con base al análisis histopatológico, del total de las neoplasias mamarias los tumores mamarios benignos fueron un poco más frecuentes 55% (66/120), que los malignos 45% (54/120). En la figura 26 se grafican los casos de las neoplasias mamarias encontradas. De las neoplasias benignas, el Tumor Mixto Benigno de Glándula Mamaria (TMB) fue el más frecuente con el 28.3% (34/120), seguida del Adenoma Simple (AS) 9.2% (11/120), junto con el Adenoma Quístico (AQ) 9.2% (11/120).

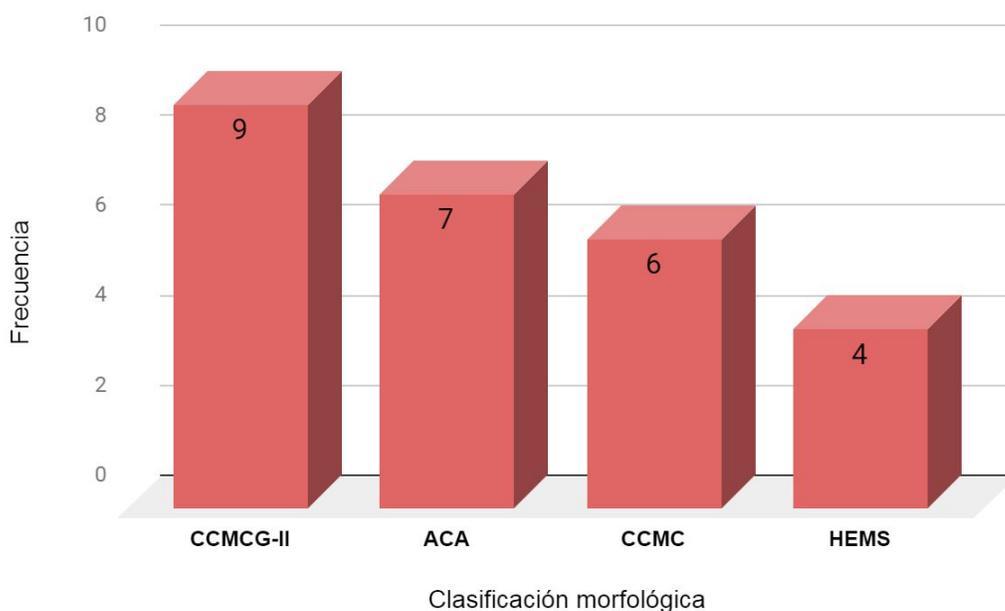
**Figura 26. Neoplasias mamarias benignas según el diagnóstico emitido.**



**TMB:** tumor mixto benigno de glándula mamaria; **AS:** adenoma simple; **AQ:** adenoma quístico; **AC:** adenoma complejo; **FIBROA:** fibroadenoma; **AMPI:** adenoma mamario papilar intraductal.

De las neoplasias malignas, las más frecuentes fueron los Carcinomas Mamarios Complejos de Grado Intermedio (grado II) con el 16.7% (9), le sigue el Adenocarcinoma 13% (7), después el Carcinoma Mamario Complejo con el 11.1% (6), seguido del Hemangiosarcoma 7.4% (4), las otras neoplasias representan el 51.8% (Figura 27).

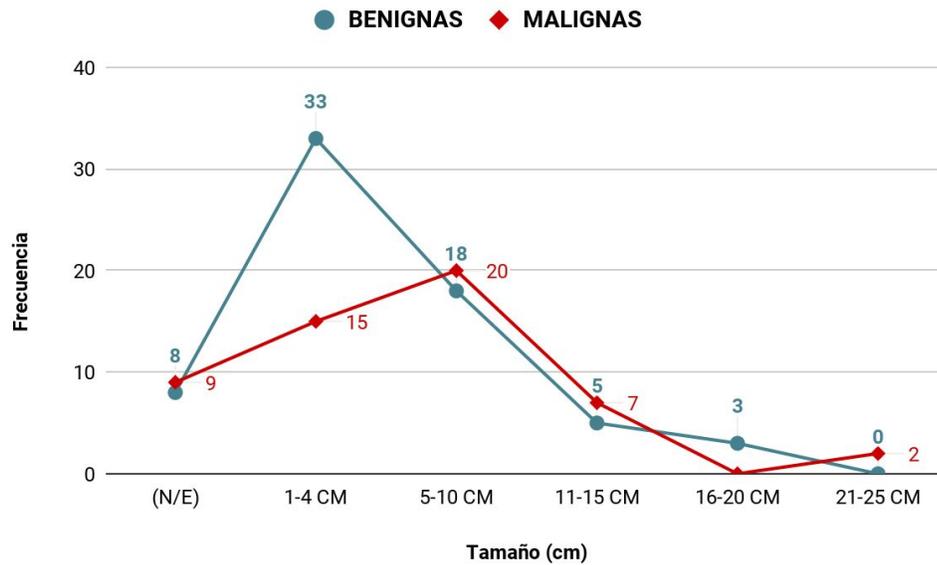
**Figura 27. Neoplasias mamarias malignas según la clasificación desarrollada.**



**CCMCG-II: carcinoma mamario complejo de grado intermedio (G-II); ACA: adenocarcinoma; CCMC: carcinoma mamario complejo; HEMS: hemangiosarcoma.**

El tamaño de las masas tumorales tomado de la historia clínica enviada por el MVZ, fue muy variado: los de mayor frecuencia, fueron de 1 a 4 cm con el 40% (48/120), seguidos por los de 5 a 10 cm 31.7% (38/120), y los de menor de frecuencia fueron > 15 cm (5/120; 4.2%). Las neoplasias benignas tendieron a ser de 1 a 4 cm y las malignas entre 5 a 10 cm (Figura 28).

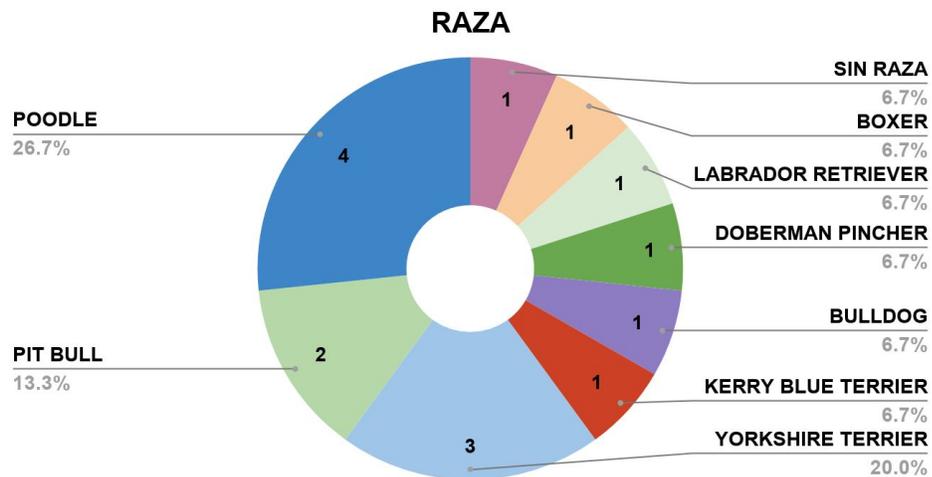
**Figura 28. Neoplasias mamarias según el tamaño (cm).**



## 7.2. RESULTADOS DE ESTUDIOS DE CITOPATOLOGÍA

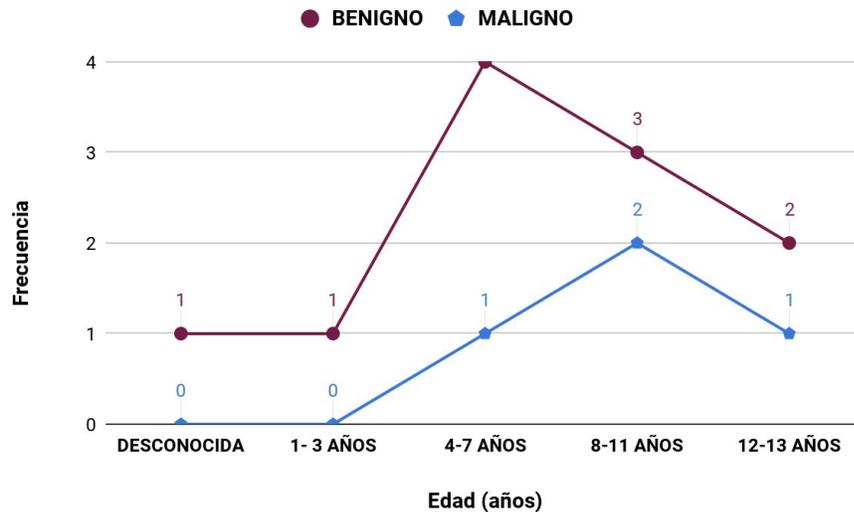
En el caso de los estudios de citopatología (Figura 29), fueron 9 razas las que presentaron neoplasias mamarias, la raza más frecuente también fue la Poodle con el 26.7% (4/15), le sigue la raza Yorkshire Terrier con 20% (3/15) y los Pit bull 13.3% (2/15).

**Figura 29. Frecuencia de razas de las muestras enviadas al laboratorio con NM diagnosticadas por citopatología.**



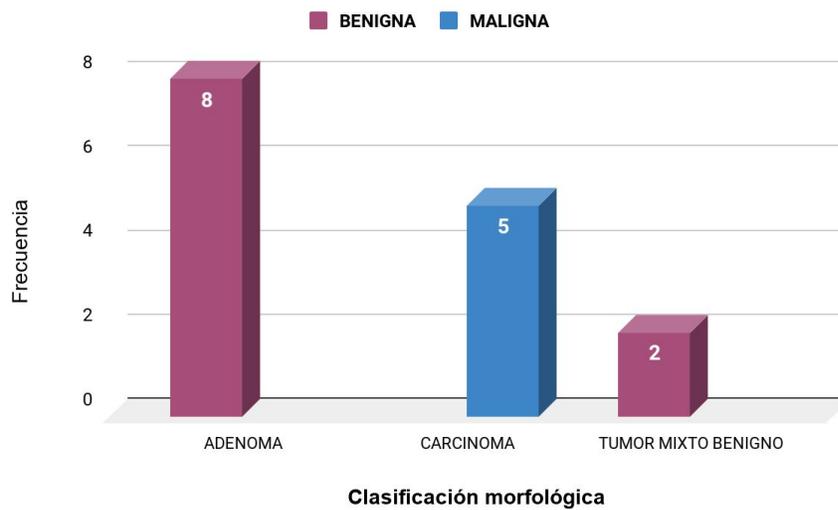
La frecuencia de edad fue de 4 a 7 años en las neoplasias benignas, y de 8 a 11 años para las neoplasias malignas (Figura 30).

**Figura 30. Caninos afectados con NM benignas y malignas de acuerdo a la edad en la que enviaron el estudio.**



De las neoplasias benignas el 53.3% (8/15) fue Adenoma, el 13.3% (2/15) fue Tumor Mixto Benigno. Para las neoplasias malignas, el 33.3% (5/15) fueron carcinomas (Figura 31).

**Figura 31. Frecuencia de neoplasias mamarias diagnosticadas con el sistema.**



### 7.3. ANÁLISIS ENTRE DIAGNÓSTICOS

El 55% de las neoplasias diagnosticadas en el laboratorio como benignas, resultaron de igual forma benignas con el SD desarrollado. De igual manera el 45% de las neoplasias diagnosticadas en el laboratorio como malignas, resultaron malignas con el SD desarrollado (Cuadro 5). Con estos resultados se calculó el índice de concordancia Kappa, que fue de 1,00 (Cuadro 6).

**Cuadro 5. Neoplasias diagnosticadas en el laboratorio y con el SD desarrollado.**

Sistema digital desarrollado	Diagnóstico laboratorio		Total
	Neoplasias Benignas	Neoplasias Malignas	
Neoplasias Benignas	66	0	66
Neoplasias Malignas	0	54	54
Total	66	54	120

**Cuadro 6. Escala de valoración de la concordancia; Landis y Koch (1977).**

Valor de kappa	Grado de concordancia
0,81 - 1,00	excelente
0,61 - 0,80	buena
0,41 - 0,60	moderada
0,21 - 0,40	ligera
< 0,20	mala

La sensibilidad y especificidad fueron:

$$\text{Sensibilidad} = a / (a+c) \quad \left| \quad \text{Se} = 1 \right.$$

$$\text{Especificidad} = d / (b+d) \quad \left| \quad \text{Es} = 1 \right.$$

Los valores predictivos tuvieron como resultado:

$$\text{Valor predictivo positivo} = a / (a+b) \quad \text{VPP} = 1$$

$$\text{Valor predictivo negativo} = d / (c+d) \quad \text{VPN} = 1$$

El en cuadro 7 se muestra el diagnóstico del comportamiento biológico de las neoplasias benignas diagnosticadas en el laboratorio y con el SD desarrollado, los cuales fueron iguales.

**Cuadro 7. Neoplasias benignas de GM diagnosticadas en el laboratorio y con el SD desarrollado.**

HISTOPATOLOGÍA		Diagnóstico laboratorio ↕										Total		
		Ad simple		Ad papilar intraductal		Ad quístico		Fibro-adenoma		Ad Complejo			Tumor mixto benigno	
Diagnóstico sistema desarrollado →	Adenoma simple	11	11											11
	Adenoma papilar intraductal			1	1									1
	Adenoma quístico					11	11							11
	Fibro-adenoma							4	4					4
	Adenoma Complejo									5	5			5
	Tumor mixto benigno												34	34
	<b>Total</b>	<b>11</b>		<b>1</b>		<b>11</b>		<b>4</b>		<b>5</b>		<b>34</b>		<b>66</b>

Ad: adenoma

En los diagnósticos de neoplasias malignas de GM emitidos por el laboratorio y los emitidos por el SD desarrollado (Cuadros 8 y 9), solo se vio una diferencia en el diagnóstico de Comedocarcinoma y Carcinoma papilar intraductal ya que en el laboratorio se diagnosticaron como Carcinoma tubular y Carcinoma papilar.

**Cuadro 8. Neoplasias malignas de GM diagnosticadas en el laboratorio y con el SD desarrollado.**

HISTOPATOLOGÍA		Diagnóstico laboratorio ↕										Total						
		Ca tubular		Ca Túbulo papilar		Comedo-carcinoma		Ca complejo		Ca tipo mixto			Ca papilar intraductal		Adeno Ca		Adeno Ca-papilar	
Diagnóstico sistema desarrollado ➡	Ca tubular	3	2													➡		2
	Ca Túbulo-papilar			3	2												➡	2
	Comedo-Ca					0	1										➡	1
	Ca complejo							22	22									22
	Ca tipo mixto									1	1							1
	Ca papilar intraductal											0	1					➡
	Adeno-Ca												11	11				11
	AdenoCa papilar	↕	↕			↕					↕					5	5	5
	<b>Total</b>	<b>3</b>		<b>3</b>		<b>0</b>		<b>22</b>		<b>1</b>		<b>0</b>		<b>11</b>		<b>5</b>		<b>45</b>

Ca: carcinoma

**Cuadro 9. Neoplasias epiteliales malignas de GM diagnosticadas en el laboratorio y con el SD desarrollado.**

HISTOPATOLOGÍA		Diagnóstico laboratorio								Total
		Osteosarcoma		Fibrosarcoma		Hemangiosarcoma		Tumor mamario mixto maligno (Carcinosarcoma)		
Diagnóstico sistema desarrollado	Osteosarcoma	1	1							1
	Fibrosarcoma			1	1					1
	Hemangiosarcoma					4	4			4
	Tumor mamario mixto maligno							3	3	3
<b>Total</b>		<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>9</b>

Sar: sarcoma

Los diagnósticos de muestras citopatológicas de GM emitidos por el laboratorio y los emitidos por el SD desarrollado fueron iguales (Cuadros 10 y 11).

**Cuadro 10. Neoplasias benignas diagnosticadas en el laboratorio y con el SD desarrollado.**

CITOPATOLOGÍA	Diagnóstico laboratorio		Total
	Adenoma	Tumor mixto benigno	
Sistema digital desarrollado			
Adenoma	8	0	8
Tumor mixto benigno	0	2	2
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>10</b>

**Cuadro 11. Neoplasias malignas diagnosticadas en el laboratorio y con el SD desarrollado.**

CITOPATOLOGÍA	Diagnóstico laboratorio	
	Carcinoma	Total
Sistema digital desarrollado		
Carcinoma	5	5

## 8. DISCUSIÓN

El incremento en los casos de enfermedad neoplásica en Medicina Veterinaria ejerce mayor demanda y desarrollo de la oncología veterinaria, tanto con fines diagnósticos como con fines terapéuticos (Salas y Romero, 2013). Por esta razón, el perro ha sido propuesto como modelo animal debido a que ha demostrado ser una fuente importante de información de la enfermedad en mujeres con cáncer de mama (Schafer, 1998).

Las clasificaciones de los TM son extensas y diversas, por tal razón, es importante tenerlas presente para una correcta identificación de neoplasias (Sánchez y Guarín, 2014).

La heterogeneidad histológica observada en las neoplasias mamarias caninas presenta una considerable dificultad a la hora de designar un método preciso para la emisión de un diagnóstico. Cabe señalar que no hay estudios previos en medicina veterinaria que clasifique las neoplasias de glándula mamaria en un sistema digital mediante un estudio histológico o citológico.

En 1974 Hampe y Misdorp de la OMS, publicaron la primera “Clasificación histológica internacional de tumores de animales domésticos”, esta clasificación se basa en homologar lo más posible las neoplasias mamarias en caninos a los tumores mamarios humanos, agrupar de manera ordenada los diversos tipos histológicos de tumores mamarios caninos y establecer una predicción de la conducta del tumor luego de la resección quirúrgica. Clasificaron los tumores mamarios como “complejos” cuando están presentes células mioepiteliales y células epiteliales secretoras, y “simples” cuando sólo un tipo de estas células está presente.

Moulton (1990) agrega y especifica los criterios histológicos y citológicos e incluye los tumores mamarios benignos como; el adenoma, el tumor mixto y el mioepitelioma pero no incluye los tumores de la piel de la glándula mamaria, como algunos ejemplos son el papiloma (incluido el papiloma de la piel del pezón), el lipoma, el hemangioma, el fibroma y el fibrosarcoma. En esta clasificación, la información de los criterios histológicos y citológicos es escasa para determinar el diagnóstico de las neoplasias, solo se mencionan algunos criterios de diferenciación como la presencia de papilas, cartílago y hueso.

En la clasificación propuesta por Goldschmidt y col. (2011), se comparan los sistemas de clasificación de los carcinomas mamarios caninos y su uso para el pronóstico, junto con la clasificación histológica. En esta clasificación se agregan nuevos tipos histológicos, como el carcinoma inflamatorio, el cual refleja signos clínicos asociados con reacciones inflamatorias como eritema, calor y dolor. Algunas neoplasias malignas (por ejemplo; carcinoma sólido y carcinoma anaplásico) conservan los mismos nombres, mientras que otras (carcinoma micropapilar invasivo y carcinoma ductal) están separadas de sus tipos asignados previamente. Ellos incorporan las dos clasificaciones anteriores y añaden criterios histológicos y citológicos más detallados para poder obtener un diagnóstico.

Cuando se recabo, analizó y estableció la información de las tres clasificaciones: Hampe y Misdorp (1974), Moulton (1990) y Goldschmidt y col. (2011), se diseñó la base de datos en Excel, con el propósito de desarrollar un sistema digital y así poder evaluar el valor diagnóstico de las neoplasias mamarias en caninos, fue imprescindible conocer la estructura de la glándula mamaria, los términos de los criterios morfo histológicos y citológicos para facilitar la interpretación de las laminillas. El SD desarrollado fue accesible y a su vez la lectura de las laminillas fue práctica con las divisiones que se emplearon: parénquima y estroma.

La frecuencia con la que se reciben casos de NGM en el laboratorio de patología veterinaria hace necesario el uso de nuevas herramientas que permitan un diagnóstico rápido y más acertado, ya que establecer una clasificación morfológica de las NGM en caninos ofrece oportunidades de control eficaces y por ende una ventaja sustancial traducida en mejor calidad de vida y pronóstico para las pacientes con dicha neoplasia.

Para realizar el análisis histológico y citopatológico se desarrolló en Excel un sistema digital donde se incluyeron los criterios de malignidad con el fin de llegar a un diagnóstico certero. Existen criterios generales de malignidad como la anisocitosis, macrocitosis, la hipercelularidad y el pleomorfismo, que no tienen gran peso en la interpretación final, al igual que los criterios de malignidad del citoplasma como la basofilia y la vacuolización. Como menciona Núñez (2007) los criterios de importancia capital en la interpretación son los nucleares y los nucleolares.

Sánchez y Guarín (2014) mencionan que existe una gran controversia para demostrar si son más frecuentes los TM en razas puras o en mestizos, lo que está influenciado de forma directa por parámetros como la localización geográfica de los animales estudiados y la preferencia de los propietarios por unas razas comparadas con otras. Estudios epidemiológicos frecuentemente reportan mayor susceptibilidad en razas de talla pequeña, aunque se ha incrementado la presentación en animales de talla grande, dependiendo también el sitio donde se lleve a cabo el estudio, sin embargo, las razas más reportadas incluyen al Poodle, Maltés, Chihuahua, Beagle, Cocker Spaniel, Yorkshire Terrier entre otras (Salas y col., 2018). Zatloukal y col. (2005) indican que los Poodle, Cocker Spaniel y Dachshunds son las razas más afectadas tanto por tumores malignos como benignos.

En el presente trabajo encontramos que las muestras con mayor envío al laboratorio para su estudio histopatológico fue la raza Poodle, seguido de los caninos “sin raza”, Cocker Spaniel, Maltés y Schnauzer estándar. Lo cual coincide con un estudio realizado por Núñez y Montes (2012) donde también se reportó una incidencia elevada en la raza Poodle, seguida de caninos “sin raza”, y en tercer lugar los Cocker Spaniel. De igual manera, Salas y col. (2016) observaron que las razas con mayor tendencia a desarrollar neoplasias mamarias fueron la raza Poodle, el Cocker Spaniel y el Dachshund. Por su parte, Oliveira y col. (2010) demostraron que las cinco razas más prevalentes en su estudio fueron: Poodle, Cocker Spaniel, Dachshund, Pastor y Pinscher.

El promedio de edad en que se presenta NGM es de 10-11 años, con un intervalo de 2-16 años (Núñez y Montes, 2012). En el presente estudio se percibió que la mayor frecuencia de caninas con neoplasias mamarias benignas fue de 8 años, mientras que para las neoplasias malignas la incidencia fue de 13 años, afectando mayormente entre los 6 a los 13 años. Lo cual coincide con los resultados de otros estudios como el realizado por Salas y Romero (2016) donde se observó que el TMC afecta con mayor frecuencia a las perras mayores de 8 años de edad. También Withrow, Vail y Page (2013) mencionan que los TM especialmente los tumores malignos, son extremadamente raros en perros menores de 5 años.

Desde el punto de vista histológico los TM representan el 50% de todas las neoplasias que afectan a perros hembras (Andrade y Figueiroa, 2010) y la mayoría de los estudios histopatológicos han demostrado que aproximadamente el 50% de los tumores registrados son benignos (Morris y Dobson, 2001). En el presente estudio se encontró que la frecuencia de presentación de las neoplasias mamarias benignas fue de 54.2% y malignas fue de 45.8%, proporción similar a la observada en el estudio realizado por Salas y col. (2016) donde se trabajó con 178 tumores; de estos tumores el 58.4% (104) fueron tumores benignos y el 41.6%

(74) fueron malignos. Igualmente, Peña y col. (2012) realizaron un estudio donde se revisaron 65 casos de perras con tumor mamario, en este se encontró que el 70.8% (46) presentaban al menos un tumor maligno, aunque se observaron neoplasias benignas concurrentes y displasias en el 77% (50) de las 65 pacientes. En nuestro estudio observamos el 45% que concordaron a neoplasias malignas. Similar a lo que menciona Sorenmo (2003) donde observó que las neoplasias mamarias malignas corresponden aproximadamente del 40% al 50%.

En caninos, así como en mujeres, la mayoría de los tumores mamarios son de origen epitelial, y su incidencia se incrementa con la edad; el patrón de metástasis más común comprende ganglios linfáticos regionales y el pulmón (Kumaranguruparan y col, 2006). Algunos, sin embargo pueden tener una histología mixta que consta de tejido epitelial y mioepitelial, con áreas de cartílago y hueso, y algunos tumores son de origen puramente mesenquimal (Sorenmo 2003).

Meuten (2002) menciona que de la variedad de tumores clasificados como benignos, el que se presenta con mayor frecuencia es el tumor mixto benigno. Los cuales se caracterizan por una mezcla compleja de células epiteliales y mioepiteliales que ocasionalmente presentan metaplasia condroide, ósea o escamosa (Cassali y col., 2006). En el presente estudio se obtuvo el 28.3% (34/120) de caninos con tumor mixto benigno, lo cual coincide con el trabajo realizado por Im y col. (2014) donde mostraron que los TM benignos más comunes son el tumor mixto benigno y el adenoma complejo. También, Cruz, Eraso y Pedraza (2015) identificaron que las neoplasias benignas con mayor presentación fueron el tumor mixto benigno y el adenoma simple. De igual modo, Tabacchi y col. (2000) también señalaron que el tumor mixto benigno se encontraba entre las neoplasias benignas más comunes, seguido de los adenomas.

En primer lugar se observó una frecuencia de Carcinomas Mamarios Complejos de Grado Intermedio (grado II) con el 16.7%, en segundo lugar el Adenocarcinoma 13%, y en tercer lugar el Carcinoma Mamario Complejo con el 11.1%. También coincide con lo descrito por Cruz y col. (2015) donde la neoplasia maligna predominante fue el carcinoma. No obstante, Couto y Nelson (2000, en Perú) indican que el adenocarcinoma es el tumor mamario maligno más común en las perras. De igual manera, Hermo (2005) refiere que el adenocarcinoma es el tipo más común en los TM malignos caninos.

En cuanto al tamaño, lo encontrado en este estudio fue que las neoplasias benignas fueron < 10 cm. Coincidiendo con Ferreira y col. (2009) mencionan que 80% de los tumores benignos son < 5 cm.

Ressel y col. (2013) encontraron que el diámetro de los carcinomas (8 cm) fue mayor que el de los adenomas mamarios (3 cm) y que la sobrevida es menor en perras con tumores >5 cm. De igual forma coincide con el presente estudio, debido a que las neoplasias malignas con mayor frecuencia fueron de 5 a 10 cm.

Herme y col., (2005) refieren que el reporte de histopatología debe incluir siempre el grado de infiltración y el grado histológico de malignidad (por ejemplo el grado de diferenciación, grado nuclear, índice mitótico, invasión linfática o vascular). Estos valores pueden ser usados para indicar malignidad y el alto riesgo de recurrencia y metástasis pulmonar. El grado de malignidad histológica usualmente se expresa en una escala de I a III grados, donde el grado III tiene pronóstico desfavorable.

Respecto a la sensibilidad, especificidad e índice de concordancia Kappa entre el diagnóstico inicial y el diagnóstico según el sistema digital desarrollado para saber si es neoplasia mamaria benigna o maligna fue de 1,00 (excelente), ya que las neoplasias reportadas en un inicio como neoplasias benignas fueron clasificadas con el SD también como benignas en el 100% de las neoplasias. De igual manera, el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) también fue del 100%.

Finalmente, la razón por la que existió diferencia entre los diagnósticos emitidos referentes al comportamiento biológico de las neoplasias mamarias malignas se debe a que en el laboratorio Divet® no se aplicó la nomenclatura de algunas neoplasias que están incluidas en la clasificación de GM que se empleó en el presente estudio.

## 9. CONCLUSIONES

1. Se desarrolló una base de datos en Excel, integrando las tres principales clasificaciones de neoplasias de glándula mamaria en caninos.
2. Se desarrolló un sistema digital donde se usaron los criterios histológicos y citológicos para identificar y clasificar las NGM en caninos.
3. Se hizo la clasificación de neoplasias mamarias empleando el sistema digital.
4. Los tumores mamarios caninos afectaron con mayor frecuencia a las perras adultas mayores de 13 años, después a los 8 años. La mayor concentración de casos benignos fue de 6 a 10 años, la relación aumentó en las neoplasias mamarias malignas en perras de 13 años. La raza con mayor tendencia a desarrollar neoplasias fue la raza Poodle, seguida de los caninos “sin raza”, la raza Cocker Spaniel y en conjunto las razas Maltés y Schnauzer estándar. Asimismo, la mayoría de los caninos presentaron TM benignos (55%), mientras que los tumores malignos fueron de (45%). Las diferencias de presentación por raza, edad y tipo de tumor coincidieron altamente con la bibliografía analizada.
5. La sensibilidad, especificidad e índice de concordancia Kappa entre el diagnóstico inicial y el diagnóstico según el sistema digital desarrollado fue de 1,00. El valor predictivo positivo y valor predictivo negativo
6. Es posible emitir un diagnóstico con el sistema digital desarrollado de acuerdo a los criterios morfo citológicos e histológicos, el cual es un diagnóstico cuantitativo, basado en estadística y en la MBE.

## **10. OBSERVACIONES**

Este sistema de clasificación propuesto facilitará el diagnóstico de los estudios y dará importancia de otros parámetros para el pronóstico de las neoplasias mamarias en caninos.

Es importante recordar que la nomenclatura histológica de neoplasias de glándula mamaria se actualiza continuamente, por lo tanto es importante poseer información asiduamente para emitir un diagnóstico acertado y a la vez ofrecer un pronóstico y tratamiento adecuados.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Andrade, F., Figueiroa, F., Bersano, Paulo., Bissacot, Denise., Rocha, N. (2010). Malignant mammary tumor in female dogs: environmental contaminants. *Diagnostic Pathology*. Brazil.
2. Bloom, J. (1950). Further Studies On Prognosis Of Breast Carcinoma and Prognosis In Carcinoma Of The Breast.. Br J Cancer 4, 347-367, London.
3. Bloom, J., Richardson, W. (1957). Histological Grading And Prognosis In Breast Cancer; A Study Of 1409 Cases Of Which 359 Have Been Followed For 15 Years. Br J Cancer 11; 359-377, London.
4. Cassali, G., Gobbi, H., Malm, C., and Schmitt F. (2007). Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumours: comparative features with human tumours. *Cytopathology*, PubMed, Portugal.
5. Cartagena, Juan. (2011). Oncología veterinaria. Manuales clínicos por especialidades. Editorial Servet, Grupo Asís Biomedica S.L., España.
6. Chau, Guillermo., Chavera, Alfonso., Perales, Rosa., Gavidia, César. (2013). Frecuencia de neoplasias en glándula mamaria de caninos: estudio retrospectivo en el periodo 1992-2006 en la ciudad de Lima, Perú. *Rev. investig. vet. Perú*, Lima, v.24, n.1, p.72-77. Disponible en <[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172013000100010&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172013000100010&lng=es&nrm=iso)>. accedido en 22 julio 2018.
7. Cohen, J. (1960). *A coefficient of agreement for nominal scales*. *Educ Psychol Meas* 20:37-46, New York.
8. Couto, G., Nelson, R. (2000). Medicina interna de animales pequeños. Ed Inter-Medica, p933-935, Argentina.
9. Cowell, R., Tyler, R., Meinkoth, J., DeNicola, D. (2009). Diagnóstico Citológico y Hematológico del perro y el gato. Tercera Edición, Editorial ElSevier, España.

10. Cruz, M., Eraso F., Pedraza J. (2015). Pronóstico clínico y factores biológicos asociados a la supervivencia en caninos afectados por neoplasias mamarias. *Rev CES Med Zootec.* Vol 10 (2): 170-178, Colombia.
11. Elston, C., & Ellis, O. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19, 403-10, UK.
12. Ferreira, E., Bertagnolli, A., Cavalcanti, M., Schmitt, F. and Cassali, G. (2009). The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Veterinary Comparative Oncology*, 7:230-235, Brazil.
13. Goldschmidt, M., Peña. L., Rasotto R., and Zappulli, V. (2011). Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. *Vet Pathology*. Vol 48 (1):117-131, Philadelphia.
14. Hampe, J., Misdorp, W. (1974). Tumours and dysplasias of the mammary gland. *Journal of the National Cancer Institute*, 50, 111-133. Amsterdam.
15. Hellmen, E., Bergstrom, L., Spangberg, B., Hansson, K., Lindgren, A. (1993). Prognosis factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Veterinary Pathology*, Vol. 30. Issue 1. p20-27, Sweden.
16. Hermo, G., García, M., Torres, P., y Gobello, C. (2005). Tumores de Mama en la perra. *Ciencia Veterinaria* Vol. 7, N. 1, Argentina.
17. Im, K., Kim, N., Lim, H., Kim, H., Shin, J. and Sur, J. (2014). Analysis of a New Histological and Molecular-Based Classification of Canine Mammary Neoplasia. *Veterinary Pathology*, Vol.51 (3) 549-559, Korea.
18. Kumaraguruparan, R., Karunagaran, D., Balachandran, C., Manohar, B.M., Nagini, S. (2006). Of humans and canines: a comparative evaluation of heat shock and apoptosis-associated proteins in mammary tumors. *Clinica Chimica Acta*; 365, 168-176.

19. Landis, R., Koch, G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* Vol. 33, 33:159-174, Pennsylvania.
20. Leonart, ME., Martin-Duque, P., Sánchez-Prieto, R., Moreno, A., Ramón y Cajal, S. (2000). Tumor Heterogeneity: Morphological, Molecular and Clinical Implications. *Histol Histopathol*; 15: 881-898, Spain.
21. Martínez, Elena. (2008). Atlas de citología clínica del perros y del gato. Editorial Servet, Grupo Asís Biomedica, España.
22. Meuten, D. (1990). Tumors in Domestic Animals. ED Iowa State Press, USA.
23. Meuten, D. (2002). Tumors in Domestic Animals. 4th Edit. ED Iowa State Press, USA.
24. Misdorp, W., Else, W., Hellmen, E. & Lipscomb, P. (1999). Histologic Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat, Washington DC, Armed Force Institute of Pathology and World Health Organization.
25. Morris, J., Dobson, Jane. (2001). Small Animal Oncology. Ed Blackwell Science, Oxford.
26. Moulton, J. (1990). Tumors in Domestic Animals. 2nd. Edit. University of California Press, Berkeley. 188-189, USA.
27. Nieto, A., Peña, L., Pérez-Alenza, D., Sánchez, A., Flores, 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, Spain.
28. Núñez, O. (2007). Patología Clínica Veterinaria. 2da Ed. Editorial UNAM, México.
29. Núñez, O., Montes de Oca, A. (2012). Frecuencia de neoplasias de glándula mamaria en perras con diagnóstico citológico. *Revista científica*, Vol XXII, Núm. 5, pp.426-431, Venezuela.

30. Oliveira, J.C., Kommers, G.D., Masuda, E.K., Marques, B., Figuera, R.A., Irigoyen, L.F., Barros, C. (2010). Retrospective study of 1,647 mammary gland tumors in dogs. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 30, 177-185, Brazil.
31. Peña, L., De Andres, P., Clemente, M., Cuesta, P., Pérez-Alenza, M. (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* 50:94–105, Spain.
32. Ressel, L., Puleio, R., Ruggerom, L., Vannozzi, I., Millanta, F., Caracappa, S. (2013). HER-2 expression in canine morphologically normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissues and its correlation with the clinical outcome. *Research in Veterinary Science*, 94:299-305, United Kingdom.
33. Raskin, E., & Meyer, J. (2010). *Citología Canina Y Felina, Atlas en color y guía de interpretación*. 2da Ed. Multimédica Ediciones Veterinarias, España.
34. Romairone, D, A., Cartagena, A, J. (2014). *Atlas de tumores. Oncología en la clínica diaria*. Editorial Servet, Grupo Asís Biomedica S.L., España.
35. Rosciani, A., Merlo, W., Insfrán, R., Rodríguez, Y. (2015). Valor pronóstico de la última clasificación histológica de tumores mamarios caninos. *Rev Vet* 26 (2): 99-102, Argentina.
36. Salas, Y., Romero, L. (2013). Cáncer de mama en perras (*Canis lupus familiaris*): Causas, factores de riesgo y marcadores moleculares en su clasificación y pronóstico. Similitud con el cáncer de mama humano. Mammary cáncer in bitches (*Canis lupus familiaris*): Causes, risk factors and molecular markers in ITS classification and prognosis. Similarities with human breast cancer. *Gaceta de Ciencias Veterinarias*. Vol 16, N° 2: 56-64, México.
37. Salas, A. Y. J., Alonso, R., Márquez, A., Corona, H. (2016). Asociación histológica con factores potenciales de riesgo y tiempo de sobrevida en el tumor mamario canino. *Veterinaria OA*, 3 (1). 1-12, México.

38. Salas, A. Y. J., Romero, R. L. P. (2016). Cómo mejorar el diagnóstico y pronóstico en perras con tumor mamario mediante el uso de biomarcadores. *Remevet, Pequeñas Especies Oncología*, Año 8, No 30: 7-12, México.
39. Salas, A. Y. J., Castro, D. S., Romero, R. L. P. (2018). Aspectos relevantes de las neoplasias mamarias en perras y aplicación del sub-tipo molecular con fin diagnóstico y pronóstico. *Remevet, Pequeñas Especies*. Año 2, No 5: 15-22, México.
40. Sánchez, Catherine. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Knowing and understanding the cancer cell: Physiopathology of cancer*. *Revista Médica Clínica Las Condes*. Volume 24, Issue 4, pages; 553-562. Chile.
41. Sánchez, R., Guarín, E. (2014). Tumores de glándula mamaria en caninos. *Conexagro JDC Vol 4 (2): 60-78*, Colombia.
42. Schafer, K., Kelly, G., Schrader, R., Griffith, W., Muggenburg, B., Tierney, L., Lechner, J., Janovitz, E. and Hahn, F. (1998). A Canine Model of Familial Mammary Gland Neoplasia. *Vet Pathol* 35:168-177, Albuquerque.
43. Sorenmo, K. (2003). Canine mammary gland tumors. En *The Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice, Advances in Medical Oncology*, Volume 33, Number 3; p. 573-591, USA.
44. Tabacchi, L., Sandoval, N., Perales, R., Santillán, G. y Orbegozo, G. (2000). Neoplasias de glándula mamaria en caninos. *Rev. Inv. Vet*; 11(2):140-143, Perú.
45. Torres, G., Eslava, R. (2007). Tumores mamaros en caninos: Adenocarcinoma complejo de glándula mamaria con metástasis a ganglio linfático regional. *Orinoquia* [en línea]. [Fecha de consulta: 22 de agosto de 2018] Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=89611111> > ISSN 0121-3709, Colombia.

46. Vilches-Cisneros, N., Barboza-Quintana, O., Garza-Guajardo, R., Ancer-Rodríguez, J., Flores-Gutiérrez, JP. (2010). Aplicaciones prácticas de la inmunohistoquímica en la patología de la glándula mamaria. *Patología Rev Latinoam*; 48(3):194-203, México.
47. Withrow, S., Vail, D. (2009). *Oncología clínica de pequeños animales*. Ed. Multimédica Ediciones Veterinarias. Cuarta edición, España.
48. Withrow, S., Vail, D., Page, R. (2013). *Small Animal Clinical Oncology*. 3rd ed. Elsevier; 538-547, USA.
49. Zachary, F., McGavin, D. (2012). *Pathologic basis of Veterinary Disease*, 5th ed, Elsevier, USA.
50. Zatloukal, J., Lorenzova, J., Tichy, F., Necas, A., Kecova, H., Kohout, P. (2005). Breed and age as risk factors for canine mammary tumours. *Acta Veterinaria Brno* 74, 103-109, Czech Republic.