

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



“Detección de receptores de Progesterona por inmunohistoquímica en tumores mamarios malignos en pacientes canidos (*Canis lupus familiaris*) hembra.”

Tesis para optar el Título Profesional de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA.

Eduardo David Assen Guerra.

Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia

LIMA - PERÚ

2017

Dedico este trabajo a mis padres y hermano Percy Assen que desde el cielo me brindo
fortaleza.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ricardo Grandez y Dr. Javier Mamani, por su valioso tiempo e infinita paciencia para la realización de este proyecto.

Al MVZ. Christian Perez por su disponibilidad para resolver mis dudas.

A mis padres por el apoyo incondicional que me dieron a lo largo de la carrera.

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the presence of progesterone receptors (PR) by using the immunohistochemistry technique, in calcified mammary adenocarcinomas, in the Laboratory of Histology and Pathology of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry of the Universidad Peruana Cayetano Heredia; and if there is an statistical correlation between the prognostic marker of nucleolar argyrophilic organized regions (AgNOR) and the malignancy level. Samples processed between 2006 - 2010 were assayed by IHC. The results show an average RP count was 0.3 ± 0.42 of reactive nuclei / 1000 cells (range: min 0% - max 20%). A negative correlation between AgNOR and RP ($r = -0.147$) variables was evidenced, and also it was observed a correlation between AgNOR variables and degree of malignancy ($r = 0.022$), and no correlation was found between PR and degree of malignancy ($r = 0.30$) in the nuclei/100 cell count.

Key words: mammary tumor, progesterone receptor, immunohistochemistry.

RESUMEN

El objetivo de este estudio, fue determinar la presencia de receptores de progesterona (RP) mediante la técnica de inmunohistoquímica, en neoplasias mamarias calificadas como adenocarcinoma, en el Laboratorio de Patología e Histología de la Facultad de Medicina Veterinarias y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia; y precisar si existe correlación significativa entre el marcador pronóstico de las regiones organizadas argirofílicas nucleolares (AgNOR) y el grado de malignidad. Se evaluaron 31 muestras de la base de datos diagnosticadas entre los años 2006 – 2010. El conteo promedio de RP fue 0.3 ± 0.42 de núcleos reactivos/1000 células (rango: mínimo 0% – máximo 20%). Se evidenció una correlación negativa entre las variables AgNOR y RP ($r = -0.147$), asimismo se halló una correlación entre las variables AgNOR y grado de malignidad ($r = 0.022$), y no se encontró correlación entre RP y grado de malignidad ($r = 0.30$) en el conteo núcleo/100 células.

Palabras clave: Tumor mamario, receptor de progesterona, inmunohistoquímica.

INTRODUCCION.

La glándula mamaria es una glándula sudorípara modificada localizada en el tejido subcutáneo que tiene como función principal nutrir a los neonatos y conferir inmunidad pasiva (Vidales y Mocha, 2007), puede estar aquejada por diversas patologías, entre las más relevantes se considera a las enfermedades neoplásicas, que afectan al tejido glandular y sus conductos, así como también a los tejidos adyacentes o que tienen relación con las mismas (Vidales y Mocha, 2007).

Las neoplasias mamarias o tumores mamarios (TM) en caninos con mayor frecuencia acontecen en hembras de diferentes estados fisiológicos, edad, y origen racial, donde se ven alterados los patrones de desarrollo del epitelio mamario; su etiología abarca múltiples factores teniendo como una constante la estimulo persistencia hormonal (Russo J y Russo I, 1998; Benjamin *et al.*, 1999).

La diagnosis de las masas se basa en la biopsia por escisión y su posterior estudio histológico, el examen citológico de espécimen obtenidos mediante aspiración por aguja fina suele rendir resultados ambiguos, esto demuestra que la citología debe usarse para el diagnóstico tentativo, y la histopatología como un procedimiento definitivo (Guillermo *et al.*, 2005).

Goldschmidt *et al.* (2011) ha sugerido una nueva clasificación basada en la vigente (OMS – 1999) la cual incluye nuevas categorías concordantes con los avances de la medicina en este campo. Esta clasificación distribuye a las neoplasias en ocho grandes categorías, dividiéndolas según sean malignas o benignas, de origen epitelial o mesenquimal, y considerando aparte displasias/hiperplasias y neoplasias del pezón.

La clasificación de las neoplasias tiene como objetivo evaluar la arquitectura de la neoplasia y las variaciones morfológicas del núcleo, y el grado histológico presenta una correlación significativa con la agresividad del tumor (Elston y Ellis, 1998).

Según este sistema, la determinación de grado histológico se basa en la evaluación de índice de formación de túbulos (1: más de 75 % de tumor con túbulos, 2: entre 10% y 75% de las formaciones tubulares, y 3 puntos los túbulos que ocupan 10% o menos del tumor), pleomorfismo nuclear (1: núcleos pequeños y regulares; 2 puntos: aumento moderado del tamaño y forma del núcleo), y el recuento mitótico (1 punto: 0-8 mitosis, 2 puntos: 9-16 mitosis, y 3 puntos: por encima de 17 mitosis en aumento 40X) (Cassali *et al.*, 2011).

El sistema de graduación histológica es una herramienta útil para el pronóstico, este sistema considera formación tubular, pleomorfismo nuclear y el índice mitótico de la neoplasia la cual recibe puntaje a cada parámetro a través de la suma de las puntuaciones, grado I: 3, 4, 5; grado II 6 – 7, al grado III, lo que en resumen es que, el grado de malignidad morfológica es directamente proporcional con la cantidad de estructuras anómalas. (Elston y Ellis, 1991; Goldschmidt *et al.*, 2011), este sistema es reconocido y es un método válidos para obtener resultados del grado de malignidad de muestras de neoplasias.

Debido a las diversas características clínica de los tumores, y variaciones considerables en el comportamiento biológico de la neoplasia, es difícil establecer un pronóstico sin exámenes de laboratorio que clasifiquen el grado de malignidad (Ochoa-Amaya *et al.*, 2009), para así poder utilizar protocolos terapéuticos con una adecuada eficacia.

A diferencia de otros mamíferos, los perros tienen solo dos ciclos estruales al año seguido de una prolongada fase lútea, lo que hace que la glándula mamaria esté expuesta continuamente a altas concentraciones de progesterona. (Rao *et al.*, 2009). La esterilización temprana reduce drásticamente la incidencia de tumores mamarios en perras, lo que confirma el papel de los esteroides sexuales en el desarrollo de la enfermedad. (Gracanin, 2014).

La progesterona juega un papel importante en el desarrollo normal y la carcinogénesis de la glándula mamaria. (Gracanin, 2014). Los receptores de progesterona se han encontrado en una gran proporción de tumores mamarios, lo que indica la importancia de las hormonas esteroides sexuales en el crecimiento de tales tumores. (Rutteman *et al.*, 1988). Sorenmo. (2003) propone que el tratamiento con progestágenos para evitar la aparición del estro y la concepción incrementa el desarrollo de tumores.

Un parámetro importante con valor pronóstico se encuentra los marcadores de proliferación celular (Nieto *et al.*, 2000), las ventajas de evaluar el índice mitótico incluyen el hecho de que es aplicable a la mayoría de tipos histológicos embebidos en formalina. (Dutra *et al.*, 2008) como son el Ki-67, AgNOR, además de marcadores moleculares como los receptores de hormonas: receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), un marcador de índice de proliferación celular de tumor (MIB-1) (Cassali, 2000; Nardi *et al.*, 2007).

AgNOR, son genes repetitivos transcribiendo ARNr, localizadas principalmente en la región del nucléolo en células en interfase, su síntesis se ve incrementada durante la transcripción del ADN, la plata (Ag) se une selectivamente a estas proteínas, su cantidad y estado de fosforilación determinan la cantidad de tinción NOR (Araki *et al.*, 2006). Al aplicar la

técnica AgNOR, las sales de plata se fijan a las proteínas a manera de conglomerados puntiformes intranucleares (pardas o negras) que se observa en microscopia óptica.

Actualmente los marcadores moleculares han sido evaluados como fuente de información para el pronóstico y para predecir el comportamiento de diversas neoplasias en animales, para así poder controlar su desarrollo, (Ribeiro *et al.*, 2010), datos experimentales indican que los tumores mamarios caninos son dependientes de hormonas; es decir, que están fuertemente influenciadas por las hormonas ováricas, principalmente estrógenos y progesterona (Guill *et al.*, 2014).

Los (RP) son importantes en la fisiología normal de la glándula mamaria y tienen un efecto proliferativo sobre el tejido de mama (Schmitt *et al.*, 1995), existe como dos isoformas, RPA y RPB, que se expresan a partir de un único gen en los seres humanos, y en los perros, la clonación y secuenciación del gen RP han confirmado la presencia de isoformas RPA y RPB. (Guill *et al.*, 2014). La presencia de receptores de progesterona en proporciones variables en tumores benignos y malignos de la glándula mamaria se ha asociado con un pronóstico favorable en los tumores malignos (De las Mulas *et al.*, 2004).

Para la medición de RP se han empleado métodos citosólicos o carbó-dextrano, el método consiste en incubar fracciones de citosol con concentraciones crecientes de hormona marcada (Lluch, 1985); sin embargo, esta técnica requiere condiciones especiales de almacenamiento y procesamiento de los tejidos que resultan ser caro, su uso no se ha introducido en la práctica clínica. (De las Mulas *et al.*, 2005).

En la actualidad con el desarrollo de anticuerpos monoclonales contra los receptores de progesterona, la técnica inmunohistoquímica (IHC) ha optimizado su desarrollo, el hallazgo de receptores sirve como factor pronóstico de recurrencias y permiten decidir conductas terapéuticas (Vilches, *et al.*, 2010). Una ventaja adicional es su uso en estudios retrospectivos (Geraldés y Garnet, 2000)

El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia RP en neoplasias mamarias canina, diagnosticadas entre los años 2006 al 2010 en el Laboratorio de Histología y Patología (LHP) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FAVEZ), de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), mediante la técnica de inmunohistoquímica, para luego determinar la asociación entre el grado de malignidad e índice mitótico (AgNOR).

MATERIALES Y MÉTODOS.

El presente estudio, de carácter retrospectivo-descriptivo, se realizó en el LHP – FAVEZ – UPCH; ubicada en el distrito de San Martín de Porres, departamento de Lima.

Selección de Muestras.

Las muestras procedieron de la base de datos del LHP-FAVEZ-UPCH entre los años 2006 – 2010, se consideró un total 31 muestras cuyo diagnóstico histopatológico fue de adenocarcinoma mamario.

Dentro de los criterios de inclusión se consideró todas las muestras que tuvieron un informe histopatológico con diagnóstico de tumor mamario y corroboradas por el personal veterinario de LHP-FAVEZ-UPCH con: tinción HE, tinción para índice mitótico (AgNOR), agrupado y rotulado según grado de malignidad del tumor mamario.

Evaluación histológica y clasificación por grado de malignidad.

Las láminas de las muestras seleccionadas fueron clasificadas por el grado de malignidad según la graduación histológica propuesta por Elston y Ellis (1991), la evaluación fue realizada por un profesional especializado, tal que no exista ningún sesgo, se recopilaron los datos del número de AgNOR encontrado de cada una de las muestras seleccionadas (Johnson, 2012).

Procedimiento del método de inmunohistoquímica para la detección de receptores de progesterona (RP).

La determinación de los RP se realizó por el método de inmunohistoquímica en cortes de parafina de las muestras seleccionadas usando Dako Envision® + System, Peroxidase-HRP (especificidad 73% y sensibilidad 91%). Se empleó el uso de anticuerpo primario monoclonal de ratón contra RP humano, que son usados de rutina en estudios para evidenciar tumores de mamas en humanos, los mismos que son usados en estudios para la detección de RP en tumores caninos (Nieto *et al.*, 2000; Illera *et al.*, 2006)

Como controles negativos se usó cortes histológicos de glándula mamaria normal y que no dieron reacción con IgG de ratón.

1. Se obtuvieron secciones de 4 micras aproximadamente de los bloques de parafina.
2. Se aplicó peróxido de hidrogeno para inactivar peroxidasa endógena incubándose por 15 minutos, y luego se aclaró con agua destilada y finalmente un baño de buffer por 5 min.
3. Posteriormente se realizó el pre-tratamiento para recuperación del epítipo empleando 1x-EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution® de pH alto (50x) durante 20 minutos a 97°C.
4. Se prosiguió con un lavado de 5 minutos con Envisión™ FLEX®.
5. Luego las secciones de tejido se sometieron a incubación con el Monoclonal Mousse Anti-Human Progesterone Receptor PgR 636 - Dako® (anticuerpo primario), por 20 minutos a temperatura ambiente, posterior y se realizó un lavado de 5 minutos con Envision™ FLEX® tampón de lavado.

6. Paso seguido las secciones de tejido se incubaron 20 minutos Dako EnVision™ FLEX/HRP PgR 636 (anticuerpo secundario) a 26°C y se realizó un lavado de 5 minutos con Envision™ FLEX® Tampón de lavado.
7. Luego se incubaron con DAB+- Dako® (sustrato cromógeno) y se lavó con buffer de lavado Dako®.
8. Las secciones de tejido no se secaron durante el tratamiento o durante todo el procedimiento.
9. Finalmente se realizó la tinción de contraste con Hematoxilina por 5 minutos, y se aclaró con agua destilada, después la lámina fue sumergida 10 veces en amonio al 0.037 mol/L y finalmente aclarada por 3 minutos en agua destilada.

Después de la tinción las secciones se deshidrataron, limpiaron y montaron, utilizando medio de montaje permanente.

Conteo de receptores de progesterona.

Las láminas, al finalizar el proceso fueron analizadas disponiendo del microscopio óptico LEICA DM LS2. Se seleccionaron 10 campos de la muestra que poseían células neoplásicas en número de 10 a más (Figura 1) (Nieto *et al.*, 2000; De las Mulas, Millán y Dios, 2005).

El conteo de los receptores de progesterona fue un procedimiento manual a aumento de 1000x (Figura 2). Se consideró los núcleos oscuros producto de la reacción, contabilizados según su distribución en 1000 células tumorales, en campos aleatorios, fueron expresados como núcleos reactivos/1000 células, Figura 1.

Análisis estadístico.

Los datos obtenidos fueron registrados en una hoja de cálculo en Microsoft Excel, y luego se procesaron por el programa MINITAB, donde se obtuvo la estadística descriptiva de todas las variables.

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA), la prueba de Duncan para RP y obtener las relaciones de grado de malignidad, adicional se realizó Coeficiente de Correlación de Pearson entre el conteo de AgNOR y RP, y el para establecer la asociación entre los datos.

RESULTADOS.

En el estudio se emplearon marcadores pronósticos tales como AgNOR y la presencia de RP. Se evaluaron un total de 31 muestras de glándula mamaria procedente de caninos hembras, de la base de datos del LHP – FAVEZ – UPCH, que cumplieron los criterios de inclusión, las mismas fueron ordenados por su grado de malignidad, predominando el grado de malignidad I.

Los RP se contabilizaron por el método de RP-p (porcentaje de RP positivos por 1000 células) Nieto *et al.* (2000); las reacciones positivas se muestran en las Figuras 2 y 3, en la cual se observó los núcleos inmunomarcados de coloración oscura donde se desarrolla la actividad biológica, (Robertson *et al.* 1992 y Veronese *et al* (1993).

Los resultados del conteo de RP dio la media de 0.3 (núcleos positivos/1000 células), el Cuadro 1 presenta el análisis descriptivo de todos los resultados para esta prueba; y el Cuadro 2 se presenta el análisis descriptivo de las muestras distribuidas por grado de malignidad.

La evaluación estadística mediante la prueba de ANOVA para el conteo de AgNOR distribuidos en los grados de malignidad (I, II, III) mostró diferencias significativas ($p=0.0228$) entre el grado III, con respecto al grado I y II. (Apéndice)

Para los valores de RP entre los grados de malignidad (I, II y III), evaluados con la prueba de ANOVA, no se encontraron diferencias significativas ($p=0.302$)

El coeficiente de correlación de Pearson mostró una correlación negativa ligera entre las variables, AgNOR y RP ($r= -0.147$), se muestra la distribución de conteo de AgNOR y RP, tanto que a mayor número de AgNOR menor es la presencia de RP. (Figura 1).

Cuadro 1. Valores de RP (núcleos positivos-RP/1000 células) en 31 muestras de canidos hembras con tumores mamarios.

Técnica empleada	Muestras (n)	Media	Mediana	Desviación estándar	Coeficiente de variación	Valores extremos	
						Mínimo	Máximo
RP¹	31	0.3	0.1	0.42	1.4	0.00	1.5

¹Núcleos positivos RP/1000 células.

Cuadro 2. Valores de RP (núcleos positivos-RP/1000 células) en 31 muestras de canidos hembras con tumores mamarios distribuidas en grados de malignidad.

Técnica empleada	Variable en estudio	Media	Desviación estándar	Valores extremos	
				Mínimo	Máximo
PR¹	Grado I	0.4	0.49	0	1.5
	Grado II	0.24	0.35	0	1.04
	Grado III	0.11	0.21	0	0.55
	Total	0.25	0.42	0	1.03

¹Núcleos positivos RP/1000 células.

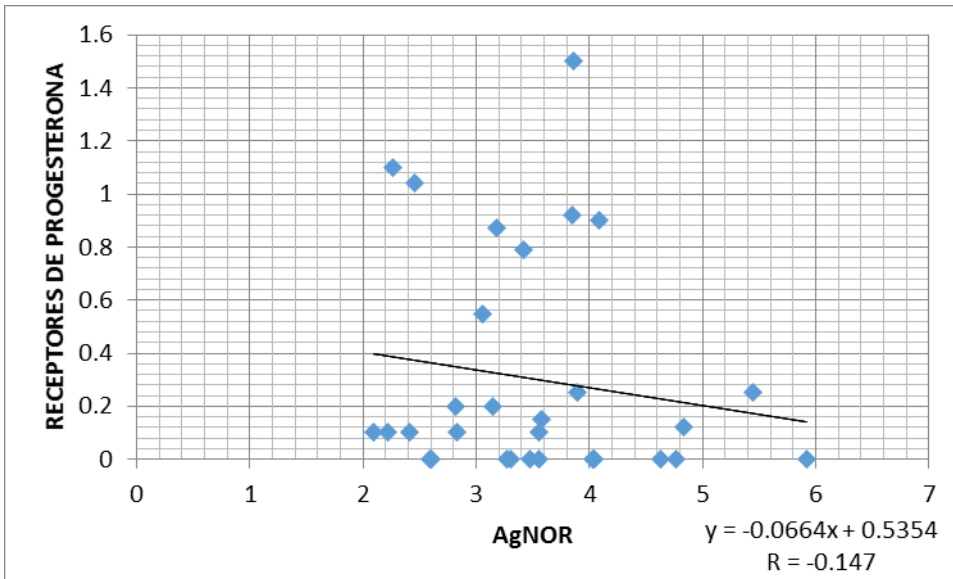


Figura 1. Tabla de distribución de los valores de conteo de AgNOR (AgNOR núcleo/100 células) y RP (Núcleos positivos-RP/1000 células) de 31 muestras, de canidos hembras con tumores mamarios clasificados en grado de malignidad.

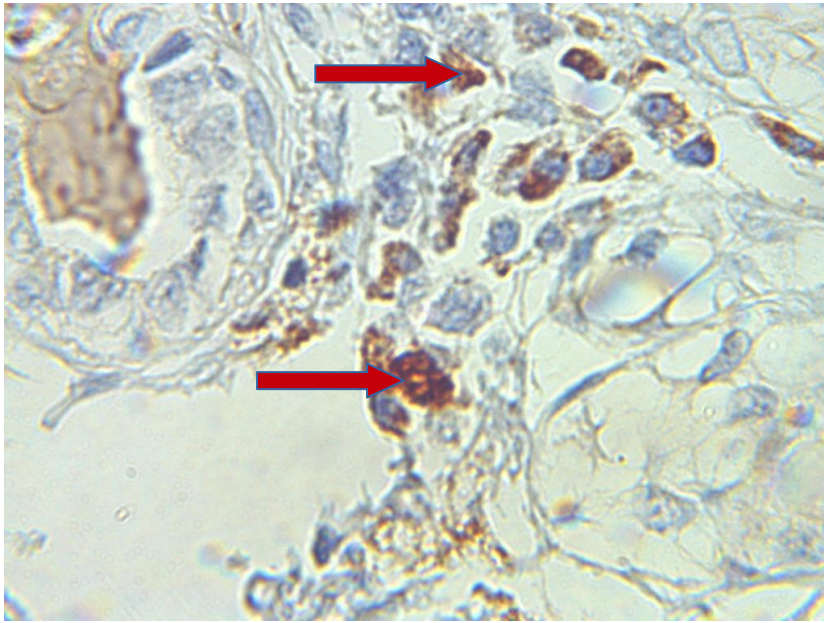


Figura 2. Células con núcleos positivos para RP obtenidas de una muestra de adenocarcinoma mamario túbulo papilar. Aumento total de 1000x.

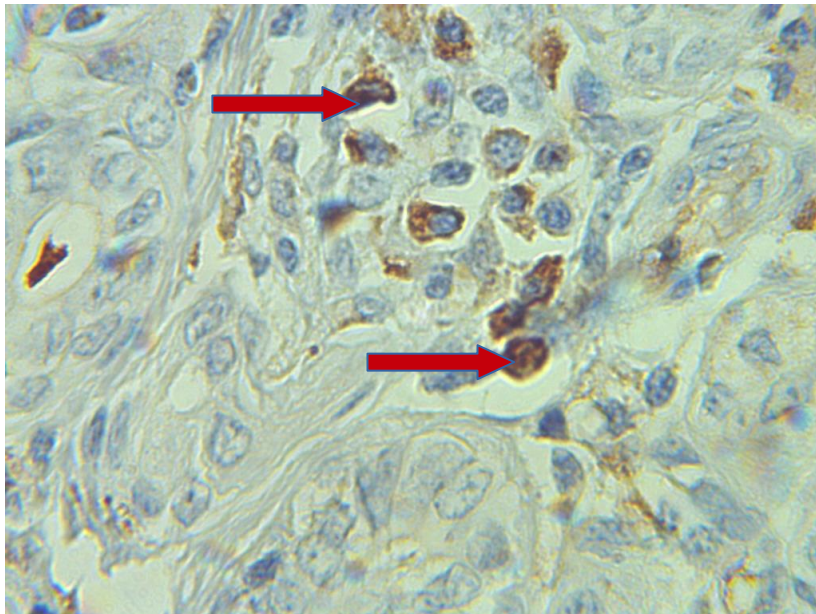


Figura 3. Células con núcleos positivos para RP obtenidas de una muestra de adenocarcinoma mamario tubular. Aumento total de 1000x.

DISCUSIÓN.

En el presente estudio al evaluar los datos de las medias del número de AgNOR en relación al grado de malignidad, no se observó diferencias significativas en los grados I y II, al considerar que sus actividades celulares fueron similares en ambos grados; a comparación con el grado III donde se observó diferencia significativa, donde el conteo de la media fue superior. Del mismo modo los resultados hallados concuerdan con reporte de Giraldo *et al.* (2003), que afirma que el número de AgNOR aumenta con el grado de malignidad.

Mendes (2006) en un estudio similar que analizó muestras de adenocarcinomas mamarios caninos donde la relación entre la cuenta promedio de AgNOR y el grado histológico fue estadísticamente significativo para cada grado, siendo mayor conforme aumentaba el grado de malignidad. Sus datos no fueron tan dispersos debido al número de muestras que utilizó (n=45) lo que hizo la evaluación más exacta. Johson (2012) evaluó las variables AgNOR y grado de malignidad encontrando una tendencia en el conteo promedio de AgNOR a medida que aumenta el grado de malignidad, su número de muestras fue menor (n=33), mostrando similitud con el presente estudio, lo que no se descarta que a mayor número de muestras facilita la obtención de diferencias significativas.

De las Mulas *et al.* (2005) evaluaron 228 muestras, y determinaron que existió una relación estadísticamente válida para el conteo de RP con el grado de malignidad, ya que todas sus muestras fueron clasificadas de acuerdo a los de diferentes tipos celulares: simples, complejos y mixtos, lo que permitió hallar un menor número de RP en tumores mamarios con mayor grado de malignidad. Esta observación demuestra que la presencia de receptores hormonales disminuye cuando el tumor progresa en malignidad descrito por Geraldés *et al.* (2015). Estos resultados difieren al presente estudio para el conteo de RP (0.3 ± 0.42) con el grado de malignidad ($=0.302$) probablemente debido a la heterogeneidad que se tuvo en los

grupos de tumores, Della (2014), reportó resultados similares a los hallados en este estudio para el conteo de RP (0.13 ± 0.30) ya que el tamaño de muestra fue de 22 animales, lo que hizo que los datos estadísticos sean más dispersos.

Por otro lado no se encontró diferencias en el número de RP entre los tumores malignos y benignos a diferencia de lo reportado de por Millanta *et al.*, (2005) y, Mariotti *et al.*, (2012); se debe tomar en cuenta que en el presente trabajo se contó con un solo tipo de corte de la neoplasia; sumado a que los autores se refieren a tejido mamario normal cuando utilizan tejido contiguo a la lesión y/o separado por una glándula no afectada; por otra parte la diferencia en los resultados pueden explicarse por el uso diferente anticuerpos primarios, las diferencias celulares en los tumores así como el número de muestras también explicaría la diferencia en los resultados.

Finalmente, en el análisis estadístico de las variables de AgNOR y RP, se muestra un grado de significancia ($p=0.022$); y el coeficiente de correlación de Pearson ($r=-0.147$), ambos poseen una relación negativa débil entre las variables, la tendencia estuvo sustentada por la pendiente que se muestra en la Figura 3, donde se evidencia que a mayor número de AgNOR núcleo (AgNOR positivos/100 células) se observa una menor cantidad de RP (núcleos positivos/1000 células).

Thuróczy *et al* (2007) evaluó 43 muestras de tumores mamarios, los resultados manifestaron relación negativa entre el porcentaje de RP y Ki 67 (marcador de proliferación celular), el cual tiene valor pronostico similar al AgNOR. Carvalho (2016) en un estudio de PCNA (Marcador proliferación celular) reportó que existe una relación positiva con la proliferación celular y el grado de malignidad del tumor.

La fuerza de correlación entre las variables AgNOR y RP fue ligeramente moderada, lo cual no se descarta la posibilidad que, al contar con mayor número de muestras se podría evidenciar una mayor fuerza de correlación.

CONCLUSIONES.

El método de IHQ es una herramienta útil para establecer pronósticos de tumores mamarios, para estudios retrospectivos y prospectivos.

Se evidenció un ligero grado de relación negativa entre el promedio de núcleos RP positivos/1000 células con el promedio de AgNOR Núcleo/100 células de los adenocarcinomas mamarios de canidos hembra estudiados.

No se encontró relación significativa entre el promedio de los núcleos RP positivos/1000 células con la clasificación por grado de malignidad, de los adenocarcinomas mamarios canidos estudiados.

Los hallazgos obtenidos ratifican que los adenocarcinomas pierden dependencia hormonal a mayor grado de malignidad.

LITERATURA CITADA.

1. UNLPAM. Universidad Nacional de la Pampa. 2005. Tumores de mama en la perra. Revista de Publicaciones Científicas 7. 5-30.
2. Araki B, Rosciani A, Merlos W, Insfran R, Maccio O. 2006. Valor pronóstico de la determinación de proteínas asociadas a Regiones Organizadas de Nucléolos (AgNOR) y su correlación con diagnósticos cito e histopatológicos de tumores de glándula mamaria canina: Informe de avance. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad Nacional de Nordeste. V-060.
3. Benjamin S, Lee A, Saunders W. 1999. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in Beagles. Vet Pathol. 423-436.
4. Carvalho M, Pires I, Prada J, Lobo L, Queiroga F. 2016. Ki-67 and PCNA expression in canine mammary tumors and adjacent nonneoplastic mammary glands: prognostic impact by a multivariate survival analysis. Vet Pathol. 1-9.
5. Cassalli D, Lavalle G, Nardi A, Ferreira E, Bertagnolli A, Estrela-Lima A, *et al.* 2011. Consensus of the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. Vet Pathol, Vol 4. 153-180.
6. De las Mulas J, Millan J, Dios R. 2005. A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor α and progesterone receptor expression and host tumor factors as predictors of disease – free period in mammary tumors of the dog. Vet Pathol 42. 200-212.

7. De las Mulas J, Ordas J, Millan Y, Chacon F, De la Lara M, Espinosa A, Jover A. 2004. Immunohistochemical expression of estrogen receptor B in normal and tumoral canine mammary glands. *Vet Pathol*, 41. 269-272.
8. Della C. 2014. Expresión de los receptores de estrógenos y de progesterona en tejido mamario normal y tumoral canino. Tesis de Maestría. Uruguay. Universidad de la Republica. 69.
9. Elston C, Ellis I. 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*. Vol 19. 10-403.
10. Gerald M, Gartner F, Schmitt F. 2000. Immunohistochemical study hormonal receptor and cell proliferation in normal canine mammary gland and spontaneous mammary tumours. *Vet Pathol*. 146. 403-406.
11. Giraldo G, Aranzazu D, Rodriguez Berardo de J, Pérez M, Ramirez M. 2003. Caracterización de las regiones organizadas nucleares coloreadas con plata (AgNOR) en tumores mamarios caninos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. Vol 16, num 1. 33-39.
12. Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R, Zappulli V. 2011. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol*. Vol 48. 117-131.
13. Gracanin A, Voorwald F, Val Wolferen E, Timmermans – Sprang E, Mol J. 2014. Marginal activity of progesterone receptor B (PR-B) in dogs but high incidence of mammary cancer. *Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Vol 144. 492-499.
14. Guill S, Stenvang J, Brunner N, Sanches-Céspedes R, Milla Y, Gómez-Laguna J, De las Mulas M. 2014. Progesterone receptor isoform analysis by quantitative Real-

Time Polymerase Chain in formalin-fixed, paraffin-embedded canine mammary dysplasias and tumors. *Vet Pathol.* 1-8.

15. Johnson S. 2012 Determinación del grado de malignidad de adenocarcinoma mamarios caninos mediante la técnica de AgNOR en muestras del Laboratorio de Histología y Patología FAVEZ – UPCH entre los años 2003 a 2010. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia. 30 p.
16. Lluch A. 1985. Receptores de estrógeno y progesterona en cáncer de mama. Tesis de Doctor en Medicina. Valencia. Universidad de Valencia España. 275 p.
17. Mariotti F, Giacomo R, Subeide M. 2013. Immunohistochemical evaluation of ovarian hormonal receptors in canine mammary tumors. *Vet. Med.* 3. 104-110.
18. Mendes T. 2006. Avaliação comparativa de dois sistemas de classificação histológica e da validade da quantificação da AgNOR para adenomas e carcinomas mamarios caninos. Tesis para Maestría en Patología Animal. Pelotas. Universidades Federal de Pelotas. 67p.
19. Millanta F, Calandrella M, Bari G, Niccolini M, Vannozzi I, Poli A. 2005. Comparison of steroid receptor expression in normal dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Rev. Vet. Sci.* 7. 225-232.
20. Nieto A, Peña L, Perez-Alenza, Sanchez M, Flores J, Castano M. 2000 Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet Pathol Online.* Vol 37. 47-239.
21. Ochoa-Amaya J, Pedraza-Castillo L, Ciuderis-Aponte. 2009. Carcinoma complejo de glándula mamaria, acantoma queratinizante infundibular y matocitoma tipo III en un canino. *Rev. Córdoba.* Vol 14. 1844-1855.

22. Rao N, Van Wolferen M, Gracanin A, Batthi S, Krol M, Holstege S. *et al.* 2009. Gene expression profiles of progestin-induced canine mammary hyperplasia and spontaneous mammary tumors. *Jo physiol Pharmac.* Vol 1. 73-84.
23. Robertson J, Bates K, Pearson D, Blamey R, Nicholson R. 1992. Comparasion of two oestrogen receptor assays in the prediction of the clinical course of patients with advanced breast cancer. *Br J Cancer.* 65. 727.
24. Russo I, Russo J. 1998. Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *Biol Neoplasia.* Vol 3, Num 1, 49-61.
25. Rutteman G, Misdorp W, Blankenstein M, Van der Brom W. 1988. Oestrogen (ER) and progestin receptor (PR) in mammary tissue of the female dog: different receptor profile in non-malignant and malignant state. *Br. J. Cancer.* Vol 58. 594-599.
26. Sorenmo K. 2003. Canine mammary gland tumors. *Vet. Clinic. Small Anim.* Vol 33. 573-596.
27. Thuroczy J, Reisvaag J, Perge E, Tibold A, Szilagyí J, Balogh L. 2007. Immunohistochemical detection of progesterone and cellular proliferation in canine mammary tumours. *J. Comp. Path.* 137. 122-129.
28. Veronese S, Gambacorta M, Gottardi O, Scanzi F, Ferrari M, Lampertico P. 1993. Proliferation index as a prognostic marker in breast cáncer. *Cancer.* 71 (12).3926.
29. Vidales G, Mocha P. 2007 Tumores mamarios en caninos: Adenocarcinoma complejo de la glándula mamaria con metástasis a ganglio linfático regional. *Revista Orinoquia.* Vol 11, num 1. 99-110.
30. Vilches N, Barboza O, Garza R, Ancer J, Flore JP. 2010. Aplicaciones prácticas de la inmunohistoquímica en la patología de la glándula mamaria. *Rev. Latin. Pat.* 48. 203-194.

APENDICE.

El conteo de AgNOR (AgNOR núcleo/100 células) el análisis descriptivo se consignan en el Cuadro 3 de las muestras distribuidas de acuerdo al grado de malignidad I (evidencia de menos anomalías tisulares y celulares), II (presencia da anomalías tisulares y celulares considerables) y III (las anomalías tisulares y celulares están en mayor proporción), Johnson (2012).

Cuadro 3. Valores de AgNOR (AgNOR núcleo/100 células)

Técnica empleada	Variable en estudio	Media	Desviación estándar	Valores extremos	
				Mínimo	Máximo
AgNOR ¹	Grado I	3.26 ^a	0.66	2.10	5.91
	Grado II	3.32 ^a	0.85	2.10	3.86
	Grado III	4.35 ^b	1.20	2.22	6.57
	Total	3.52	0.93	2.61	3.72

Fuente: Jonhson (2012)

Núcleos positivos AgNOR/100 células.

^{a,b} Letras diferente indican diferencias significativas.