

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIAS

AGROPECUARIAS



CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

"Evaluación pronóstica de la reacción inmunohistoquímica del Ki-67 en neoplasias mamarias de caninos (*Canis lupus familiaris*)"

DOCUMENTO FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MÉDICO VETERINARIO

AUTOR:

Rivera Lascano Daysi Nayeli

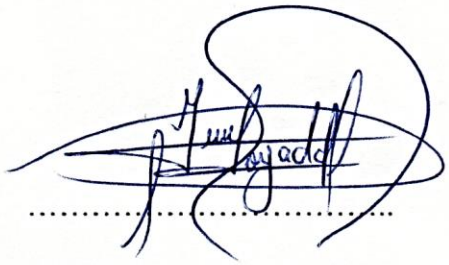
TUTOR:

MVZ. Jenny Lozada. Msc

CEVALLOS, 2024

"Evaluación pronóstica de la reacción inmunohistoquímica del Ki-67 en neoplasias mamarias de caninos (*Canis lupus familiaris*)"

REVISADO Y APROBADO POR:



.....

MVZ. Jenny Lozada. Msc

TUTOR

APROBADO POR LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO:

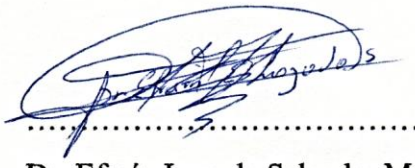
FECHA



....08/08/2024..

Ing. Patricio Núñez. PhD

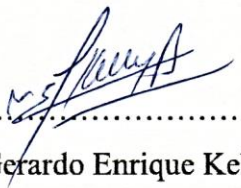
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN



....08/08/2024..

Dr. Efraín Lozada Salcedo. Mg

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN



..... 08/08/2024.

Dr. Gerardo Enrique Kelly Alvear. Mg

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

AUTORIA DE LA INVESTIGACIÓN

El suscrito, **DAYSI NAYELI RIVERA LASCANO**, portador de cédula de ciudadanía número: **1804991717**, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: "**Evaluación pronóstica de la reacción inmunohistoquímica del Ki-67 en neoplasias mamarias de caninos (*Canis lupus familiaris*)**" es original, auténtico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.



DAYSI NAYELI RIVERA LASCANO

DERECHO DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado "**Evaluación pronóstica de la reacción inmunohistoquímica del Ki-67 en neoplasias mamarias de caninos (*Canis lupus familiaris*)"** como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Médico Veterinario, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.



DAYSI NAYELI RIVERA LASCANO

DEDICATORIA

A Dios, por darme la vida e iluminarme en cada paso que doy, además de la oportunidad de estudiar esta maravillosa carrera que me ha permitido conocer a grandes personas quienes me han acompañado en este extraordinario camino.

A mis padres que siempre me guiaron con su amor, comprensión y buen ejemplo, quienes se sacrificaron por el bienestar y crecimiento de mi hermano y el mío.

A mi hermano, con quien he compartido mi infancia y adolescencia con experiencias y sueños por mejorar cada día y retribuir el esfuerzo que han realizado nuestros padres por nosotros.

A Lizandro, con quien he compartido muchos momentos en este camino universitario, por su apoyo y su amor incondicional en este proceso.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mi familia, por el tiempo y apoyo que supieron brindarme en esta etapa.

A mis padres, Vicente y Carmen, quienes siempre han estado apoyándome en cada paso de mi vida estudiantil, siendo el mejor ejemplo que he podido tener. Papá, siempre has sido y serás mi mayor ejemplo de lucha, esfuerzo y dedicación. Mamá, gracias por ayudarme a no darme por vencida y entender que todo en la vida se puede lograr.

A mi hermano Dennis, por motivarme a dar siempre lo mejor de mí.

A Lizandro, que me ha acompañado en todo momento en este largo proceso, dándome motivación y ánimos para continuar esforzándome para cumplir mis sueños.

Al Dr. Christian Córdova, quien se ha convertido en un amigo y compañero, fuente de sabiduría, calma y consejo en todo momento, gracias por brindarme su conocimiento, paciencia y respeto incondicional.

Quiero agradecer a todos mis profesores de la Universidad Técnica de Ambato por guiarme sabiamente a lo largo de mi carrera, en especial a la MVZ. Jenny Lozada. Msc por brindarme sus conocimientos, amistad y respeto, además de ayudarme a desarrollar y culminar mi tesis. Gracias por su apoyo y tiempo brindado.

ÍNDICE GENERAL

AUTORIA DE LA INVESTIGACIÓN iii

DERECHO DE AUTOR iv

DEDICATORIA v

AGRADECIMIENTO vi

ÍNDICE GENERAL vii

ÍNDICE DE TABLAS x

ÍNDICE DE FIGURAS xi

RESUMEN xii

ABSTRACT xiii

CAPÍTULO I 14

INTRODUCCIÓN 14

MARCO TEÓRICO 17

1.1. Antecedentes Investigativos 17

1.2. Categorías Fundamentales 19

1.2.1. Neoplasia mamaria 19

1.2.2. Etiología de las neoplasias mamarias 20

1.2.3. Carcinogénesis 22

1.2.4. Carcinomas mamarios 25

1.2.5. Clasificación de neoplasias mamarias malignas en caninos 25

1.2.6. Grado histológico de malignidad 27

1.2.7. Marcadores tumorales 28

1.2.8. Actividad biológica de la proteína Ki-67 29

1.2.9. Anticuerpo MIB-1 30

1.2.10. Fases del crecimiento celular 31

1.3. Objetivos **32**
1.3.1. Objetivo general: **32**
1.3.2. Objetivos específicos: **32**

CAPÍTULO II **33**

METODOLOGÍA **33**

2.1. Ubicación del estudio **33**

2.2. Caracterización del lugar **33**

2.3. Equipos y materiales **33**
2.3.1. Equipos **33**
2.3.2. Materiales **33**
2.3.3. Material de Oficina **34**

2.4. Factores de Estudio: **35**
2.4.1. Factor 1: Grado histológico de malignidad **35**
2.4.2. Factor 2: Presencia de antígeno Ki-67 ..... **35**

2.5. Manejo del experimento **35**
2.5.1. Procesado de muestras para histopatología **36**
2.5.2 Procesado de muestras para inmunohistoquímica **36**

2.6. Tamaño de la muestra **38**

2.7. Variables respuestas **38**
2.7.1. Estudio histopatológico **38**
2.7.2. Estudio inmunohistoquímico **40**

2.8. Diseño experimental **42**

CAPÍTULO III **43**

RESULTADOS Y DISCUSIÓN **43**

3.1. Grado de malignidad según el estudio histopatológico **43**

3.2. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 ..... **45**

3.3. Relación entre el valor de Ki-67 y el grado histológico de malignidad. **47**

3.4. Comprobación de hipótesis 52

CAPÍTULO IV 53

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 53

4.1. CONCLUSIONES 53

4.2. RECOMENDACIONES 54

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 55

ANEXOS 66

ANEXO A 66

ANEXO B 67

ANEXO C 68

ANEXO D 69

ANEXO E 70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 *Clasificación histopatológica de Neoplasias Mamarias según Goldschmidt et al. (2011)* **23**

Tabla 2 *Criterios utilizados para la clasificación histológica de malignidad en carcinomas mamarios caninos* **39**

Tabla 3 *Grado del tumor según la puntuación histológica* **40**

Tabla 4 *Número de pacientes caninas distribuidas según el grado histopatológico de malignidad* **43**

Tabla 5 *Número de pacientes clasificados por índice de proliferación y graduación de Ki-67 en 20 pacientes caninas* **45**

Tabla 6 *Número de casos clasificados por el índice de proliferación de Ki-67 y* grados *de malignidad de las neoplasias mamarias en 20 pacientes caninas.* **47**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. *Clasificación según el grado histológico de malignidad en carcinomas mamarios caninos.* **45**

Figura 2. *Determinación inmunohistoquímica de Ki-67 en carcinomas mamarios caninos*…. ..... **....47**

Figura 3. *Frecuencia (%) de pacientes caninas distribuidas según la edad, tamaño tumoral y condición reproductiva con su predisposición a padecer carcinomas mamarios*..... **51**

RESUMEN

El presente estudio fue diseñado para determinar el valor pronóstico que tiene el índice de proliferación Ki-67 en neoplasias mamarias caninas y su relación con el grado histológico de malignidad. El estudio retrospectivo se realizó en los Laboratorios de la Universidad Técnica de Ambato, con 20 muestras tumorales obtenidas mediante biopsias incisional y excisional de pacientes hembras caninas que asistieron al Centro Veterinario, enmarcadas desde mayo 2023 – mayo 2024. De las veinte muestras, el 75% se obtuvieron de hembras enteras y el 25% de hembras esterilizadas. Las neoplasias se clasificaron de acuerdo con su grado histopatológico de malignidad y se comparó con un estudio inmunohistoquímico que incluyó un conteo celular para conocer el índice de proliferación Ki-67. Todos los casos evaluados fueron neoplasias malignas, la graduación histopatológica mostró la siguiente distribución: 55% grado I (11T), 40% grado II (8T), 5% grado III (1T). En cuanto al índice de proliferación Ki-67, se utilizó el anticuerpo MIB-1 que ha demostrado ser uno de los más utilizados con este antígeno debido a su alta especificidad, el resultado se expresó como porcentaje de células positivas: en una escala del 1-9% entraron 10 pacientes correspondiendo al 50%, de 10-30% estaban 9 pacientes que representan el 45% y >30%, 1 paciente que representa el 5%. Al relacionar el índice de proliferación Ki-67 con el grado histológico de malignidad, se obtuvo una respuesta estadísticamente significativa (P=0,0078) lo que indica que a mayor grado histopatológico mayor es el índice de Ki-67. Esos resultados sugieren que, al realizar un estudio histopatológico, se debe complementar con un estudio inmunohistoquímico de Ki-67 para tener un mejor diagnóstico y conocer el pronóstico de cada paciente para poder aplicar un tratamiento apropiado.

Palabras clave: Ki-67, grado histopatológico, MIB-1, proliferación celular, pronóstico

ABSTRACT

The present study was designed to determine the prognostic value of the Ki-67 proliferation index in canine mammary neoplasms and its relationship with the histological degree of malignancy. The retrospective study was carried out at the Laboratories of the Technical University of Ambato, with 20 tumor samples obtained by incisional and excisional biopsies from female canine patients who attended the Veterinary Center, framed from May 2023 - May 2024. Of the twenty samples, 75% were obtained from entire females and 25% from sterilized females. The neoplasms were classified according to their histopathological degree of malignancy and compared with an immunohistochemical study that included a cell count to determine the Ki-67 proliferation index. All cases evaluated were malignant neoplasms, the histopathological grading showed the following distribution: 55% grade I (11T), 40% grade II (8T), 5% grade III (1T). Regarding the Ki-67 proliferation index, the MIB-1 antibody was used, which has proven to be one of the most used with this antigen due to its high specificity, the result was expressed as a percentage of positive cells: on a scale of 1-9%, 10 patients entered corresponding to 50%, from 10-30% there were 9 patients representing 45% and >30%, 1 patient representing 5%. When relating the Ki-67 proliferation index with the histological grade of malignancy, a statistically significant response was obtained (P = 0.0078) which indicates that the higher the histopathological grade, the higher the Ki-67 index. These results suggest that, when performing a histopathological study, it should be complemented with an immunohistochemical study of Ki-67 to have a better diagnosis and to know the prognosis of each patient to apply an appropriate treatment.

Keywords: Ki-67, histopathological grade, MIB-1, cell proliferation, prognostic

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, las neoplasias mamarias caninas representan el segundo tipo de tumor más presentado después de los neoplasias de piel, sin embargo, en hembras caninas de edad avanzada ocupan el primer lugar **(Aman, 2021)**, por este motivo, tienen una gran relevancia en la casuística de las clínicas veterinarias. Las neoplasias mamarias tienen una etiopatogenia multifactorial y generalmente su desarrollo está ligado la secreción hormonal, siendo parte de un amplio espectro de variantes, pueden ser de tipo benigno o maligno, siendo estos últimos acompañados de metástasis y un mal pronóstico **(Casas, 2023; Morales, 2014)**. En medicina veterinaria, los casos de enfermedades neoplásicas han ido incrementando, en especial carcinomas mamarios, por lo cual se debería poner énfasis en un estudio más profundo sobre oncología veterinaria, tomando en cuenta todos los métodos de diagnóstico para poder identificar a tiempo el problema y poder realizar un tratamiento oportuno **(Zapata y Gallardo, 2024)**.

La prevalencia de neoplasias mamarias varía según la región en estudio, por ejemplo, en un estudio retrospectivo realizado en Perú, mediante la recopilación de protocolos y evaluaciones de láminas histopatológicas, teniendo en cuenta algunas variables clínicas sobre ´´Frecuencia de neoplasias en glándula mamaria de caninos diagnosticadas histopatológicamente en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, periodo 2007- 2016´´, se obtuvieron los datos de que las hembras son mayormente afectadas en un 98%, los mestizos los más vulnerables con un 32% y que los perros con más de 10 años son los más propensos a sufrir de estas enfermedades **(Lipa et al., 2019)**. Un artículo de revisión que tiene el tema ´´ Canine Mammary Tumours, an Overview´´, describe la incidencia de tumores mamarios caninos según la revisión de varios registros internacionales, en el que se menciona que en Estados Unidos, se encontró que el 40% de neoplasias que presentan las perras son de tipo mamario, esto puede variar de acuerdo con la región de muestreo ya que depende de la esterilización de las hembras caninas a temprana edad, al comparar estos datos con estudios en España y Escandinavia, la incidencia es mucho mayor debido a que la esterilización en perras es muy escaza **(Sleeckx et al., 2011)**.

Un aspecto clave es el microambiente tumoral, conformado por vasos sanguíneos, células normales y moléculas que los rodean y se encargan de alimentar a la neoplasia, de estos factores depende su crecimiento y diseminación **(Sanz et al., 2021)**. Cuando existe una alta tasa de proliferación se puede predecir un mal pronóstico en muchos tipos de malignidades **(Urruticoechea et al., 2005)**, este se puede evaluar mediante diversos métodos, los más utilizados son la medición por citometría de flujo de la fracción de fase S (SPF) y tinción inmunohistoquímica del antígeno de proliferación Ki-67 **(García et al., 2003)**. La inmunohistoquímica ha sido utilizada para subclasificar las neoplasias mamarias en varias categorías a través del uso de marcadores. La proteína nuclear Ki-67 (pKi-67) se utiliza para reconocer células de proliferación en ensayos inmunohistoquímicos, esta proteína reconoce un marcador celular nuclear presente en todas las fases activas del ciclo celular (intervalo 1: G1; síntesis de ADN: S; intervalo 2: G2 y mitosis: M) expresada exclusivamente en células de proliferación. Es necesario mencionar que este receptor no se expresa en fase G0, en donde se encuentran las células en reposo o quiescentes, lo que permite que sea usado como un marcador estandarizado de proliferación celular importante para el diagnóstico y pronóstico del paciente **(Silva et al., 2021)**.

Por otro lado, las neoplasias mamarias constituyen una enfermedad muy compleja y heterogénea, desde el punto de vista clínico como morfológico, dado a que presentan diferencias a nivel genético, transcriptómico y proteómico, lo que resulta en tumores con distinto comportamiento biológico. Además del cálculo del índice de proliferación celular y de la estadificación de las neoplasias, existen otras características patológicas que influyen de manera directa en la agresividad tumoral, una de ellas es el grado histológico, mismo que se basa en describir que tan diferenciado se encuentra el tumor. **Goldschmidt et al., (2011)** publicaron una clasificación histológica revisada de tumores mamarios caninos basada en los criterios de la Organización Mundial de la Salud publicados en 1999, mismos que han sido usados por patólogos veterinarios durante casi dos décadas. En la actualidad se sigue utilizando el método, que evalúa las lesiones de acuerdo con porcentaje de formación tubular, presencia de pleomorfismo nuclear y el índice mitótico, dividiéndolas en grado I (bien diferenciado), grado II (moderadamente diferenciado) y grado III (poco diferenciado).

Con respecto a lo descrito anteriormente, el carcinoma mamario canino es uno de los tipos neoplásicos más presentados en caninos de sexo hembra **(Seung et al., 2021)**. Debido a su alta frecuencia de presentación y escasos reportes en el Ecuador, se decide tomar este tipo de neoplasia como estudio de investigación retrospectiva, evaluando el grado histológico, el índice de proliferación y otros factores como el tamaño del tumor, que al parecer tienen un papel importante al momento de determinar o aproximar la malignidad de este tipo tumoral. El objetivo principal de esta investigación es evaluar la importancia pronóstica de la reacción inmunohistoquímica de Ki-67 en neoplasias mamarias de caninos y compararla con el grado histopatológico de malignidad.

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

Con el paso del tiempo, el perro (*Canis lupus familiaris*), ha sido considerado como parte de la familia, y hoy en día, los propietarios ponen más énfasis en el cuidado de su salud. Las neoplasias en los caninos son muy frecuentes, y son de gran cuidado, dado que, si no tienen el tratamiento adecuado, estos pueden terminar con la vida de los pacientes. A pesar de que en los últimos años se han implementado nuevas terapias y métodos de diagnóstico eficaces, los tumores mamarios malignos siguen siendo un desafío para la especie canina a nivel mundial **(Sánchez y Guarín, 2014)**.

Según **Bergman (2017)** usualmente se genera la confusión en el diagnóstico de tumores mamarios, debido a que muchos médicos veterinarios, diagnostican este problema sin haber realizado exámenes previos y sin tomar en cuenta los diagnósticos diferenciales. Las neoplasias aparecen en distintas partes del cuerpo, sin importar, la edad, raza, fertilidad o sexo del animal. **Peñafiel (2022)** plantea que el 5% de los tumores resultan ser hereditarios y el 95% restante son de aparición espontánea y generan daño primario en el ADN celular. Estudios demuestran que el cáncer es una de las enfermedades comunes en animales de compañía con un 15%-30% en perros y 26% en gatos **(Diessler, 2009)**. Los tumores de la glándula mamaria pueden ser de tipo benigno o maligno, y son más frecuentes pacientes canino hembras, con mayor prevalencia en perras no esterilizadas **(Torres y Eslava, 2007)**.

En el Ecuador, se realizó un estudio epidemiológico descriptivo en 13573 historias clínicas, en el que se indica que las neoplasias en pacientes caninos tienen una prevalencia de 4,94%, de los cuales los tumores mamarios son los terceros más frecuentes (14,3%), siendo los segundos los tumores presentes en la piel y anexos (24,4%) y en primer lugar se encuentran los tumores de tejidos blandos (39,3%). Este análisis también demostró que un perro mayor a 4 años, de raza pura, tiene un 50-70% más probabilidades de presentar neoplasias que un canino mestizo, además de que los

tumores mamarios son más frecuentes en hembras que en machos caninos **(Vinueza et al., 2017)**. Según **Sleeckx et al. (2011)** los tumores mamarios de tipo maligno se generan a partir de neoplasias benignas preexistentes, y mediante histología se ha logrado conocer que existe una correlación directa entre el desarrollo de la malignidad de un tumor con su aumento de tamaño, además menciona que el 50% de las neoplasias son de carácter maligno de las cuales la mayoría suelen ser carcinomas y un porcentaje menor a 5% son sarcomas.

En una investigación **Peña et al. (1998)** utiliza 96 perras entre 5-13 años con tumores mamarios espontáneos primarios no metastatizados y displasias, en donde mide los índices de proliferación utilizando la inmunohistoquímica de Ki-67 y el antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA). La inmunotinción la realizó utilizando los anticuerpos monoclonales MIB-1 para Ki-67 y PC10 para PCNA, mismos que el autor menciona se obtuvieron buenos resultados. Como resultado de este estudio se obtuvo que existió los índices de proliferación bajos se expresaron en los tumores de bajo grado, y displasias, en cambio este índice fue alto en los tumores malignos. Los valores elevados de Ki-67 se correlacionaron de forma positiva con metástasis, muerte por neoplasia, baja tasa de supervivencia, en cambio PCNA no mostró asociación significativa con estas variables. Este análisis indica que Ki-67 si tiene un valor pronóstico en tumores mamarios caninos.

Kadthur et al. (2011) realizó un estudio en 71 muestras de tumores mamarios en caninos para determinar el valor pronóstico del antígeno de proliferación Ki-67. Las secciones histológicas fueron teñidas con el anticuerpo monoclonal Ki-67 (MIB-1). Entre los 71 tumores malignos analizados, se pudo notar que el índice Ki-67 más alto se observó en el carcinoma de células escamosas, además, este índice con respecto a la estadificación histológica reveló el recuento más alto en el estadio II (puede deberse a una mayor cantidad de células de proliferación), seguido del estadio I y el estadio 0. Hay que mencionar que existió una correlación positiva entre valores altos de Ki-67 y metástasis, muerte por neoplasia, baja tasa de supervivencia libre de enfermedad y baja tasa de supervivencia general. Se pudo identificar que la mayor expresión del Ki-67 fue en los perros que murieron durante el seguimiento. Como resultado del estudio, se

menciona que el índice Ki-67 se correlaciona de manera significativa con la muerte postquirúrgica relacionada con tumores mamarios caninos, se puede predecir que los perros con un valor bajo en el índice Ki-67 tendrán un pronóstico más favorable, esto demuestra que Ki-67 puede ser un marcador utilizado para indicar el pronóstico de pacientes caninos con tumores mamarios.

En un estudio realizado por **Zuccari et al. (2008)** en donde se analizaron 73 muestras histopatológicas de tumores mamarios caninos de pacientes entre 2 y 17 años, se investigó la expresión de e-cadherina y la proliferación celular (Ki-67) para correlacionar los resultados inmunohistoquímicos con las características clínicas e histopatológicas del paciente. El análisis estadístico de E-cadherina mostró que no existía correlación significativa entre su expresión y metástasis, supervivencia o intervalo libre de enfermedad; en cuanto se refiere a Ki-67, se pudo confirmar que un alto nivel de este indicador se expresa en los tumores malignos o carcinomas. Esto demuestra que la baja expresión de e-cadherina y la alta expresión de Ki-67, está directamente relacionada con un mal pronóstico. El autor afirma que un diagnóstico inmunohistoquímico de tumores mediante marcadores combinados con parámetros clínico-patológicos nos permitirán realizar una mejor valoración pronóstica, de esta forma llegar a tener una mejor respuesta clínica del paciente.

1.2. Categorías Fundamentales

1.2.1. Neoplasia mamaria

Neoplasia, ‘’nuevo crecimiento´´. Masa de tejido generada como consecuencia de la división descontrolada y anormal de células, como resultado existe la acumulación y selección secuencial de cambios genéticos y epigenéticos que permiten a estas células sobrevivir, multiplicarse y evadir los mecanismos reguladores de apoptosis, proliferación y del ciclo celular **(Asqui, 2017)**. Las neoplasias mamarias representan uno de los problemas principales en la medicina veterinaria, siendo el tipo de tumor más frecuente presente en perras que no han sido esterilizadas. El estudio de estas neoplasias es importante debido a que se estima que el 50% de los tumores mamarios

son de carácter maligno, mismos que tienen la capacidad de realizar una recidiva local y una metástasis a distancia **(Zapata y Gallardo, 2024)**.

La glándula mamaria es un órgano que tiene varias conexiones de vasos sanguíneos y linfáticos entre las cadenas mamarias derecha e izquierda, así como también en glándulas mamarias homolaterales adyacentes, lo cual hace que exista una alta incidencia de más de una glándula mamaria afectada cuando se presenta algún tumor mamario. Las glándulas mamarias que se ven afectadas por neoplasias en la mayoría de los pacientes son las inguinales **(Febres, 2023)**.

Las neoplasias mamarias pueden ser benignas o malignas. Los tumores de tipo maligno comúnmente se adhieren a tejidos profundos de la piel y generan una metástasis en los nodos linfáticos axilares o inguinales (regional) o en pulmones y huesos (a distancia), los más frecuentes en caninos son los carcinomas de origen epitelial, con menor incidencia los sarcomas, de origen mesenquimático, seguidos por los tumores mixtos malignos **(Brisotto, 2022)**. Según **Lecaros (2019)**, las células malignas tienen ciertas características que las diferencian de las células normales:

- Proliferación incontrolada de células
- Problemas en la etapa de diferenciación celular
- Cambios en la adherencia y comunicación celular

1.2.2. Etiología de las neoplasias mamarias

La edad representa un factor importante en la presentación de tumores mamarios, algunos estudios demuestran que los animales de mediana edad y geriátricos (8-10 años) son los más predisponentes, además, también se dice que hay una relación directa entre la edad del canino y su tipo maligno o benigno, siendo así que las neoplasias malignas se presentan en una edad media de 9,5 años, mientras que las neoplasias malignas corresponden a los 8,5 años promedio, además, estos estudios

muestran que los tumores en perros con menos de 5 años son muy poco frecuentes **(Sleeckx et al., 2011; Sorenmo et al., 2011)**.

Existen hormonas que influyen en el origen neoplásico en caninos, las principales son estrógenos y progesterona, mismas que son sintetizadas por los ovarios en las perras, de forma fisiología estimulan el crecimiento mamario, es decir estas hormonas actúan como mitógenos, razón por la cual predisponen al animal a generar anormalidades genéticas que crean el crecimiento tumoral **(Sleeckx et al., 2011)**.

Algunos estudios demuestran la influencia de la raza en el desarrollo de los tumores mamarios, como indica **Brisotto (2022)** en su investigación que las razas puras que tienen mayor predisposición son: Caniche, Poodle, Cocker Spaniel, Teckels, Pastor Alemán y Yorkshire Terrier, en estas razas se encontró la presencia del gen p53, mismo que se encarga de codificar una proteína importante que regula la replicación del ADN, proliferación y apoptosis celular, impidiendo la propagación de las células dañadas genéticamente, por ello, en las células que presentan mutaciones de dicho gen, el ADN no podrá ser reparado ni generarse la muerte programada, generando de esta forma células neoplásicas.

Otro elemento muy importante para considerar es la alimentación, el consumo excesivo de grasa es un factor crucial en la predisposición a generar tumores mamarios, esto se explica porque en los pacientes con neoplasias mamarias se han registrado alnos niveles de estrógeno sérico en comparación con perras que se alimentan con bajas dietas en grasa. Además, al aumentar el consumo de alimentos con altos niveles de grasa, se elevan los niveles de hormonas sexuales, producto de ello hay una inhibición de supresores tumorales, cuando sube el colesterol se incrementa el nivel de estrógenos **(Sorenmo et al., 2011).**

1.2.3. Carcinogénesis

Este término hace referencia al proceso mediante el cual una célula con características normales se transforma en una célula de tipo maligno por acción de varias mutaciones genéticas, generando tumores en un tejido normal in vivo **(Vezzani et al., 2022)**. Para que se inicie una neoplasia, debe existir un estímulo primario, físico, químico o biológico, lo que hace que la célula cambie su ADN y se genere una anormalidad. Los tumores de tipo maligno van evolucionando en etapas, la primera es una hiperplasia celular, posteriormente hay una tumoración de tipo benigno, misma que posteriormente aumenta su tamaño y se vuelve maligna. Según **Aman (2021)** y **Pajoy (2022)** el proceso de carcinogénesis tiene lugar en 3 etapas: iniciación, promoción y progresión; en la iniciación, la célula sufre cambios genéticos en donde hay una mutación del ADN nuclear, lo que le confiere cambios en el crecimiento y capacidades superiores de supervivencia con respecto a las demás células; en la promoción se agrupa una serie de mutaciones que genera nuevos grupos celulares anómalos (clones), mismos que compiten con células vecinas, haciendo que la masa se vuelva visible con el paso del tiempo, siendo así la generación de una neoplasia benigna o in situ cuando se trata de neoplasias malignas; en la progresión, las células ‘’clones’’ siguen mutando, creciendo y proliferando, el organismo no tiene el control, por ello son capaces de invadir y destruir el tejido circundante, además de que si son de tipo maligno, van a generar una metástasis. El método que se ha utilizado actualmente para un diagnóstico definitivo de neoplasia mamaria es el examen histológico de una biopsia excisional, teniendo en cuenta parámetros para la clasificación. La clasificación aceptada más reciente es la de **Goldschmidt et al. (2011)** en la que se incluyen nuevos subtipos histológicos.

Tabla 1

Clasificación histopatológica de Neoplasias Mamarias según ***Goldschmidt et al. (2011)***

Neoplasias epiteliales malignas	Carcinoma in situ Carcinoma simple a. Tubular b. Tubulopapilar c. Quístico-papilar d. Cribiforme Carcinoma micropapilar invasivo Carcinoma sólido Comedocarcinoma Carcinoma anaplásico Carcinoma que surge en un adenoma complejo/tumor mixto Carcinoma de tipo complejo Carcinoma y mioepitelioma maligno. Carcinoma de tipo mixto Carcinoma ductal Carcinoma papilar intraductal
Neoplasias epiteliales malignas: tipos especiales	Carcinoma de células escamosas Carcinoma adenoescamoso Carcinoma mucinoso Carcinoma rico en lípidos (secretor) Carcinomas de células fusiformes Mioepitelioma maligno Carcinoma de células escamosas Carcinoma: variante de células fusiformes Carcinoma inflamatorio
	Osteosarcoma

Neoplasias mesenquimales malignas: sarcomas	Condrosarcoma Fibrosarcoma Hemangiosarcoma Otros sarcomas
Carcinosarcoma	Tumor mamario mixto maligno
Neoplasias benignas	Adenoma simple Adenoma papilar intraductal (papiloma ductal) Adenoma ductal (adenoma basaloide) Con diferenciación escamosa (gránulos queratohialinos) Fibroadenoma Mioepitelioma Adenoma complejo Tumor mixto benigno
Hiperplasia/Displasia	Ectasia del conducto Hiperplasia lobulillar (adenosis) Regular a. Con actividad secretora (lactancia) b. Con fibrosis – tejido conectivo fibroso interlobulillar c. Con atipia Epiteliosis Papilomatosis Cambio fibroadenomatoso Ginecomastia
Neoplasia del pezón	Adenoma Carcinoma Carcinoma con infiltración epidérmica
Hiperplasia/Displasia del Pezón	Melanosis de la piel del pezón

Tomado de **Goldschmidt et al. (2011)**

1.2.4. Carcinomas mamarios

Son neoplasias malignas originarias de células epiteliales o tejido glandular. Estos tumores aparecen a partir de células que forman el revestimiento interno de las glándulas de secreción externa, mismas que tienen la función de sintetizar y segregar productos que se crean en la luz glandular **(Velandia, 2014).**

1.2.5. Clasificación de neoplasias mamarias malignas en caninos

Neoplasias epiteliales malignas

- **Carcinoma in situ:** hay nódulos bien delimitados, células agrupadas dispuestas en túbulos irregulares que no se han extendido a través de la membrana basal, existe una pérdida de la arquitectura normal y de polaridad celular.
- **Carcinomas simples:** neoplasia con un solo tipo celular, similar a células epiteliales luminales:
  a. **Carcinoma tubular:** células dispuestas en forma tubular, son comunes en caninos, los túbulos están revestidos por 1 o 2 células de espesor con una morfología variable.
  b. **Carcinoma tubulopapilar:** las papilas están extendidas hacia la luz tubular como patrón principal, estas se sostienen por un estroma fino de tejido conectivo fibrovascular.
  c. **Carcinoma quístico-papilar:** las papilas se extienden hacia la luz tubular dilatada y quística, sostenidas por un fino estroma de tejido conjuntivo fibrovascular.
  d. **Carcinoma cribiforme:** las células se disponen formando una criba o tamiz, las luces formadas son pequeñas y se encuentran rodeadas de células neoplásicas.
- **Carcinoma micropapilar invasivo:** las células que forman la neoplasia se encuentran dispuestas en pequeños agregados irregulares y papilas diminutas

que no tienen tallo fibrovascular de soporte, rodeados de espacios lagunares vacíos. Es muy metastásico.

- **Carcinoma solido:** las células están colocadas en formas de nidos y cordones, forman lóbulos densos y de tamaño variable, están rodeados de un estroma fibrovascular.
- **Comedocarcinoma:** las células de los agregados nucleares tienen en el centro una marcada necrosis, que se caracterizan por mucho material eosinófilo amorfo que se junta con restos celulares, neutrófilos necróticos y macrófagos.
- **Carcinoma anaplásico:** existe una proliferación del estroma, se invade con células inflamatorias, las células de esta neoplasia invaden el tejido conjuntivo interlobulillar y vasos linfáticos, generan una marcada metástasis en linfonodos y luego en pulmones. Es el tipo más maligno de carcinoma.
- **Carcinoma que surge en un adenoma complejo o tumor mixto benigno:** tiene áreas de células epiteliales pleomórficas que demuestran un nivel elevado de mitosis y mucho más pleomorfismo en comparación con el componente epitelial benigno preexistente.
- **Carcinoma de tipo complejo:** tiene componente mioepitelial benigno y epitelial maligno, se caracteriza por presentar dos poblaciones celulares sostenidas por un estroma fibrovascular.
- **Carcinoma y mioepitelioma maligno:** todos sus componentes son malignos, epitelial y mioepitelial, tiene dos poblaciones celulares sostenidas por un estroma fibroso moderado.
- **Carcinoma de tipo mixto:** su componente epitelial es maligno, y, su componente mesenquimatoso mioepitelial es benigno, tiene 3 o más poblaciones celulares que se sostienen con un estroma fibrovascular.
- **Carcinoma ductal:** las células se disponen forma de cordones y túbulos que rodean la luz con forma de hendidura, alrededor tiene una capa doble celular epitelial. Corresponde a la versión maligna del adenoma ductal.
- **Carcinoma papilar intraductal:** las células epiteliales proliferan con características de malignidad, tiene alto pleomorfismo nuclear, un nivel elevado de figuras mitóticas y una proporción nuclear-citoplasmática alta.

(Goldschmidt et al., 2011; Velandia, 2014).

Neoplasias epiteliales malignas: tipos especiales

- **Carcinoma de células escamosas**: neoplasia compuesta por epitelio escamoso del conducto del pezón, se ven islas y cordones de células epiteliales con formación de perlas de queratina, células y núcleos son grandes.
- **Carcinoma adenoescamoso**: tiene células neoplásicas de carcinoma de cualquier tipo con focos con diferenciación escamosa y características de malignidad marcadas.
- **Carcinoma mucinoso**: tiene una abundante cantidad de mucina, las células productoras de esta sustancia pueden estar formando túbulos y nidos.
- **Carcinoma rico en lípidos**: en este tipo las células tumorales presentan vacuolas pequeñas o una sola vacuola grande de lípidos.
- **Carcinoma de células fusiformes**: se caracteriza por tener células en forma fusiforme (alargada y delgada).
- **Carcinoma de células escamosas**: células con morfología fusiforme dispuestas en islas y cordones que se sostienen de un fino estroma.
- **Carcinoma, variante de células fusiformes**: en este tipo de carcinoma las células tienen forma de huso con núcleos grandes y fusiformes.

(Goldschmidt et al., 2011; Velandia, 2014).

1.2.6. Grado histológico de malignidad

El grado histológico de malignidad, es un elemento importante en el análisis de neoplasias mamarias, siendo una medida de la agresividad y diferenciación del tumor, además de indicar la tendencia que este tiene para provocar una metástasis. El método actualmente aceptado para análisis en caninos es el propuesto por **Goldschmidt et al. (2011)**, este se basa en tres criterios histológicos para determinar un grado tumoral: la formación tubular, el pleomorfismo nuclear y el recuento de figuras mitóticas. Cada uno de estos factores recibe una puntuación de 1 a 3 y al final se realiza la sumatoria que va a indicar el grado tumoral de acuerdo con cada puntaje, de tal manera que se le asigna un grado histológico de malignidad. El grado I muestra un tumor bien

diferenciado, es el menos agresivo y con mejor pronóstico, el grado II es moderadamente diferenciado y el grado III poco diferenciado.

1.2.7. Marcadores tumorales

Son indicadores bioquímicos que se detectan en células tumorales circulantes, plasma, ganglios linfáticos, tumores sólidos, medula ósea y en fluidos corporales de pacientes con alguna neoplasia. Estos marcadores pueden ser sintetizados directamente de las células tumorales o por otras influenciadas por estas, que incluyen enzimas, hormonas, antígenos de superficie celular u proteínas citoplasmáticas. Se pueden clasificar como: moléculas nuevas, moléculas conocidas pero expresadas de manera ectópica, en cantidades anormales o en momentos del desarrollo diferentes de lo habitual y moléculas conocidas, pero estructuralmente alteradas (mal conformadas o incompletas). Tienen las características que los diferencian de otros que son: deben ser producidos mientras el tumor está presente, ser específicos del tumor u órgano, ser detectables en todos los pacientes con el mismo tipo de tumor y tener una concentración paralela al crecimiento de la masa tumoral o característica asociada a la progresión **(Leiva et al., 2021)**. Los objetivos del uso de marcadores son: establecer un diagnóstico, asignar un grado de acuerdo a la agresividad del tumor y si es propenso a una metástasis, predecir si el paciente es susceptible a un tumor en particular, estadificar y mejorar la clasificación del tumor, brindar un pronóstico, monitorear la progresión de la enfermedad, elegir un tratamiento adecuado con la información de resistencia o sensibilidad del tumor y estudiar la biología tumoral para poder utilizarla en aplicaciones posteriores **(Diessler, 2009)**.

Para poder identificar los marcadores tumorales que se encuentran presentes en las neoplasias, existen técnicas de inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y enzimoinmunoensayo, mismos que se fundamentan en la visualización y conteo de dichos marcadores que reaccionan con la presencia de anticuerpos monoclonales específicos. De las técnicas mencionadas anteriormente, la inmunohistoquímica es una de las más utilizadas para evaluar carcinomas mamarios **(García et al., 2003)**.

Los marcadores tumorales pueden clasificarse de acuerdo a sus características biológicas, uno de los grupos más importantes corresponde a los marcadores de proliferación, quienes están presentes en determinadas fases del ciclo celular, mismos que nos permiten detectar y pronosticar la progresión de las neoplasias mamarias, entre ellos uno de los más utilizados en la actualidad es la proteína Ki-67, detectada a través de inmunohistoquímica **(Izquierdo et al., 2016)**.

1.2.8. Actividad biológica de la proteína Ki-67

Ki-67 es un anticuerpo desarrollado para la marcación inmunohistoquímica, fue descubierta en 1980 por un grupo de investigadores alemanes, se nombró de esta forma por la Universidad de Kiel en Alemania, y por el número de clon que fue usado, el clon 67 **(Izquierdo et al., 2016)**. Esta proteína se encuentra presente en las fases activas del ciclo celular y está ausente en las células de reposo o sin replicación (G0) **(Kreipe et al., 2022)**. La vida media de Ki-67 se ha estimado en alrededor de 60-90 minutos. Su expresión inicia en la fase S y aumenta progresivamente en la fase G2, alcanzando su máxima expresión en la mitosis, y cuando regresan a la fase G1 después de la división celular, se quedan con una reserva de este antígeno **(Fernández, 2023)**. El índice de proliferación tumoral expresado por Ki-67, es uno de los parámetros asociados a la agresividad tumoral, ya que solo se expresa en células en proliferación, este indica que la célula está pasando de la fase G1 a la fase S del ciclo celular **(Kreipe et al., 2022)**.

La inmunohistoquímica es un método que nos va a ayudar a identificar ciertas proteínas celulares, esta mide dichas proteínas a través del uso de anticuerpos específicos que se van a unir al antígeno especifico. Este análisis se realiza a través de un microscopio, ya que su tinción permite diferenciar ciertas moléculas de otras **(Bullwinkel et al., 2006)**. Esta técnica nos ha permitido estudiar la distribución de Ki-67 en los núcleos de las células en proliferación. La ubicación de Ki-67 a lo largo del ciclo celular no es homogénea, durante la mayor parte de la interfase de células en

proliferación, esta proteína se encuentra principalmente en los nucleolos, en especial en la periferia. En la mitosis, Ki-67 se posiciona como una red proteica en la superficie de los cromosomas condensados y muestra una expresión más intensa, misma que desaparece en la anafase-telofase **(Urruticoechea et al., 2005)**. Después de la mitosis, en la fase G1, Ki-67 se posiciona en pequeños focos nucleares y luego se condensa alrededor y en los nucleolos reformados además en regiones heterocromáticas del núcleo **(Starborg et al., 1996; Takagi et al., 1999)**. Una investigación realizada por **Kreitz et al. (2000)**, demuestra que, Ki-67, proteína de cromatina pericromosómica, está ubicada en regiones densamente empaquetadas, probablemente en la heterocromatina.

La proteína Ki-67, es un antígeno que se ha convertido en un biomarcador de proliferación celular ampliamente utilizado en el área de oncología debido a que se expresa mayoritariamente cuando la proliferación celular tumoral es mayor **(García et al., 2003)**. El antígeno Ki-67 constituye un factor pronóstico y predictivo, mismo que se utiliza como un criterio inmunohistoquímico junto con los receptores hormonales para poder hacer una subclasificación entre los subtipos tumorales mamarios. La expresión del Ki-67 se evalúa a través de técnicas inmunohistoquímicas utilizando un anticuerpo monoclonal, valorándose su expresión mediante el porcentaje de células coloreadas con tinción nuclear, en la actualidad hay muchos anticuerpos que pueden ser usados en tejido fresco y parafina para Ki-67, pero los más utilizados son el MIB-1 y el MIB-3 en muestras de parafina **(Izquierdo et al., 2016)**.

1.2.9. Anticuerpo MIB-1

Es el anticuerpo monoclonal más utilizado para la marcación de Ki-67 en muestras de tejidos para procesos inmunohistoquímicos. MIB-1 tiene la capacidad de detectar un epítopo exclusivo de Ki-67 que se repite 16 veces en la proteína, lo que asegura su especificidad y mejora su sensibilidad **(Scholzen y Gerdes, 2000)**, una de las ventajas de este anticuerpo es que en inmunohistoquímica, tiene un buen rendimiento y

funciona mejor en una amplia gama de condiciones y diluciones de anticuerpos **(Dowsett et al., 2011).**

1.2.10. Fases del crecimiento celular

Existen 2 estados en que una célula puede encontrarse:

- **Interfase:** en este estado, la célula cumple sus funciones específicas y, si es apta para realizar la división celular, inicia con la duplicación de su ADN.
- **Fase M (mitosis):** se refiere al estado de división celular.

Interfase

Es la fase que ocupa casi un 90% del ciclo celular, ocurre entre 2 mitosis y está conformada por 3 fases:

- **Fase G1:** es la fase, ocurre entre el fin de una mitosis y el inicio de la síntesis de ADN, en esta, la célula duplica su tamaño y ocurre la síntesis proteica y de ARN, dura de 6-12 horas. En este periodo ocurre una síntesis de todos los componentes.
- **Fase S (Síntesis):** es la fase 2 que dura de 10-12 horas, en esta se genera la replicación de ADN en la que cada uno de los cromosomas se duplica y queda conformado por 2 cromátides idénticas, además, el núcleo estará formado por una doble proteína nuclear y ADN.
- **Fase G2:** es la fase 3 y dura de 3-4 horas, en esta continua la síntesis de proteínas y ARN. Esta fase llega a su fin cuando la cromatina se condensa al inicio de la mitosis.

(Valdespino et al., 2015).

- **Fase M (mitosis y citocinesis)**

En esta fase de mitosis (profase, metafase, anafase, telofase), la célula progenitora se divide en 2 células hijas idénticas. En la fase mitótica, el ADN del núcleo celular se condensa en dos cromosomas visibles y es separado por el huso mitótico, en cambio, en la citocinesis, el citoplasma de la célula es quien se divide en dos partes, formando de esta forma dos nuevas células **(Valdespino et al., 2015)**.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general:

Evaluar el pronóstico de la reacción inmunohistoquímica de Ki-67 en neoplasias mamarias de caninos (*Canis lupus familiaris*)

1.3.2. Objetivos específicos:

- Determinar el grado de malignidad mediante un estudio histopatológico de las neoplasias

- Determinar el grado de malignidad mediante el índice de proliferación celular del antígeno Ki-67 de las neoplasias

- Determinar el valor pronóstico del estudio inmunohistoquímico de Ki-67 al compararlo con el grado de malignidad del estudio histopatológico

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Ubicación del estudio

El presente estudio fue realizado en los laboratorios pertenecientes a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, km 8 vía a Quero, sector Querochaca, cantón Cevallos, Provincia de Tungurahua, Ecuador. El cantón Cevallos está ubicado en el sector centro-sur de la Provincia de Tungurahua y al suroriente de la ciudad de Ambato **(Tungurahua Turismo, 2024).**

2.2. Caracterización del lugar.

El trabajo de campo designado para el tema de investigación se realizó en el Cantón Cevallos de coordenadas: 1°21′00″S 78°37′00″O que tiene una superficie de 19 km² en los que viven 8 163 habitantes, conformado por varias parroquias urbanas y rurales. Clima: templado andino, la temperatura va de 14-17°C, humedad relativa 92%, presión 1017 hPa y la precipitación anual es de 517.8mm **(Tungurahua Turismo, 2024).**

2.3. Equipos y materiales

2.3.1. Equipos

- Microscopio biológico digital Motic BA210LED
- Microscopio LEICA DM1000 LED con cámara MC170 HD

2.3.2. Materiales

- Tumores mamarios
- Formol al 10%

- Recipiente para muestras tisulares
- Caja para placas inmunohistoquímicas e histológicas
- Solución salina tamponada con fosfato (PBS: fosfato salino buffer)
- Solución de peróxido de hidrógeno al 3% (para bloqueo de peroxidasa endógena)
- Alcohol y xileno en diferentes concentraciones (70%, 80%, 95%, y 100%)
- Solución de bloqueo (suero de caballo)
- Anticuerpo primario: Anticuerpo anti-Ki-67 (MIB-1)
- Anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa
- Solución reveladora (DAB: diaminobencidina)
- Portaobjetos
- Cubreojetos
- Hematoxilina (para contraste nuclear)
- Medio para montaje: DPX (dibutilftalato poliestireno xileno)
- Fijador
- Recipientes para fijación
- Parafina
- Microtomo
- Cuchillas para microtomo
- Tintes y colorantes
- Láminas de vidrio cubreobjetos
- Soluciones de lavado y buffer
- Marcadores y etiquetas
- Bisturís y tijeras
- Incubadoras y estufas
- Guantes quirúrgicos
- Mascarillas quirúrgicas
- Frontoluz quirúrgico

2.3.3. Material de Oficina

- Libreta

- Esferos
- Computador portátil Lenovo Core i3
- Computador de escritorio Acer Core i7
- Hojas de registro

2.4. Factores de Estudio:

2.4.1. **Factor 1:** Grado histológico de malignidad

2.4.2. **Factor 2:** Presencia de antígeno Ki-67

2.5. Manejo del experimento

El análisis inmunohistoquímico e histopatológico se desarrolló en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, tomando en cuenta que las muestras se recogieron desde mayo 2023 a mayo 2024, mismas que se tomaron de pacientes caninos diagnosticados con neoplasias mamarias con características de malignidad como ulceración, nódulos linfáticos afectados, gran tamaño y metástasis a distancia, en la Clínica Veterinaria ´´Centro´´ sin importar su edad, raza o sexo. Se recolectaron los datos principales de cada paciente para llenar la hoja de registro (ver anexo A). En el estudio se incluyeron variables clínicas: edad (años), tamaño del tumor (diámetro en centímetros del eje mayor), raza, información si era esterilizado o no.

Las muestras de las neoplasias mamarias obtenidas por biopsias incisional y excisional se conservaron en frascos de formol al 10% para ser remitidas al laboratorio, clínicamente se midieron en centímetros y se consideró el diámetro mayor del tumor para poder clasificarlo según lo indica la OMS para tumores mamarios caninos en: T 1 < 3 cm, T 2 = 3-5 cm, y T 3 > 5 cm **(Owen, 1980)** y posteriormente fueron enviadas al Laboratorio de patología de la ciudad de Ambato con sus respectivos datos de

identificación, en donde los tejidos se procesaron de forma rutinaria para histopatología.

2.5.1. Procesado de muestras para histopatología

Las muestras de los tejidos neoplásicos fijadas anteriormente con formol al 10% de las pacientes se seleccionaron en sus zonas más representativas y se colocaron en casettes histológicos, los cuales se sometieron a una serie de alcoholes con un grado creciente (70%, 80%, 95%, y 100%) para poder quitar el exceso de agua, los casettes se colocaron en xileno y luego se sumergieron completamente en parafina fundida a 60°C para poder impregnarlo completamente. La muestra colocada en parafina se dejó en un molde y se le agrego más parafina formando de esta forma un bloque sólido, mismo que se dejó enfriar y solidificar. Al obtener los bloques de parafina, se realizaron cortes de 4 µm de espesor con un micrótomo (HM 315), estas secciones se recogieron en un portaobjetos. Posteriormente las placas se desparafinaron en xileno para eliminar la parafina y se hidrataron pasando por una serie de alcoholes, esta vez en orden de graduación decreciente y se tiñeron con Hematoxilina de Harris y Eosina. Una vez teñidas, las muestras se deshidrataron y se sumergieron nuevamente en xileno, al final fueron montadas con un cubreobjetos y Bálsamo de Canadá sintético.

Los bloques de parafina de cada tumor se enviaron nuevamente al laboratorio de patología debidamente etiquetados para ser procesados en placas de inmunohistoquímica para la detección de Ki-67.

2.5.2 Procesado de muestras para inmunohistoquímica

- **Preparación de secciones del tejido:** Los bloques de parafina se cortaron de 4µm con un micrótomo de rotación (HM350S), se montaron en portaobjetos y luego se desparafinaron las secciones pasando por 3 cambios de xileno de 5 minutos cada uno. Se rehidrataron las secciones pasando las placas por una

serie de alcoholes con una concentración creciente (100%, 95%, 70%) por 5 minutos cada uno. Se enjuagó con agua destilada.

- **Recuperación antigénica:** se calentaron las secciones en un tampón de citrato de sodio (pH 6.0) en un equipo (PTLLink) a 95°C por 20 minutos, se dejó que se enfríen las secciones al ambiente y posteriormente se enjuago con PBS: fosfato salino buffer.

- **Bloqueo de peroxidasa endógena:** se incubaron las secciones en peróxido de hidrogeno al 3% y en metanol por 10 minutos con el objetivo de bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. Se lavó la sección con PBS: fosfato salino buffer.

- **Bloqueo de proteínas inespecíficas:** se incubaron las secciones en suero de caballo y se aplicó una solución que contenía 0,1 g de leche en polvo, más 10 ml de TRIS más 1 µl de BSA por 30 minutos a temperatura ambiente para de esta forma bloquear la unión inespecífica.

- **Aplicación de MIB-1:** se eliminó el exceso de suero secando los bordes de las preparaciones y se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-Ki-67 de ratón, MIB-1clon (Dako), se utilizó a una dilución 1:50. Se incubo por 2 horas a una temperatura ambiente. Se lavó con PBS.

- **Aplicación del anticuerpo secundario:** se incubó con el anticuerpo anti-raton biotinilado (Elite PK-6102 Mouse IgG VEctastain ABC kit Elite, Laboratorios Vector, Burlingame, CA, EEUU), a una dilución 1:200 en TBS1x + 0,1% BSA, por 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las secciones con PBS.

- **Detección con DAB:** se incubaron las secciones con diaminobencidina (DAB), hasta que se visualizó la coloración en 7 minutos. Se bloqueo la peroxidasa endógena con una solución de agua oxigenada al 0,5% en agua destilada, las placas se sumergieron 30 minutos. Se lavaron las secciones con PBS.

- **Contraste**: se colocó hematoxilina para poder evidenciar de mejor forma la morfología del tejido.

- **Deshidratación y montaje:** se lavaron las secciones en agua corriente por 5 minutos. Para la deshidratación se sumergieron las secciones en una serie creciente de alcoholes (60º, 96º, 100º, 100º), luego se aclaró en xileno y se montó con dibutilftalato poliestireno xileno (DPX) y un cubreobjetos.

2.6.Tamaño de la muestra

En este estudio se analizaron 20 muestras de neoplasias mamarias recolectadas de forma retrospectiva en los últimos doce meses comprendidos desde mayo 2023 a mayo 2024 en la Clínica Veterinaria ´´Centro´´, los pacientes de especie *Canis lupus familiaris*, fueron de distintas razas y sus edades varían de 5 a 14 años. Todos los pacientes fueron diagnosticados con tumores mamarios y biopsiados en la clínica antes mencionada.

2.7.Variables respuestas

2.7.1. Estudio histopatológico

Para el análisis de las placas histopatológicas se utilizaron dos microscopios, Microscopio biológico digital BA210LED y Microscopio LEICA DM1000 LED con cámara MC170 HD, este último microscopio estaba conectado a un computador para realizar el escaneo de imágenes mediante el software LAZ EZ, al obtener las imágenes digitales se realizó una clasificación de acuerdo al grado histológico de malignidad, tomando en cuenta los criterios establecidos por **Goldschmidt et al. (2011)** que se indican en la tabla 2. Esta clasificación es una adaptación para pacientes caninos tomada del sistema de clasificación humano de **Elston y Ellis (1991).**

Tabla 2

Criterios utilizados para la clasificación histológica de malignidad en carcinomas mamarios caninos

Característica	Puntaje
Formación tubular	
Marcada formación de túbulos >75% de la muestra	1
Moderada formación tubular (10 – 75% de la muestra), mezclada con áreas de crecimiento del tumor sólido.	2
Mínima o nula formación tubular (< 10%)	3
Pleomorfismo nuclear	
Núcleo pequeño uniforme y regular y nucléolo ocasional	1
Moderado grado de variación nuclear de tamaño y forma, núcleos hipercromáticos y presencia de nucléolos (algunos prominentes).	2
Marcada variación en el tamaño nuclear y núcleos hipercromáticos, algunos con uno o más nucléolos prominentes.	3
Mitosis por 10 HPF* / Núcleo Hipercromáticos	
0 – 9 mitosis/10 HPF Ocasionales núcleos hipercromáticos o figuras de mitosis por HPF	1
10 – 19 mitosis/10 HPF 2-3 núcleos hipercromáticos o figuras de mitosis por HPF	2
> 20 mitosis / 10 HPF 2-3 núcleos hipercromáticos o figuras de mitosis por HPF	3

* Número de mitosis por 10 campos en la periferia del tumor.

Datos tomados de **Goldschmidt et al. (2011).**

El grado histológico de malignidad que se le asigno a cada tumor era el resultado de la sumatoria según cada parámetro analizado, de manera que:

Tabla 3

Grado del tumor según la puntuación histológica

Puntaje total	Grado de malignidad
3-5	I (Bajo) Bien diferenciado
6-7	II (Intermedio) Moderadamente diferenciado
8-9	III (Alto) Poco diferenciado

Datos tomados de **Goldschmidt et al. (2011).**

2.7.2. Estudio inmunohistoquímico

El método utilizado para encontrar el índice de proliferación para Ki-67 fue el propuesto por un grupo de investigación internacional formado por **Nielsen et al. (2021),** mismo que se basa en la visualización de la placa inmunohistoquímica en campos con puntos calientes, es decir, las áreas con mayor tinción para este antígeno y posteriormente anotar cuantas células son positivas para ki-67 (con coloración marrón (3,3-diaminiobenzidina) y aplicar la fórmula para sacar el porcentaje que muestra el índice de proliferación: el número de células positivas para Ki-67 dividido para el total de células contadas y este resultado multiplicado por 100.

Se seleccionaron las zonas teñidas inmunohistoquimicamente para la evaluación de Ki-67 mediante objetivos de 10x y 20x para poder identificar la zona de tinción más intensa (punto caliente). Se tomaron fotos (formato JPG, resolución 2592x1944) de 5 puntos calientes de cada placa en un campo de alta potencia con un objetivo de 40x, incluyendo un mínimo de 500 células tumorales por captura según la recomendación de **Kanyılmaz et al., 2019; Reyes, 2022; Rios, 2016)**. Todos los núcleos de las células teñidos de marrón, independientemente de la intensidad de la tinción, se contaron

como positivos. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio DM1000 LED con cámara MC170 HD conectada a un computador para escanear las imágenes mediante el software LAZ EZ y posteriormente se transfirieron las capturas digitales a una laptop, en este dispositivo se editaron las fotos en el programa PicsArt colocando una cuadricula de 6x6 sobre cada fotografía, ampliándola de acuerdo con el tamaño de la imagen. En cada imagen se inició el recuento celular en el marco superior izquierdo y terminando con el marco superior derecho (ver anexo B) **(Molina et al., 2011)**. En la computadora portátil se instaló la aplicación ImageJ, software que cuenta con el plugin ´´cell counter´´con que se realizó un conteo manual de núcleos positivos y negativos de manera exacta. Los valores obtenidos de las 5 lecturas de cada placa se ingresaron a la base de datos Microsoft Excel, en el que se utilizaron fórmulas para realizar el cálculo del índice de proliferación en cada campo con la formula antes mencionada, y posteriormente sacando el promedio de los 5 campos, y así se obtuvo el porcentaje de cada muestra.

- **Cálculo de Índice de Proliferación Ki-67:**

Se calculó el índice de proliferación celular dividiendo el número de células positivas para el número total de células contadas (positivas y negativas para Ki-67) y el resultado multiplicando por 100 para obtener un porcentaje **(Dowsett et al., 2011**; **Kanyılmaz et al., 2019).** Se establecieron 3 categorías según el nivel de Ki-67: 1-9% (bajo), 10-30% (intermedio) y >30% (alto), tomando como referencia a la investigación realizada por **Penault et al. (2012)** en la que al comparar varios estudios sobre el punto de cohorte para Ki-67, llegaron a la conclusión de que en una ´´actividad proliferativa baja´´ los valores de Ki-67 están por debajo del 10% y en una "actividad de proliferación alta" se presentan valores de Ki-67 mayores al 30%.

2.8. Diseño experimental

Los datos resultantes de la presente investigación se almacenaron en el programa Microsoft Excel y se procesaron en el software Infostat, en el cual se analizaron mediante la prueba de Chi cuadrado al 95% de confianza p (< 0,05) para relacionar el grado histológico de malignidad con el índice de proliferación de Ki-67. Para todos los análisis estadísticos, se consideró significativo un valor de p inferior a 0,05.

Para el análisis de la información que se obtuvo del estudio se realizaron grupos con los resultados: la variable de clasificación del grado histológico de malignidad: grado I, grado 2, y grado III; para clasificar la edad se agruparon 3 categorías: ≤8 años, 9-10 años y ≥11 años; en cuanto al tamaño tumoral: T 1 < 3 cm, T 2 = 3-5 cm, y T 3 > 5 cm; y para la variable de índice de proliferación celular Ki-67: 1-9%, 10-30%, >30%.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Grado de malignidad según el estudio histopatológico

Tabla 4

Número de pacientes caninas distribuidas según el grado histopatológico de malignidad

	Formación tubular	Pleomorfismo nuclear	Mitosis por 10HPF	Grado I	Grado II	Grado III
P1	3	3	1		X	
P2	3	3	1		X	
P3	2	3	2		X	
P4	1	2	1	X		
P5	3	2	2		X	
P6	2	3	1		X	
P7	2	1	1	X		
P8	1	1	1	X		
P9	1	1	1	X		
P10	2	2	1	X		
P11	3	3	2			X
P12	1	1	1	X		
P13	1	1	1	X		
P14	3	2	2		X	
P15	1	2	1	X		
P16	2	3	1		X	
P17	2	2	1	X		
P18	1	1	1	X		
P19	2	1	3		X	
P20	1	2	1	X		
			Total	GI = 11	G2 = 8	G3 = 1

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos del grado histopatológico de malignidad tomando como referencia la tabla propuesta por **Goldschmidt et al. (2011)**. Se puede evidenciar que la mayoría de los pacientes (11/20) presentó neoplasias grado I (55%), seguidos de (8/20) neoplasias grado II (40%), y solamente 1 neoplasia grado III (5%), lo que nos indicó que los pacientes en grado I con relación al grado III presentan menor porcentaje de malignidad. Estos resultados difieren con el estudio realizado en Argentina por **Vaquero (2023)** en donde se analizaron 20 neoplasias mamarias, se evidenció que la frecuencia mayoritaria en cuanto al estadio clínico fue en grado histopatológico II (75%), se menciona que la mayoría de tumores son diagnosticados por visitas al médico cuando la patología ya es visible. En cambio, los resultados obtenidos de este estudio coinciden con los encontrados por **Asqui (2017)** que realizó una investigación en Ecuador, en la ciudad de Quito con una muestra de 22 neoplasias malignas, en donde se obtuvo que el 63,6% pertenecieron a grado I, seguidos por el 31,8% por el grado II y apenas el 4,5% eran grado III. Por otro lado, nuestros resultados difieren con los realizados por **Elston y Ellis (1991)** en donde se tomaron 1830 casos de carcinoma de mama se obtuvo que 342 (19%) casos pertenecieron al grado I, 631 (34%) casos al grado II y 857 (47%) casos al grado III.

Cabe mencionar que el análisis de las características tumorales se evaluó a través de tres categorías, la primera se trata de las estructuras tubulares del tumor en la que se categorizó por puntos (1= >75%; 2= 10-75% y 3 = < 10%); la segunda categoría corresponde al pleomorfismo nuclear en donde se toma en cuenta el análisis cualitativo como cuantitativo (1: núcleo pequeño; 2: moderada variación de tamaño y forma entre núcleos y 3: marcada variación en tamaño y forma de núcleos) y la tercera categoría clasifica al tumor de acuerdo a las mitosis que se evalúa en la periferia de la neoplasia (1: 0-9; 2: 10-19 y 3: > 20), se confirma que la clasificación del grado histológico de malignidad brinda una importante información pronóstica como se observa en la figura 1. Resultados que coinciden con los obtenidos por **Merlo et al. (2013)** en su estudio realizado en Argentina en donde tomaron 34 muestras de pacientes con neoplasias mamarias caninas y se analizó el grado histopatológico según criterios de conservación de la arquitectura tubular, pleomorfismo nuclear y numero de mitosis, siendo importante destacar que 28 de las muestras fue de grado I, y 6 de grado II, no existió ninguna paciente de grado 3, estos resultados son parecidos a los de este estudio.

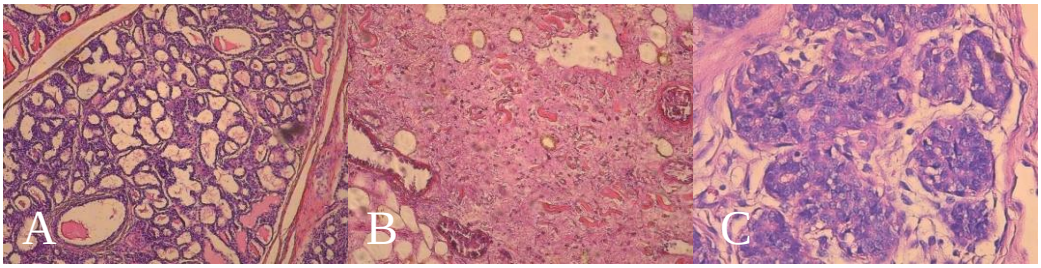


Figura 1.

Clasificación según el grado histológico de malignidad en carcinomas mamarios caninos.

A. Carcinoma grado I (Bajo), bien diferenciado: se observa una mínima formación tubular (<10%), se aprecia escaso pleomorfismo nuclear y de entre 0-9 figuras mitósicas/ 10 HPF 10x. **B**. Carcinoma grado II (Intermedio), moderadamente diferenciado: se evidencia una moderada formación tubular (10 – 75%) y marcado pleomorfismo nuclear, además hay de entre 0-9 figuras mitóticas/ 10 HPF 10x. **C.** Carcinoma grado III (Alto), poco diferenciado: se observa una mínima formación tubular (<10%). Se aprecia marcado pleomorfismo nuclear y entre 10-19 figuras mitóticas/10 HPF 40x.

3.2. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67

Tabla 5

Número de pacientes clasificados por índice de proliferación y graduación de Ki-67 en 20 pacientes caninas.

Índice Ki-67	Grado	N° Pacientes	Porcentaje
1-9%	Bajo	9	45
10-30%	Moderado	10	50
>30%	Alto	1	5
	Total	20	100

En la tabla 5 se muestra el total de las 20 neoplasias analizadas por inmunohistoquímica mediante el marcador MIB-1, en donde 9 pacientes que representa el 45% del total de muestras se ubicaron dentro del índice de proliferación celular del antígeno Ki-67 entre el 1-9%, lo que corresponde a un grado de malignidad bajo; 10 pacientes que representa el 50% del total de muestras se ubicaron dentro del índice de proliferación celular del antígeno Ki-67 entre el 10-30%, lo que corresponde a un grado de malignidad moderado; 1 paciente representa el 5% del total de muestras se ubicaron dentro del índice de proliferación celular del antígeno Ki-67 >30% lo que corresponde a un grado de malignidad alto. Resultados que difieren con **Pereira et al. (2019)** en un estudio realizado en Argentina en donde se utilizaron 46 muestras de tejidos neoplásicos mamarios, de los cuales 39 (84,78%) eran malignos y 7 (15,22%) benignos, en los tumores malignos se analizó el índice de proliferación de Ki-67, en donde se usó un rango de 11-39% (baja positividad), con 20 neoplasias y un rango de 40-65% (alta positividad), con 19 neoplasias mamarias, el grupo de baja positividad mostró mejor pronóstico y mayor sobrevida global que el grupo de pacientes con alta positividad para Ki-67. La tinción se centró fuertemente en el núcleo, existen algunos estudios realizados que indican que Ki-67 no tiene una ubicación homogénea en el ciclo celular, en la interfase se sitúa en la periferia de los nucleolos, en la mitosis se sitúa en la superficie de cromosomas condensados **(Urruticoechea et al., 2005)**, finalmente se indica que este marcador puede ser un procedimiento confiable para juzgar la malignidad de las neoplasias mamarias caninas, al igual que el estudio de **Dutra et al. (2008)** donde se demuestra que de una muestra de 56 neoplasias mamarias en caninos, se presentó una correlación estadísticamente significativa entre el anticuerpo MIB-1 (utilizado para detectar la proteína Ki-67) y el recuento mitótico por 10HPF ($P<0,0001$), lo que respalda la opinión de que este marcador indica de forma eficiente la actividad proliferativa en secciones tumorales de mama.

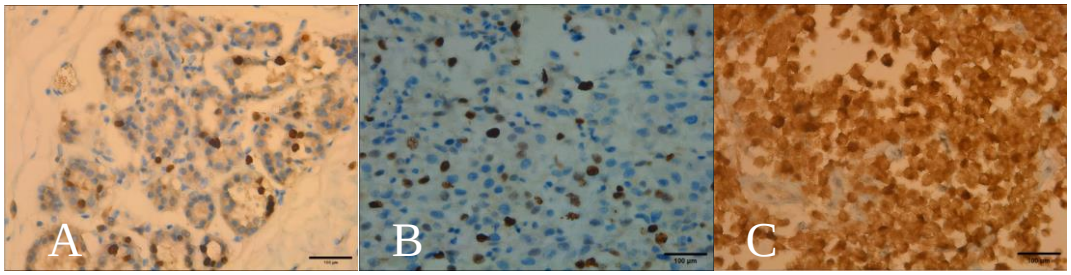


Figura 2.

Determinación inmunohistoquímica de Ki-67 en carcinomas mamarios caninos. ***A.*** *Índice de Proliferación Bajo (Ki-67 1-9%).* ***B.*** *Índice de proliferación Moderado (10-30%).* ***C.*** *Índice de proliferación Alto (Ki-67 >30%).*

3.3. Relación entre el valor de Ki-67 y el grado histológico de malignidad

Tabla 6

Número de casos clasificados por el índice de proliferación de Ki-67 y grados de malignidad de las neoplasias mamarias en 20 pacientes caninas.

Grado histopatológico	**Índice de Proliferación Ki-67**			**Total**	**P**
	1-9%	10-30%	>30%		
I	9	2	0	11	
II	0	7	1	8	0,0078
III	0	1	0	1	
Total	**9**	**10**	**1**	20	

Existieron 9 pacientes con un resultado histopatológico grado I e índice de proliferación entre 1-9%; 2 pacientes con grado histopatológico I e índice de proliferación entre 10-30%; 7 pacientes con grado histopatológico grado II e índice de proliferación entre 10-30%; 1 paciente con grado histopatológico II e índice de proliferación >30%; 1 paciente con grado histopatológico III e índice de proliferación

10-30%. En la tabla 6 se puede evidenciar la relación entre el índice de proliferación de Ki-67 y el grado histológico de malignidad en donde se obtuvo un valor estadísticamente significativo (P=0,0078) lo que indica que a mayor grado histológico de malignidad mayor índice de Ki-67; es decir, que se puede emitir un valor pronóstico al valorar ya sea el grado de malignidad histopatológico o el estudio inmunohistoquímico del Ki-67. Estos resultados son similares a varios estudios en los que se compara la relación entre Ki-67 y otros parámetros clínicos, **Peña et al. (1998)** en un estudio realizado con 96 muestras de tumores mamarios de hembras caninas, demostró que existe una relación pronóstica positiva del Ki-67 con metástasis, intervalo libre de enfermedad y supervivencia, este resultado indica que Ki-67 es un marcador de pronóstico desfavorable cuando se asocia a carcinomas y tiene una gran relevancia en la valoración pronóstica del paciente. Según **Kadthur et al. (2011)** en su estudio evaluó 71 neoplasias mamarias caninas, es importante mencionar que se utilizó el anticuerpo MIB-1, mismo que es específico para la reacción con el antígeno Ki-67, se reportó que el índice de proliferación Ki-67 fue más alto en el tipo de carcinoma de células escamosas, y que además, un alto índice indica un mal pronóstico y baja tasa de supervivencia y que un bajo índice corresponde a un pronóstico más favorable del paciente, además se pudo evidenciar que existió una correlación significativa con la muerte postquirúrgica de los pacientes relacionada con neoplasias mamarias, el 90% de los caninos que fallecieron presentaban un índice de Ki-67 superior a 14,27%, por lo que es importante indicar que en nuestro estudio, los pacientes que presentan un índice de entre 1 y 9 % (9 pacientes) tienen un pronóstico favorable, por ende menor riesgo de muerte postquirúrgica. **Yang et al. (2006)** realizó un estudio en 39 neoplasias mamarias caninas, en donde menciona que se utilizó el anticuerpo MIB-1 para marcar la proteína Ki-67, se encontró que tuvo una correlación positiva ($P < 0,01$) con las neoplasias malignas, así como con los carcinosarcomas y carcinomas tubulopapilares que mostraron una mayor expresión de este antígeno, se menciona además que se utilizó este anticuerpo debido a que existen estudios que demuestran su especificidad con esta proteína **(Dowsett et al., 2011)**. En un estudio realizado por **Dutra et al. (2004)** en muestras de 70 neoplasias mamarias recolectadas en Brasil y Portugal, se evaluaron 28/70 tumores malignos, se encontró una importante y extremada significancia estadística ($P < 0.0001$) entre el pleomorfismo nuclear y el índice de MIB-1 (expresión de Ki-67), la investigación reveló que existe una gran

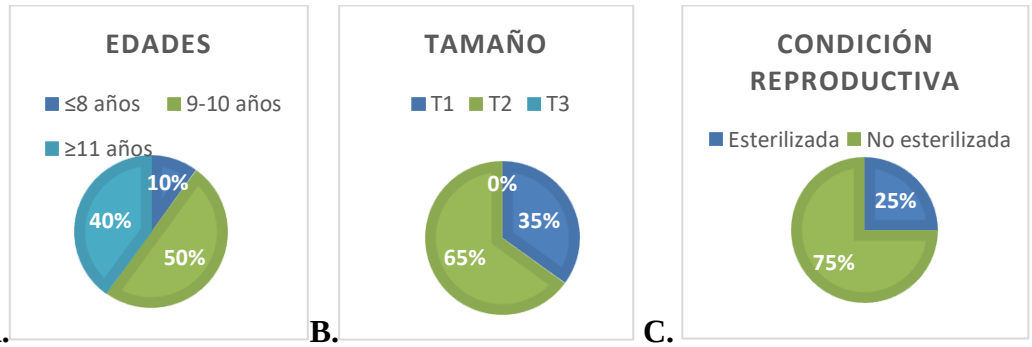
relación entre la biología (índice MIB-1) y la morfología (pleomorfismo nuclear). Según **Ferreira et al. (2006)** en una investigación realizada en Portugal con 77 neoplasias mamarias malignas extirpadas de 47 perras, se demuestra que el anticuerpo MIB-1 utilizado para la identificación de Ki-67 está relacionado significativamente con el tamaño del tumor, grado histopatológico, necrosis y crecimiento invasivo, pero no se relacionó con ulceración, fijación de piel, metástasis.

Como dato adicional encontrado en nuestro estudio podemos corroborar que otras características clínicas presentadas por los pacientes influyen en la presentación de esta patología. En el estudio se incluyeron muestras recolectadas de veinte pacientes, todas de sexo hembra caninas de edades comprendidas entre 5 y 14 años ($\bar{x}$ =10,6 años), tanto enteras (15/20; 75%) como esterilizadas (5/20; 25%), 11 pertenecientes a 6 razas diferentes y 9 mestizas. Con respecto a la condición reproductiva, los resultados son similares a un estudio realizado en Argentina por **Benavente (2019)** en donde se analizaron 26 muestras tumorales de neoplasias mamarias, el autor indica que el 77% de las pacientes de su estudio no eran esterilizadas y apenas el 23% estaban enteras. Nuestro estudio se realizó en 20 (100%) carcinomas mamarios, habiendo ya estudios realizados en este tipo de tumores malignos que son mayormente encontrados, en un estudio realizado por **Parraga, (2019)** en Ecuador en la ciudad de Machala con 8 pacientes, de las muestras analizadas por histopatología el 100% correspondían a neoplasias mamarias de tipo maligno. **Lipa et al. (2019)** en Perú, analizó 1599 neoplasias en donde 359 eran de glándula mamaria, de las cuales el 98% fueron hembras y el 2% fueron machos. En el presente estudio, el grupo de pacientes con edad de entre 9-10 años fueron las que presentaron mayor predisposición a padecer carcinomas mamarios (10/20; 50%), seguidas de las ≥11 años (8/20; 40%) y finalmente las ≤8 años (2/20; 10%) como se evidencia en la figura 3. Tomados juntos estos resultados concuerdan con un estudio realizado en Paraguay por **Pérez et al. (2020)** con una muestra de 43 perras con neoplasias, en donde las perras con mayor predisposición a padecer tumores mamarios fueron las que se encontraron en la categoría >5 años, siendo extraña la presentación en perras <5años excepto si han tomado algún tipo de progestágeno en su vida **(Sorenmo et al., 2011)**.

En cuanto a la raza, la mayor frecuencia la obtuvieron los mestizos con un 45% (9/20), seguidos de los French Poodle 30% (6/20), y los Yorkshire 5% (1/20), Cocker Spaniel 5% (1/20), Labrador Retriever 5% (1/20), Boxer 5% (1/20) y Golden Retriever con 5% (1/20). Esta información es coincidente con otros autores, quienes indican en un estudio realizado en Ecuador con 8 pacientes que las neoplasias mamarias con mayor frecuencia se presentan en perros mestizos (**Parraga, 2019)**. Es importante mencionar que la popularidad de la raza varía entre países, este puede ser un factor que influye en

el análisis de predisposición de raza, por ejemplo en investigaciones en países vecinos como Venezuela y México los perros más predisponentes fueron los mestizos y French Poodle tal como los resultados obtenidos en este estudio **(Morales, 2014; Salas et al., 2015)**.

El tamaño tumoral estaba comprendido entre 1,4 y 5 cm (n=20; x̄: 3,63). De acuerdo con la clasificación del tamaño tumoral de la OMS, reflejando los siguientes resultados: la mayoría con T2, 3-5cm (13/20; 65%), seguidos por T1, < 3 cm (7/20; 35%) y T3, > 5 cm (0/20; 0%) como se indica en la figura 3. Estos resultados son similares a los obtenidos en un estudio realizado en Ecuador en la ciudad de Machala por **Sinche (2022)** en donde se analizaron 10 pacientes hembras caninas, se encontró que existió mayor prevalencia en tumores mamarios de tamaño de 3-5cm con el 30%, seguidos por < 3cm con 20% y finalmente > 5cm con el 20%. En cambio, **Santos et al. (2020)** indica en su estudio realizado en con 91 perras con neoplasias mamarias que el 78% presento un tamaño tumoral <3 cm, seguido del 16,5% con 3,5cm y el 5,5% presentó tumores con un tamaño >5 cm. Estos hallazgos de tumores mayores a 5 cm se pueden atribuir que el diagnóstico clínico es tardío y los pacientes llevados a consulta meses o incluso años después de la aparición de una pequeña masa.



A. **B.** **C.**

Figura 3.

A. *Frecuencia (%) de pacientes caninas distribuidas según la edad y su predisposición a padecer carcinomas mamarios.* **B.** *Frecuencia (%) de pacientes caninas distribuidas según el tamaño tumoral. T 1 < 3 cm, T 2 = 3-5 cm, y T 3 > 5 cm.* **C.** *Frecuencia (%) de pacientes caninas distribuidas según su condición reproductiva.*

3.4.Comprobación de hipótesis

Se acepta la hipótesis alternativa ya que la presencia de un elevado número de antígenos Ki-67 se relaciona con un comportamiento más agresivo de los tumores mamarios en la especie canina.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

El estudio histopatológico es de importancia para detectar el grado de malignidad de las neoplasias mamarias y poder dar seguimiento a cada paciente una vez realizado el diagnóstico. La mayoría de los tumores diagnosticados en este estudio son de grado I, por lo que ha se considera que estos pacientes tienen un mejor pronóstico.

El antígeno Ki-67 que reacciona con el anticuerpo MIB-1, uno de los mayormente referidos para la marcación de esta proteína, presenta una importante validez como indicador del grado de malignidad dentro del carcinoma mamario ya que al evaluar la proliferación celular también se puede conocer su comportamiento de malignidad y dar una guía en el manejo clínico de esta neoplasia. Este antígeno demostró ser un biomarcador crucial para proporcionar información sobre la tasa de crecimiento del tumor, lo que influye directamente en el pronóstico.

El presente estudio ha demostrado que el índice de proliferación Ki-67 se relaciona con el grado histológico de malignidad, dando a entender el comportamiento agresivo que pueden llegar a presentar estas neoplasias, por lo que el valor pronóstico de este tipo de neoplasias se lo puede emitir al valorar ya sea el estudio histopatológico o al valorar el estudio inmunohistoquímico.

4.2.RECOMENDACIONES

Se recomienda utilizar el anticuerpo MIB-1, debido a que en este estudio demostró ser muy eficaz al momento de la reacción con el antígeno Ki-67 en neoplasias mamarias de caninos, además, MIB-1 es el más accesible y el más utilizado en los laboratorios de inmunohistoquímica de nuestro país para este tipo de exámenes.

De acuerdo con la investigación, para el diagnóstico de neoplasias mamarias caninas, se recomienda utilizar un examen inmunohistoquímico con el índice de proliferación de Ki-67, por la facilidad al momento de emitir el resultado, debido a que puede ser realizada por un clínico y no específicamente por un médico patólogo como lo es en el caso del examen de histopatología.

El desafío de futuras investigaciones seria realizar un estudio recolectando más parámetros clínicos como la ubicación de la neoplasia, tiempo de sobrevida después de las cirugías, así como también identificar el tipo de carcinoma, para poder correlacionar estas variables y poder usar estos datos en el diagnóstico del paciente.

Sería muy interesante realizar una investigación evaluando el índice de proliferación Ki-67 con diferentes tipos de anticuerpos y reconocer cuál de ellos presenta una mejor tinción para este antígeno dependiendo el tipo de carcinoma.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aman, H. G. (2021). *Tumores de mama en animales de compania : La importancia de prevenir* [Universidad Nacional de Río Negro]. https://rid.unrn.edu.ar/bitstream/20.500.12049/6894/1/Aman.pdf

Asqui, S. A. (2017). *Clasificación Histopatológica De Tumores Mamarios En Caninos Extraídos Quirúrgicamente, En 6 Clínicas Veterinarias De La Ciudad De Quito* [Universidad Central del Ecuador]. https://www.dspace.uce.edu.ec/server/api/core/bitstreams/e9adcc01-0c6d-46be-9852-e9c6a0cf5762/content

Benavente, M. A. (2019). Estudios sobre la población de receptores hormonales en neoplasias mamarias caninas y evaluación in vitro de terapias adyuvantes. En *Facultad de Ciencias Veterinarias U.N.C.P.B.A.* http://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/93480

Bergman, P. (2017). *Mammary Gland Tumors*. 4. chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://voorjaarsdagen.eu/wp-content/uploads/2019/07/Philip-J.-Bergman-CA-MAMMARY-GLAND-TUMORS.pdf

Brisotto, B. (2022). Tumores de Mamas en hembras caninas: Descripción de un caso clínico y revisión bibliográfica. *Universidad Nacional Río negro*. https://rid.unrn.edu.ar/bitstream/20.500.12049/9047/1/tumores mamarios en hembras caninas.pdf

Bullwinkel, J., Baron-Lühr, B., Lüdemann, A., Wohlenberg, C., Gerdes, J., y

Scholzen, T. (2006). Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *Journal of Cellular Physiology*, *206*(3), 624–635. https://doi.org/10.1002/jcp.20494

Casas, F. E. (2023). *Determinacion de las complicaciones postquirurgicas para el tratamiento de neoplasia mamaria en caninos (Canis familiaris), Arequipa 2023* [Universidad Católica de Santa María]. https://hdl.handle.net/20.500.12920/13408

Diessler, M. (2009). *"Carcinomas mamarios de caninos: influencia de variables histológicas e inmunohistoquímicas en el pronóstico´´* [Universidad Nacional de la Plata]. https://doi.org/10.4324/9781003248569-15

Dowsett, M., Nielsen, T., A'Hern, R., Bartlett, J., Coombes, C., Cuzick, J., Ellis, M., Henry, L., Hugh, J., Lively, T., McShane, L., Paik, S., Penault, F., Prudkin, L., Regan, M., Salter, J., Sotiriou, C., Smith, I., Viale, G., … Hayes, D. (2011). Assessment of Ki-67 in Breast Cancer: Recommendations from the international Ki-67 in breast cancer working Group. *Journal of the National Cancer Institute*, *103*(22), 1656–1664. https://doi.org/10.1093/jnci/djr393

Dutra, A., Azevedo, G., Schmitt, F., y Cassali, G. (2008). Assessment of cell proliferation and prognostic factors in canine mammary gland tumors. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, *60*(6), 1403–1412. https://doi.org/10.1590/s0102-09352008000600015

Dutra, A., Granja, N., Schmitt, F., y Cassali, G. (2004). c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *37*(11), 1673–1681. https://doi.org/10.1590/S0100-

879X2004001100013

Elston, C., y Ellis, I. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, *19*(5), 403–410. https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x

Febres, M. (2023). *Prevalencia oncológica veterinaria en pacientes caninos tratados en la Clinica Veterinaria San Luis Arequipa 2020 - 2021* [Universidad Católica de Santa María]. https://core.ac.uk/download/pdf/233005487.pdf

Fernández, C. (2023). *Índice de proliferacion de ki-67 en lesiones de leucoplasia en lengua*. https://minerva.usc.es/xmlui/bitstream/handle/10347/31840/2023_TFG_Odontoloxia_Fernandez_Indice.pdf?sequence=1yisAllowed=y

Ferreira, A., Carreiras, C., Rodriguez, A., Vale, J., Amaro, M., Roels, G., y Rodrigues, M. (2006). MIB-1 labelling indices according to clinico-pathological variables in canine mammary tumours: A multivariate study. *Anticancer Research*, *26*(3 A), 1821–1826. https://ar.iiarjournals.org/content/anticanres/26/3A/1821.full.pdf

García, L., Merinero, M., Herrera de la Muela, M., Argüelles, M., Ojeda, F., y López, A. (2003). Cáncer de mama: utilidad pronóstica de los nuevos marcadores tumorales. *Revista Senología y Patol Mam*, *16*(2), 58–65. https://www.sespm.es/wp-content/uploads/revista/2003_16_2/4.pdf

Goldschmidt, M., Peña, L., Rasotto, R., y Zappulli, V. (2011). Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, *48*(1), 117–131. https://doi.org/10.1177/0300985810393258

Izquierdo, M., Rezola, R., y Urruticoechea, A. (2016). Factores pronósticos y predictivos en cáncer de mama temprano. En *Revista Argentina de Mastología* (Vol. 36, Número 128). https://www.revistasamas.org.ar/revistas/2016_v36_n128/4.pdf

Kadthur, J., Rao, S., Sonnahallipura, B., Thimmanahalli, D., y Laxmikanth, S. (2011). Prognostic value of Ki 67 proliferation antigen in canine malignant mammary gland tumours. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, *4*(1), 36–40.

Kanyılmaz, G., Yavuz, B. B., Aktan, M., Karaağaç, M., Uyar, M., y Fındık, S. (2019). Prognostic Importance of Ki-67 in Breast Cancer and Its Relationship with Other Prognostic Factors. *European Journal of Breast Health*, *15*(4), 256–261. https://doi.org/10.5152/ejbh.2019.4778

Kreipe, H., Harbeck, N., y Christgen, M. (2022). Clinical validity and clinical utility of Ki-67 in early breast cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, *14*, 1–10. https://doi.org/10.1177/17588359221122725

Kreitz, S., Fackelmayer, F., Gerdes, J., y Knippers, R. (2000). The proliferation-specific human Ki-67 protein is a constituent of compact chromatin. *Experimental Cell Research*, *261*(1), 284–292. https://doi.org/10.1006/excr.2000.5064

Lecaros, J. (2019). *´´Estudio retrospectivo de la frecuencia y caracterización de as principales neoplasias presentes en el perro doméstico (Canis lupus familiaris) en el hospital veterinario terán del distrito de Yanahuara, Arequipa periodo 2014-2016´´* [Universidad Católica de Santa María]. https://repositorio.ucsm.edu.pe/server/api/core/bitstreams/370a597e-62b3-4971-

8598-63420665022f/content

Leiva, L., Carrero, Y., Quishpe, G., Villacís, S., Chicaiza, J., y Arias, S. (2021). Marcadores tumorales pronósticos en cáncer de mama: BAX y BCL-2 prognostic tumor markers in breast cancer: bax and Bcl-2. *Enfermería Investiga*, *7*(1), 24–31. https://revistas.uta.edu.ec/erevista/index.php/enfi/article/view/1475/1276

Lipa, J., Perales, R., Fernández, V., Santillán, G., y Gavidia, C. (2019). Frecuencia de neoplasias en glándula mamaria de caninos diagnosticadas histopatológicamente en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, periodo 2007- 2016. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru*, *30*(3), 1042–1049. https://doi.org/10.15381/rivep.v30i3.16592

Merlo, W., Vargas, V., Insfrán, R., Benítez, J., y Rosciani, A. (2013). Determinación de receptores de estrógeno beta en carcinomas mamarios caninos. *Revista Veterinaria*, *24*(1), 10–13. https://doi.org/10.30972/vet.2411142

Molina, R., Matsumura, P., y Frechero, N. (2011). An easy cell counting method for immunohistochemistry that does not use an image analysis program. *Histopathology*, *59*(4), 801–803. https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.03954.x

Morales, A. (2014). Estudio retrospectivo de la casuística de tumores mamarios en pequeños animales en un servicio privado de anatomía patológica veterinaria en Caracas-Venezuela. *Revista Electronica de Veterinaria*, *15*(10), 1–9. https://www.redalyc.org/pdf/636/63637999008.pdf

Nielsen, T., Leung, S., Rimm, D., Dodson, A., Acs, B., Badve, S., Denkert, C., Ellis, M., Fineberg, S., Flowers, M., Kreipe, H., Laenkholm, A., Pan, H., Penault, F.,

Polley, M. Y., Salgado, R., Smith, I., Sugie, T., Bartlett, J., … Hayes, D. (2021). Assessment of Ki-67 in Breast Cancer: Updated Recommendations From the International Ki-67 in Breast Cancer Working Group. *Journal of the National Cancer Institute*, *113*(7), 808–819. https://doi.org/10.1093/jnci/djaa201

Owen, L. (1980). TNM Classification of tumours in domestic animals. *World Health Organisation*, 1–52. http://www.cabdirect.org/abstracts/19812266568.html

Pajoy, A. (2022). *Carcinoma mamario en un canino atendido en la clínica veterinaria pequeñas especies de la ciudad de Envigado, Antioquia*. http://repository.unilasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/3447/1/1152226986.pdf

Parraga, G. E. (2019). *Influencia de la Progesterona en el desarrollo de tumores mamarios en perras de la clínica docente de especialidades veterinarias.* http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/15064

Penault, F., Goubar, A., Raoelfis, I., Sagan, C., Lacroix, M., Denoux, Y., Verrielle, V., Jacquemier, J., Martin, A., Roche, H., y Andre, F. (2012). Discrepancias entre patólogos en la evaluación de Ki-67 en el ensayo PACS01: un factor de pronóstico independiente. Journal of Clinical Oncology, 30(15), https://doi.org/10.1200/jco.2012.30.15_suppl.543

Peña, L., Nieto, A., Pérez, D., Cuesta, P., y Castaño, M. (1998). Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: Relationship to clinical and pathologic variables. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *10*(3), 237–246. https://doi.org/10.1177/104063879801000303

Peñafiel, M. A. (2022). *Estudio retrospectivo de tumores mamarios en perras (Canis*

lupus familiaris) no esterilizadas [Universidad Politécnica Salesiana]. http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/23726

Pereira, M., Nosach, N., Fidanza, M., Mantica, F., Maubecin, E., Mira, G., y Marquéz, A. (2019). *Técnica del antígeno Ki-67 en tumores mamarios caninos: su implicancia en la sobrevida global y su correlación con otros factores pronósticos*. *XXVI*(June), 1–261.

Pérez, R., Álvarez, M. C., Santacruz, F., y Maldonado, A. E. (2020). Risk factors associated with canine mammary neoplasm in the Hospital of the Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad Nacional de Asunción. *Compendio de Ciencias Veterinarias*, *10*(2), 42–45. https://doi.org/10.18004/compend.cienc.vet.2020.10.02.42

Reyes, P. A. (2022). *Índice de proliferacion celular por Ki-67 con ImageJ*. https://noesis.uis.edu.co/server/api/core/bitstreams/bf38812b-9bec-4cfa-9256-cbf2d72e6f12/content

Rios, G. (2016). *Comparación de tres métodos de Cuantificación del Índice Ki 67 y Significancia Clínica en Tumores Neuroendocrinos Diagnosticados en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas*. https://repositorio.urp.edu.pe/handle/20.500.14138/1698

Salas, Y., Márquez, A., Diaz, D., y Romero, L. (2015). Epidemiological study of mammary tumors in female dogs diagnosed during the period 2002-2012: A growing animal health problem. *PLOS ONE*, *10*(5), 1–15. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127381

Sánchez, F., y Guarín, C. (2014). Tumores de glándula mamaria en caninos. *Cultura*

Científica, *0*(3), 60–78. http://www.revistasjdc.com/main/index.php/ccient/article/view/69

Santos, T., Castro, J. R., Andrade, J., Silva, A., Silva, G., Ferreira, F., Headley, S., y Saut, J. P. (2020). Risk factors associated with mammary tumors in female dogs. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, *40*(6), 466–473. https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6360

Sanz, M., Gómez, A., y Silva, A. (2021). El sistema inmune y el microambiente tumoral: componentes y función. *Medicine (Spain)*, *13*(33), 1932–1941. https://doi.org/10.1016/j.med.2021.05.006

Scholzen, T., y Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*, *182*(3), 311–322. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9

Seung, B. J., Cho, S. H., Kim, S. H., Bae, M. K., Lim, H. Y., Kwak, S. W., y Sur, J. H. (2021). Impact of Histological Subtype on Survival in Canine Mammary Carcinomas: a Retrospective Analysis of 155 Cases. *Journal of Comparative Pathology*, *186*, 23–30. https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2021.05.002

Silva, A., Consalter, A., Santos, B., Monteiro, A., Reis, A., y Silva, J. (2021). Immunohistochemical expression of HER - 2 and Ki - 67 in granulosa cell tumor in bitches. *Reproduction in Domestic Animals*, *56*(4), 667–672. https://doi.org/10.1111/rda.13903

Sinche, K. P. (2022). *Relación Entre El Nivel De Estrógenos Y La Presencia De Tumores Mamarios En Perras Atendidas En La Clínica Veterinaria Utmach*

[Universidad Técnica de Machala]. http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/18508/1/TTUACA-2022-MV-DE00016.pdf

Sleeckx, N., De Rooster, H., Veldhuis Kroeze, E., Van Ginneken, C., y Van Brantegem, L. (2011). Canine mammary tumours, an Overview. *Reproduction in Domestic Animals*, *46*(6), 1112–1131. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01816.x

Sorenmo, K., Rasotto, R., Zappulli, V., y Goldschmidt, M. (2011). Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Veterinary Pathology*, *48*(1), 85–97. https://doi.org/10.1177/0300985810389480

Starborg, M., Gell, K., Brundell, E., y Höög, C. (1996). The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *Journal of Cell Science*, *109*(1), 143–153. https://doi.org/10.1242/jcs.109.1.143

Takagi, M., Matsuoka, Y., Kurihara, T., y Yoneda, Y. (1999). Chmadrin: A novel Ki-67 antigen-related perichromosomal protein possibly implicated in higher order chromatin structure. *Journal of Cell Science*, *112*(15), 2463–2472. https://doi.org/10.1242/jcs.112.15.2463

Torres, V., y Eslava, M. (2007). Tumores mamarios en caninos: Adenocarcinoma complejo de glándula mamaria con metástasis a ganglio linfático regional. *Orinoquia Universidad De Los Llanos*, *11*, 12.

Tungurahua Turismo. (21 de junio de 2022). Cevallos turismo. https://tungurahuaturismo.com/es-ec/tungurahua/cevallos/ciudades/cevallos-turismo-abaa4dafc

Urruticoechea, A., Smith, I., y Dowsett, M. (2005). Proliferation Marker Ki-67 in Early Breast Cancer. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, *23*(28), 7212–7220. https://doi.org/10.1200/JCO.2005.07.501

Valdespino, V., Valdespino, P., y Valdespino, V. (2015). Interacción de las vías de señalización intracelulares participantes en la proliferación celular: potencial blanco de intervencionismo terapéutico. *Cirugía y Cirujanos*, *83*(2), 165–174. https://doi.org/10.1016/j.circir.2015.04.015

Vaquero, P. G. (2023). *Evaluación de los efectos de un antiprogestágeno en la glándula mamaria y en la sobrevida de pacientes caninos con neoplasias mamarias* (Vol. 13, Número 1). https://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/160507

Velandia, V. (2014). Analisis retrospectivo sobre la presentacion de neoplasias en la glandula mamaria en caninos en la clínica de pequeños animales de la Universidad de la Salle en la ciudad de Bogotá [Universidad de la Salle]. En *Pontificia Universidad Catolica del Peru* (Vol. 8, Número 33). https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1262ycontext=medicina_veterinaria

Vezzani, B., Carinci, M., Previati, M., Giacovazzi, S., Della Sala, M., Gafà, R., Lanza, G., Wieckowski, M., Pinton, P., y Giorgi, C. (2022). Epigenetic Regulation: A Link between Inflammation and Carcinogenesis. *Cancers*, *14*(5), 1–19.

https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ cancers14051221

Vinueza, R., Cabrera, F., Donoso, L., Pérez, J., y Díaz, R. (2017). Frecuencia de Neoplasias en Caninos en Quito, Ecuador. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, *28*, 9. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v28i1.12931

Yang, W., Liu, C., Chang, C., Lee, C., Chang, K., y Lin, C. (2006). Proliferative activity, apoptosis and expression of oestrogen receptor and Bcl-2 oncoprotein in canine mammary gland tumours. *Journal of Comparative Pathology*, *134*(1), 70–79. https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.07.002

Zapata, M., y Gallardo, F. (2024). Revisión bibliográfica del procesamiento diagnóstico de tumores de mama en perras. *Ciencia Latina*, *8*(1), 10982–10995. https://doi.org/https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i1.10410

Zuccari, D., Pavam, M., Terzian, A., Pereira, R., Ruiz, C., y Andrade, J. (2008). Immunohistochemical evaluation of e-cadherin, Ki-67 and PCNA in canine mammary neoplasias: Correlation of prognostic factors and clinical outcome. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, *28*(4), 207–215. https://doi.org/10.1590/s0100-736x2008000400003

ANEXOS

ANEXO A

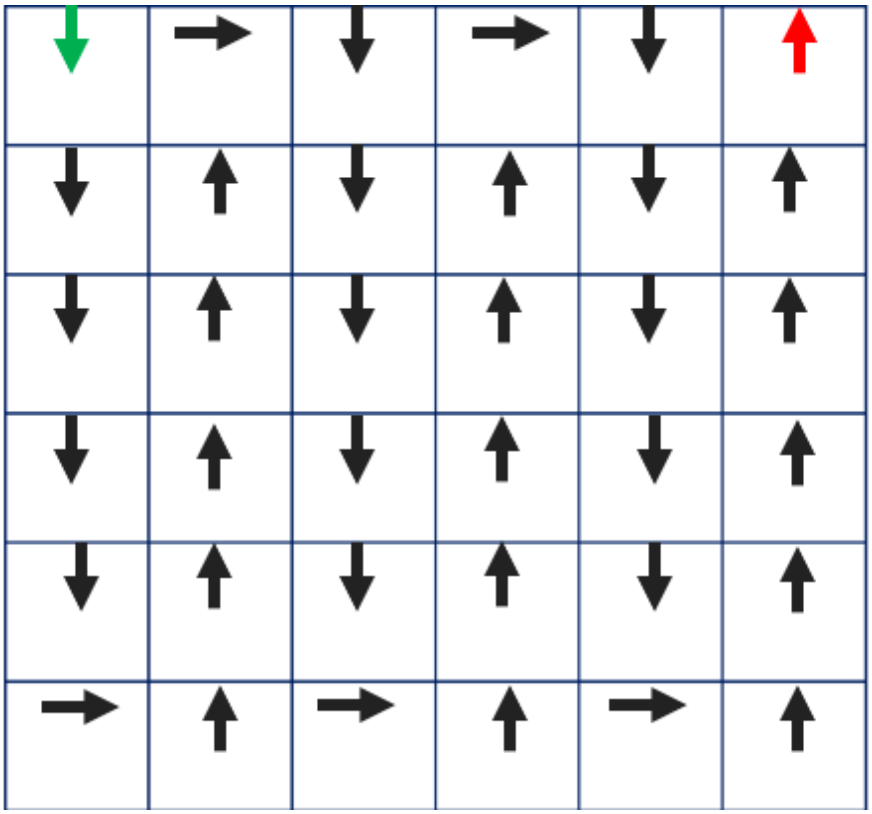
Formato de registro para pacientes con neoplasias mamarias

DATOS DEL PACIENTE		
Nombre del paciente:	_____	
Especie:	*Canis lupus familiaris*	
Sexo:	Macho _____	Hembra _____
Esterilizado:	Si _____	No _____
Raza:		
Edad:	___ años	
Nombre del propietario:	_____	

DATOS DE LA MUESTRA		
Fecha y hora de la toma:	__/__/202_ __:__	
Tamaño:	_____	
Extracción:	Biopsia	Incisional ____
		Excisional ____
DATOS DEL REMITENTE		
Clínica/hospital:	Clínica Veterinaria ´´Centro´´	
Dirección:	Darquea 0543 - Ayllón, Ambato, Ecuador	
Teléfono:	099 603 8363	
Médico tratante:	MVZ. Jenny Lozada. Msc.	
Correo:	veterinariacentro@gmail.com	

ANEXO B

Cuadricula utilizada para conteo de Ki-67



La cuadricula está dividida en 36 cuadros con las mismas dimensiones. La flecha verde indica el campo de inicio, el conteo continúa en dirección a las flechas y finaliza al llegar a la flecha roja.

ANEXO C

Datos recolectados de los pacientes caninos incluidos en el estudio

NOMBRE	SEXO	ESTERILIZADO	RAZA	EDAD	N° MUESTRA	Tamaño del eje mayor (cm)	Tamaño tumoral (OMS)	Grado histopatológico de malignidad (Goldschmidt et al., 2011)	Índice de proliferación Ki-67 (%)
Gotita	Hembra	No	French Poodle	13	1	4	T2	II	10,27
Mia	Hembra	No	French Poodle	12	2	1,4	T1	II	10,07
Donatella	Hembra	No	Yorkshire	8	3	3	T2	II	17,03
Luna	Hembra	No	French Poodle	9	4	5	T2	I	9,49
Pelusa	Hembra	No	French Poodle	12	5	3	T1	II	13,97
Luna	Hembra	Si	Labrador Retriever	10	6	3	T2	II	67,68
Bebe	Hembra	No	Cocker Spaniel	14	7	5	T2	I	9,78
Sofia	Hembra	No	Mestizo	10	8	2,5	T1	I	1,69
Hanna	Hembra	No	French Poodle	13	9	2,7	T1	I	7,76
Lucy	Hembra	No	Mestizo	14	10	4,5	T2	I	5,09
Kiara	Hembra	No	Mestizo	9	11	5,5	T2	III	19,83
Fiona	Hembra	No	Mestizo	14	12	2	T1	I	4,42
Linda	Hembra	Si	Boxer	9	13	4	T2	I	7,68
Zoe	Hembra	Si	Mestizo	10	14	4	T2	II	12,35
Rosita	Hembra	No	Mestizo	10	15	2,5	T1	I	7,55
Victoria	Hembra	No	Mestizo	9	16	4,5	T2	II	10,32
Blanquita	Hembra	No	Mestizo	5	17	2	T1	I	2,4
Cherly	Hembra	Si	French Poodle	9	18	4,5	T2	I	18,55
Susy	Hembra	Si	Golden Retriever	12	19	5	T2	II	26,09
Rosa	Hembra	No	Mestizo	10	20	4,5	T2	I	14,73

I = grado de malignidad tipo 1, II = grado de malignidad tipo 2, III= grado de malignidad tipo 3. T 1 < 3 cm, T 2 = 3-5 cm, y T 3 > 5 cm.

ANEXO D

Análisis en Infostat: Relación entre grado de malignidad y Ki-67

Tablas de contingencia

Frecuencias: Frecuencia

Frecuencias absolutas
En columnas: Ki-67

Grado	>30%	10-30%	1-9%	Total
I	0	2	9	11
II	1	7	0	8
III	0	1	0	1
Total	1	10	9	20

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	13,84	4	0,0078
Chi Cuadrado MV-G2	17,77	4	0,0014
Coef.Conting.Cramer	0,48		
Kappa (Cohen)	0,13		
Coef.Conting.Pearson	0,64		

ANEXO E

Anexo 1. Pacientes con tumores mamarios



Anexo 2. Biopsia de neoplasias mamarias caninas



Anexo 3. Muestras recolectadas de neoplasias mamarias



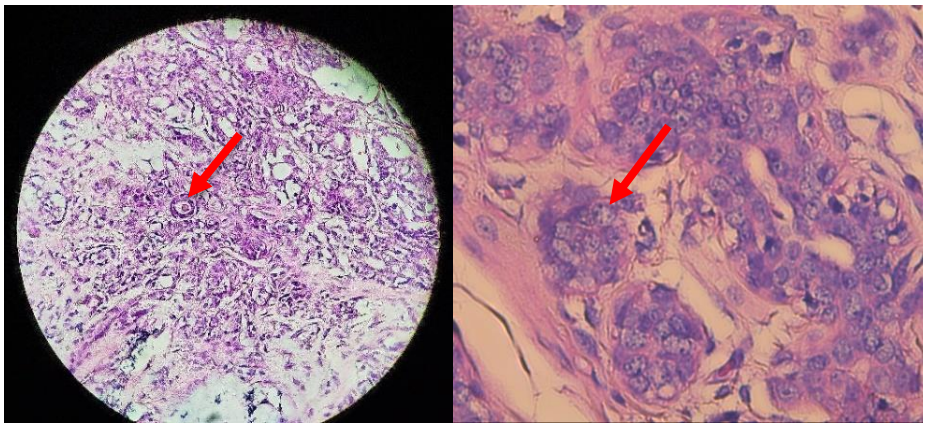
Anexo 4. Medición de neoplasias mamarias caninas



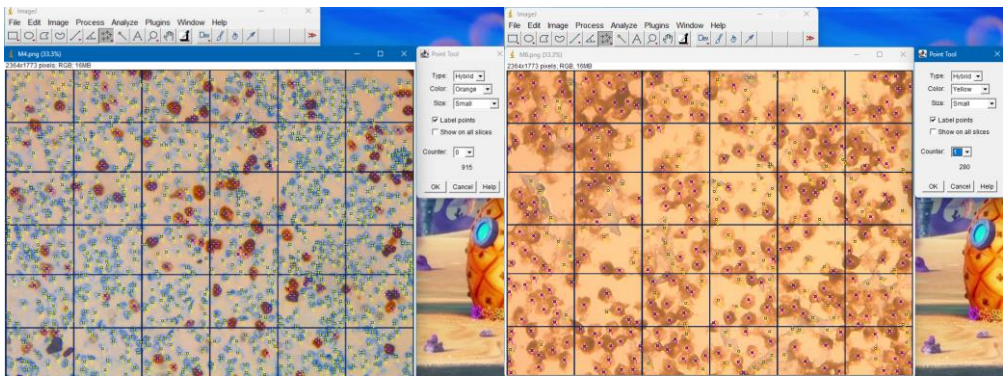
Anexo 5. Evaluación microscópica inmunohistoquímica



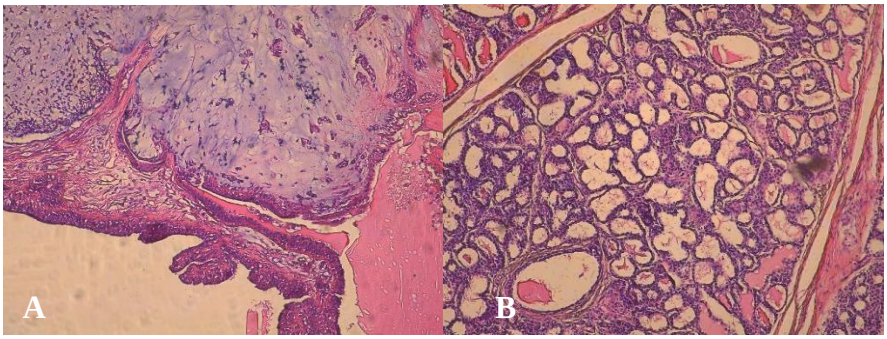
Anexo 6. Izquierda. Se presenta la imagen histopatológica se pueden evidenciar células pleomórficas de varios tamaños. **Derecha**. se puede evidenciar un elevado número de nucleolos.



Anexo 7. Conteo celular inmunohistoquímico de ki-67 mediante el programa de análisis ImageJ



Anexo 8. Imágenes de placas histopatológicas. **A.** Metaplasia condroide. **B.** Elevada formación de túbulos, más del 75%.



Anexo 9. Imágenes de placas inmunohistoquímicas. **A.** Índice de Ki-67: 13,57%. **B.** Índice de Ki-67: 22,81%**.**

