

Yaritza Salas^{1,2*}
0000-0003-2129-3124
Enrique Aburto³
0000-0001-9190-0044
Rogelio A. Alonso⁴
0000-0002-4159-1682
Adelys Márquez⁵
0000-0001-6286-6043
Hortensia Corona⁶
0000-0002-3751-8319
Laura Romero⁷
0000-0002-5158-8129

¹Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud y Producción Animal
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México
Av. Universidad 3000, Ciudad de México
04510, México

²Departamento de Patología
⁵Departamento de Fisiología
Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado"
Núcleo Héctor Ochoa Zuleta
Final Avenida Ribereña
Cabudare 3023, Lara, Venezuela

³Department of Pathology and Microbiology
University of Prince Edward Island
550 University Avenue, Charlottetown
Prince Edward Island, Canada C1A 4P3

⁴Departamento de Genética y Bioestadística
⁶Departamento de Medicina, Cirugía y Zootecnia
en Pequeñas Especies

⁷Departamento de Patología
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México
Av. Universidad 3000, Ciudad de México
04510, México

***Autor para correspondencia:**
Tel: 044-55-4554-1442
Correo electrónico:
ysalas@ucla.edu.ve

Recibido: 2015-07-30
Aceptado: 2016-03-14
Publicado: 2016-03-28

Información y declaraciones adicionales
en la página 11

© Derechos de autor:
Yaritza Salas *et al.* 2016

acceso abierto 



Distribuido bajo una Licencia Creative Commons
Atribución 4.0 Internacional (CC-BY 4.0)

Asociación histológica con factores potenciales de riesgo y tiempo de sobrevida en el tumor mamario canino

Resumen

Las características epidemiológicas y clínico-patológicas del tumor mamario canino es información valiosa para analizar el comportamiento de la enfermedad y son un recurso potencial para promover avances en el cáncer de mama en mujeres. El objetivo de este trabajo fue asociar las características histológicas del tumor mamario canino con factores potenciales de riesgo y el tiempo de sobrevida. De 80 perras enteras, se recolectaron 178 tumores mamarios. El análisis estadístico consistió en análisis de frecuencia de las variables de estudio, análisis bivariado con Chi cuadrado (χ^2), riesgo relativo, análisis de supervivencia Kaplan-Meier y un análisis de correspondencia múltiple que se utilizó para correlacionar el comportamiento biológico del tumor con la raza de las perras. La mayoría de las pacientes fueron mayores de 8 años de edad, con al menos un tumor maligno, casi siempre solitario, de gran tamaño y de mal pronóstico. Los tumores más frecuentes fueron el adenoma complejo, el tumor mixto benigno, el carcinoma complejo y el carcinoma tipo mixto. Las razas afectadas con mayor frecuencia fueron el Poodle, Cocker Spaniel y Dachshund; sólo el Cocker, el Labrador y el Pastor Alemán mostraron mayor riesgo. En general, los datos indican que el tumor mamario canino afecta sobre todo a hembras enteras, adultas mayores de 8 años de diversas razas; cursa con mortalidad alta y sobrevida corta en pacientes con tumor maligno de gran tamaño; sin embargo, las razas más afectadas no necesariamente son las más predisuestas. Este estudio no corrobora que exista un mayor riesgo de tumor mamario canino en perras núlparas.

Palabras clave: Tumor mamario canino; Epidemiología; Sobrevida, Características clínico-patológicas.

Introducción

El tumor mamario canino (TMC) es la neoplasia más frecuente en perras enteras, varía de tamaño, desde unos pocos milímetros hasta unos cuantos centímetros, puede ser múltiple (cerca del 50% de los casos) y usualmente involucra glándulas caudales (Wey *et al.*, 2000). En histología, el TMC se clasifica en tumores epiteliales malignos (carcinomas), tipos especiales de carcinomas, tumores

mesenquimales malignos (sarcomas), carcinosarcomas y neoplasias benignas. (Goldschmidt *et al.*, 2011).

Algunos factores de riesgo asociados con tumores de glándula mamaria son el género y la raza. Las hembras no castradas son las de mayor riesgo debido "al tropismo por la glándula mamaria que presentan los estrógenos naturales" (Yu, 2002). Asimismo, estudios epidemiológicos han descrito mayor susceptibilidad en razas de talla pequeña, entre ellas la Poodle, Maltés, Chihuahua, Cocker Spaniel, Springer Spaniel Inglés, Beagle, Yorkshire Terrier, Bichon Frisé, Springer Spaniel, Irish Setter y Pastor Alemán (Bronden *et al.*, 2010). En un estudio retrospectivo que incluye biopsias de perras que mostraron lesiones de glándulas mamarias, Salas *et al.* (2015) observaron las características epidemiológicas de los tumores mamarios caninos y concluyeron con lo siguiente: 1) alta incidencia (16.8%) de tumores mamarios en perras enteras, 2) frecuencias similares en tumores benignos (47.7%) y malignos (47.5%), 3) los tumores epiteliales fueron los más comunes, 4) las más afectadas fueron hembras adultas seniles (9 a 12 años), de raza pura y de tamaño pequeño (Poodle y Cocker Spaniel), y 5) la cantidad de tumores malignos se incrementó en los últimos cuatro años del estudio. Por lo tanto, los investigadores infieren que los tumores mamarios en las perras representan un reto importante que necesita ser atendido y requiere fortalecer los servicios de oncología veterinaria en México.

El incremento en los casos de enfermedad neoplásica en medicina veterinaria, entre ellas las neoplasias mamarias, demanda un mayor desarrollo de la oncología veterinaria; en tal sentido, estudios que correlacionan características histológicas con resultados clínicos, así como aquellos que definen los factores de riesgo más importantes, asociados con el desarrollo y comportamiento de los TMC, son de gran utilidad para entender la enfermedad.

Esta investigación, que obtiene sus datos de una muestra de casos de población canina en México, proporciona información valiosa para fortalecer el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de pacientes con TMC, comparable con datos equivalentes a los de otros países. También provee información importante para avanzar en el estudio de marcadores moleculares que puedan ayudar a mejorar la agudeza diagnóstica, el pronóstico y las opciones de tratamiento para las pacientes con cáncer mamario. Sumado a esto, dado que las perras con tumor mamario espontáneo han demostrado ser un modelo animal por excelencia (Gama *et al.*, 2008; Cassali *et al.*, 2006), el conocer los diferentes aspectos clínico-patológicos del TMC es un recurso potencial para el estudio del cáncer de mama en mujeres. El objetivo de este trabajo fue describir la asociación entre las características histológicas, los factores de riesgo y la supervivencia de los perros con tumores mamarios en un hospital veterinario de referencia en México. Asimismo, la hipótesis planteada presume que existe asociación entre las características histológicas, los factores de riesgo y la supervivencia, en las perras con tumores mamarios evaluados.

Material y métodos

Se estudiaron 80 pacientes con tumores mamarios, sometidas a nodulectomía o mastectomía entre febrero de 2012 y octubre de 2013, que acudieron a consulta al Hospital Veterinario de Especialidades de la Facultad de Medicina Veterinaria

y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El muestreo realizado fue por conveniencia, donde se seleccionaron los casos típicos (Casal, 2003). Para el estudio de los tumores mamarios se contó con el consentimiento de los propietarios de las pacientes.

En vista de que la mayoría de las pacientes tenían más de una masa tumoral, se analizaron un total de 178 tumores mamarios diferentes. Para el cálculo del riesgo relativo (RR) se adicionaron 80 pacientes mayores de 4 años de edad, que acudieron a consulta por una causa diferente a TMC durante el mismo lapso de estudio. Se obtuvo información sobre edad, raza, condición corporal y datos ginecológicos (ovn y paridad) de estos pacientes.

El número y tamaño de los tumores se obtuvo a partir de la pieza quirúrgica proveniente de cada paciente en estudio, si eran tumores únicos o múltiples, de ser múltiples, cuántas masas presentaban y el tamaño en centímetros medidos en el eje mayor. Para la clasificación histológica, el tejido fue fijado en formol buferado al 10% durante 48 horas y procesado para obtener cortes de 5 μ de espesor mediante el uso de micrótomos; cada tejido se tiñó con Hematoxilina & Eosina (H&E) (Thomas, 1995). Cada corte histológico se observó en toda su extensión en un microscopio óptico (Leica DMER) y se clasificó según su arreglo histológico, grado de diferenciación y evidencia de invasión (estromal y vascular), para definir su histogénesis (epitelial, tipo mixto y mesenquimal), su conducta biológica (benigno vs maligno) y su clasificación morfológica según Goldschmidt *et al.* (2011). Tres expertos consensuaron la clasificación histológica. Los factores de riesgo considerados fueron la edad, la raza, la condición corporal (con base en una escala del 1 al 5, donde: 1 = emaciación, 2 = bajo peso, 3 = ideal, 4 = sobrepeso y 5 = obesa, y datos ginecológicos.

Para conocer la recidiva y la sobrevida, cada seis meses, durante 18 meses post-cirugía, se dio seguimiento a las 80 pacientes para corroborar si habían reincidentado, generado metástasis o si habían fallecido por causas sugerentes de la enfermedad mamaria, basada en la evidencia de metástasis por datos clínicos; a algunas pacientes se les estudió con rayos-X, otra tenía radiografías y ultrasonido, y a otras sólo se les había practicado examen físico.

El análisis estadístico se llevó a cabo con el software estadístico SPSS. Consistió en análisis univariados, cálculo de las frecuencias de las diferentes variables en estudio, análisis bivariados con la prueba Chi cuadrado χ^2 , cálculo del Riesgo Relativo y el análisis de sobrevida Kaplan-Meier. La significancia estadística se consideró a un valor de $P < 0.05$. Se analizó la correspondencia múltiple (ACM) (Costa *et al.*, 2013) entre el comportamiento biológico del tumor y las razas de las perras. Las gráficas se construyeron con el paquete informático Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., USA).

Resultados

Número y tamaño de los tumores

De las 80 pacientes en estudio, a sólo 25 perras se les detectaron tumores únicos (31.3%); en la mayoría de las pacientes (55), los tumores fueron múltiples y en diferentes glándulas mamarias (68.7%). En total se analizaron 178 tumores. Las masas tumorales encontradas fueron dos en 33.1% (59/178) de los casos y tres,

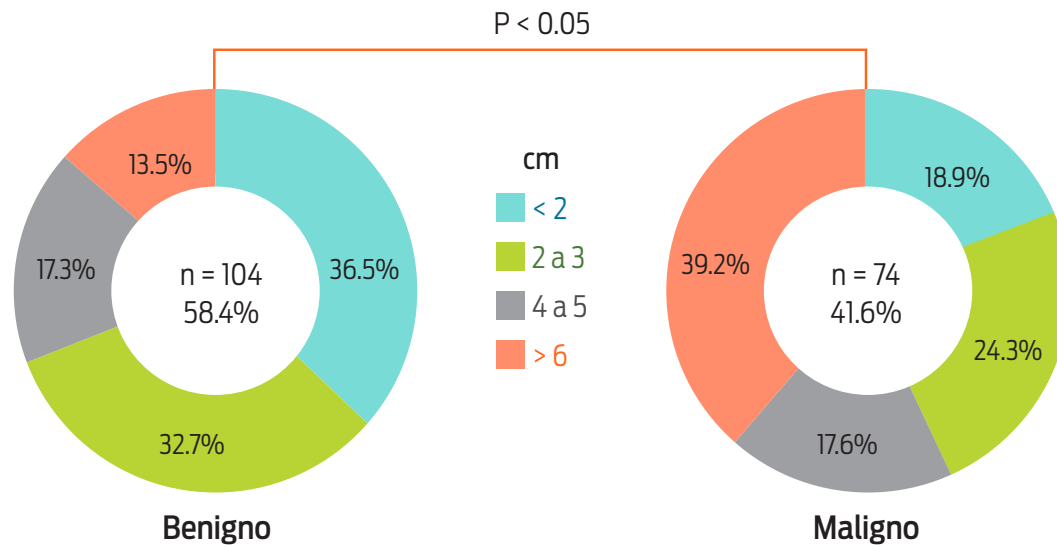


Figura 1. Frecuencia del tumor mamario canino según el tamaño (cm).

en 25.8% (46/178); con una frecuencia menor se encontraron pacientes con 11 (5/178; 2.8%) y 18 (4/178; 2.2%) masas. De estos 178 tumores, 104 (58.4%) fueron tumores benignos y 74 (41.6%), malignos; además, los tumores solitarios malignos (15/74; 20.3%) fueron más frecuentes (χ^2 P = 0.04) que los solitarios benignos (10/104; 9.6%).

El tamaño del eje mayor de las masas tumorales fue muy variado: los de mayor frecuencia fueron < 3 cm (104/178; 58.4%), seguidos por los > 6 cm (43/178; 24.2%) y los de menor frecuencia, de 4 a 5 cm (31/178; 17.4%). También se correlacionó el comportamiento biológico con respecto al tamaño de las masas tumorales, donde se observó una diferencia altamente significativa (χ^2 P < 0.05): las neoplasias benignas tendieron a ser < 3 cm y las malignas, > 6 cm (figura 1).

Clasificación morfológica del TMC

Basados en el análisis histológico del total de las masas tumorales, los tumores mamarios benignos fueron más frecuentes que los malignos; sin embargo, la mayoría de las perras presentó tumores múltiples, tanto benignos como malignos. Se observó que 60% (48/80) de las pacientes generaron al menos un tumor mamario maligno, mientras que 40% (32/80), sólo tumores benignos.

En la figura 2 se grafica la frecuencia de los tipos histológicos encontrados. De las neoplasias mamarias benignas, los adenomas complejos (AC) fueron los más frecuentes (42/104, 40.4%), seguidos de los tumores mixtos benignos (TMB) (30/104, 28.8%). De las neoplasias malignas, las más frecuentes fueron los carcinomas simples (CS) (18/74, 24.3%), los carcinomas complejos (CC) (11/74, 14.9%) y los carcinomas tipo mixto (CTM) (9/74, 12.6%). Por otra parte, al analizar la frecuencia del TMC según el tejido de origen que lo conforma, se evidenció una distribución similar entre los de tipo mixto y los epiteliales; al discriminar según su comportamiento biológico, en los benignos fueron más frecuentes las neoplasias tipo mixtas (67%), mientras los malignos tendieron a ser epiteliales (51%). La diferencia fue altamente significativa entre los grupos (χ^2 P < 0.05).

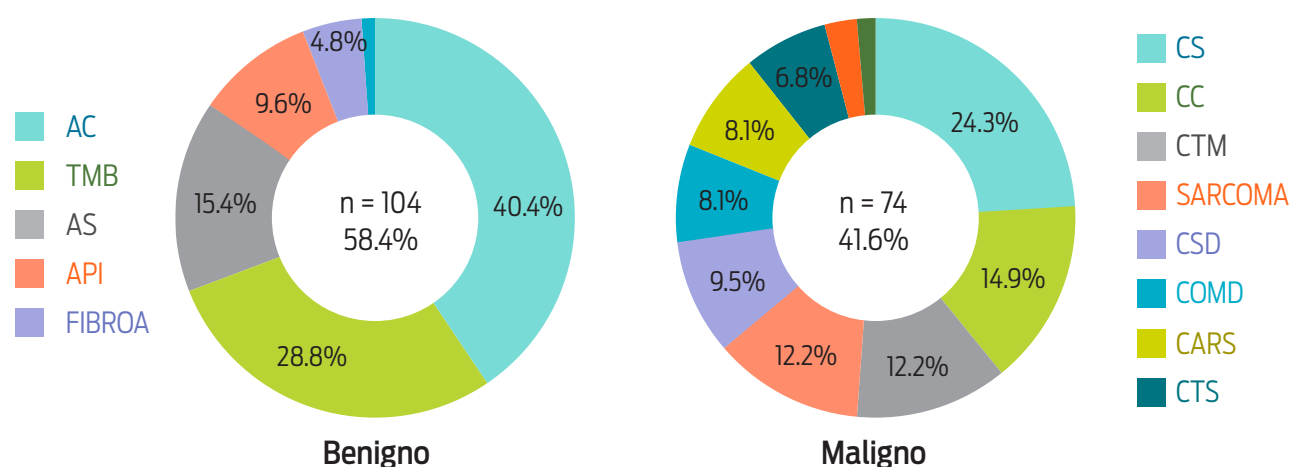


Figura 2. Frecuencia del tumor mamario canino según su clasificación morfológica.

AC: adenoma complejo; TMB: tumor mixto benigno; AS: adenoma simple; API: adenoma papilar intraductal; FIBROA: fibroadenoma; CS: carcinoma simple; CC: carcinoma complejo; CTM: carcinoma tipo mixto; SARCOMA: sarcoma; CSD: carcinoma sólido; COMD: comedocarcinoma; CARS: carcinosarcoma; CTS: carcinomas tipo especiales.

Factores de riesgo asociados al TMC

- **La edad:** el rango de edades de las pacientes que expresaron la enfermedad fue amplio (3 a 16 años); la mayor frecuencia fue a los 8 años (20%), luego a los 12 (16.3%), a los 11 (13.7%) y a los 9 (10%). En general, las más afectadas fueron perras adultas mayores de 7 años (67.5%), que presentaron tanto TMC benignos (50%) como malignos (50%). En perras mayores a 13 años, la relación se inclinó hacia los TMC malignos (92.3%), con un riesgo moderado ($RR = 1.9$) a desarrollar TMC y elevado ($RR = 12$) de que estos tumores fueran malignos (χ^2 $P < 0.05$) (cuadro 1).
- **La raza:** como se observa en el cuadro 1, existe una amplia variedad de razas afectadas con TMC. A pesar de que en las perras puras, el desarrollo de esta enfermedad es más frecuente que en las mestizas, no se evidenció un riesgo relativo importante que las predispusiera al padecimiento. Sin embargo, las mestizas sí mostraron un riesgo elevado a que sus tumores fueran malignos. En relación con la talla de las razas puras, las frecuencias más altas se encontraron en perras de talla pequeña y mediana, que no mostraron riesgo o éste fue un riesgo sin efecto ante la enfermedad. Entre las razas puras analizadas, la Poodle fue la más afectada, aunque su riesgo a la enfermedad fue relativamente bajo; en segundo lugar estuvo la Cocker Spaniel, con un riesgo moderado; la Dachshund mostró un riesgo moderado a padecer tumores malignos, aunque su riesgo ante el TMC fue menor. El Cobrador de Labrador tuvo la menor frecuencia de ocurrencia, pero su riesgo de cursar con tumores mamarios fue elevado y el riesgo de que esos tumores fueran malignos fue moderado; en las razas Rottweiler y Pastor Alemán el riesgo a desarrollar TMC fue moderado.

Cuadro 1. Riesgo relativo (RR) de presentar tumor mamario canino según la edad, talla, fenotipo racial y paridad

Variable		Nº total	Nº TMC	Nº No-TMC	Nº TMCM	Nº TMCB	RR TMC	RR TMCM
Edad	<7 años	49	17	31	9	8	0.5	1.1
	8 a 12 años	91	50	41	25	25	1.2	1.0
	>13 años	20	13	8	12	1	1.9	12.0
Talla	Pequeña	105	50	55	28	22	0.9	1.3
	Mediana	31	15	16	9	6	0.9	1.5
	Grande	24	15	9	8	7	1.7	1.1
Raza	Mestizos	23	9	14	7	2	0.6	3.5
	Puros	137	71	66	45	35	1.1	1.3
	Cocker	17	11	5	6	5	2.2	1.2
	Poodle	36	21	15	12	9	1.4	1.3
	Dachshund	14	8	6	5	3	1.3	1.7
	Schnauzer	15	4	11	2	2	0.4	1.0
	Labrador	8	6	2	4	2	3.0	2.0
	Rottweiler	3	3	0	1	2	-	0.5
	Pastor Alemán	3	2	1	2	0	2.0	-
Paridad	No	110	57	53	31	26	1.1	1.2
	Sí	50	23	27	14	9	0.9	1.6

TMC: Tumor mamario canino; TMCM: Tumor mamario canino maligno; TMCB: Tumor mamario canino benigno.

Datos ginecológicos

Prácticamente ninguna de las pacientes se castró antes del año y medio de edad (97.5%; 78/80), y la mayoría fue ovario-histerectomizada al momento de la mastectomía. También se observó que la mayoría de las perras con tumores mamarios eran núlparas; sin embargo, esta condición tuvo un riesgo insignificante de producir TMC (cuadro 1).

Condición corporal

Del total de perras evaluadas sometidas a cirugía, la condición corporal de la mayoría (53.8%; 43/80) fue de 3, seguidas por las de condición corporal 4 (28.8%; 23/80), las de condición corporal 5 (10%; 8/80) y, finalmente, las de condición corporal 2 (7.5%; 6/80). No se presentaron perras en condición corporal 1. Al relacionar la condición corporal de las pacientes con el comportamiento biológico de las neoplasias mamarias, 51.2% (22/43) y 48.8% (21/43) de las pacientes con condición corporal 3 presentaron tumores benignos y malignos, respectivamente, mientras que 73.9% (17/23) de las perras con condición corporal 4 tendieron a presentar tumores malignos, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa (χ^2 P > 0.05).

Recidiva y sobrevida

Dieciocho meses después de la cirugía, 15/80 (18.8%) pacientes presentaron nuevas masas tumorales. De estas pacientes reincidentes, 7/15 (46.7%) cursaron

con tumores benignos y 8/15 (53.3%), al menos con uno maligno ($P > 0.05$). La recidiva en pacientes con tumores benignos y malignos fue, entonces, proporcionalmente similar. Veinticuatro de 48 pacientes (50%) con al menos un tumor mamario maligno, murieron; se observó infiltración vascular en 18/24 (75%) de estas pacientes, de las cuales 14/18 (77.8%) murieron durante el periodo de estudio ($P < 0.05$).

Al analizar por separado la sobrevida de las perras con TMC benigno y maligno, se observó que las pacientes con tumores mamarios malignos tuvieron una sobrevida significativamente menor que aquéllas con neoplasias benignas ($P < 0.05$) (figura 3). De las pacientes con tumores malignos, 19/74 (25.7%) murieron durante el seguimiento post-quirúrgico y de éstas, 17/19 (89.5%) murieron días después de la cirugía o en el lapso de un año. Por otra parte, las pacientes con tumores menores a 2 cm tuvieron una sobrevida más larga que aquéllas con tumores mayores a 6 cm, lo que permite considerar al tamaño del tumor como un factor pronóstico importante ($P = 0.009$) (figura 4): las pacientes con CARS, COMD y CSD tuvieron una sobrevida corta, menor a 6 meses (mediana de 2, 5.5, y 6 meses de sobrevida, respectivamente), mientras que en las pacientes con CS, CC y CTM, la mediana de la sobrevida fue de 11 meses (figura 5).

Discusión

Similar a lo aquí encontrado, otros investigadores también demostraron que el tamaño de los tumores es un factor pronóstico importante: los tumores de menor tamaño tienden a ser masas múltiples benignas, y los de mayor tamaño, una masa solitaria y maligna. En el presente estudio, la sobrevida de las pacientes con tumores menores a 2 cm fue mayor que la de aquéllas con neoplasias mayores a 6 cm. Ferrari *et al.* (2009) encontraron que 80% de los tumores benignos eran < 5 cm, mientras que 87.1% de los malignos eran > 5 cm, lo que resalta la importancia de evaluar el tamaño del tumor, una medición de bajo costo y simple de realizar de forma rutinaria. De igual forma, Ressel *et al.* (2013) encontraron que el diámetro de los carcinomas (8 cm) era mayor que el de los adenomas mamarios (3 cm) y que la sobrevida era menor en perras con tumores > 5 cm.

Los tumores mamarios representan 50% de todas las neoplasias que afectan a las perras enteras (Oliveira *et al.*, 2003) y 41 a 53% de éstas son malignas (Fonseca y Daleck, 2000). En el presente estudio, 58.4% de los tumores resultaron ser benignos y 41.6%, malignos, proporción similar a la observada por Salas *et al.* (2015) en un estudio retrospectivo previo, llevado a cabo durante 11 años (2002-2012) en un laboratorio de referencia en la Ciudad de México. En este estudio, 47.8% de los tumores mamarios fueron benignos, 47.5% fueron malignos y 4.7% fueron lesiones mamarias no neoplásicas (hiperplasia, displasia o mastitis).

Desde el punto de vista morfológico, similar a lo hallado en este estudio, otros investigadores registraron que los tumores benignos más comunes son el tumor mixto benigno y el adenoma complejo; de los malignos, manifestaron que el más frecuente fue el carcinoma originado de tumores benignos previos, el carcinoma simple y el carcinoma complejo (Im *et al.*, 2014). Por su parte, Ressel *et al.* (2013) observaron que los adenomas complejos se encontraban entre las lesiones benignas más comunes y los carcinomas simples eran la variante maligna más habitual.

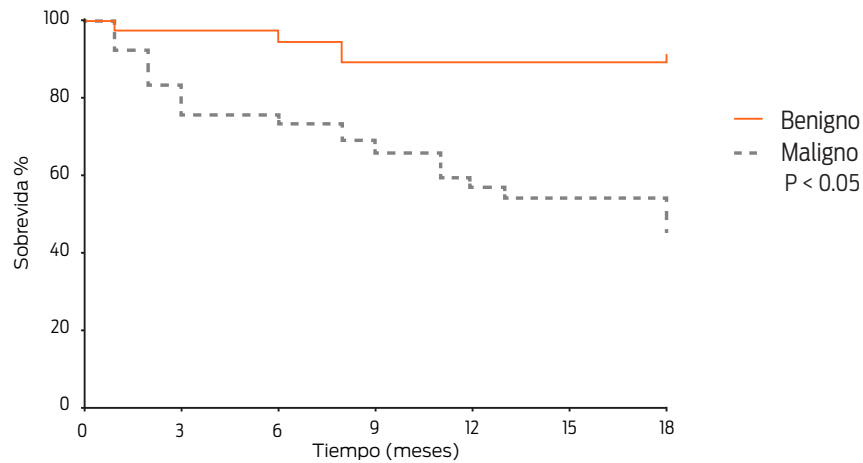


Figura 3. Análisis de supervivencia de las pacientes con tumor mamario canino benigno y maligno.

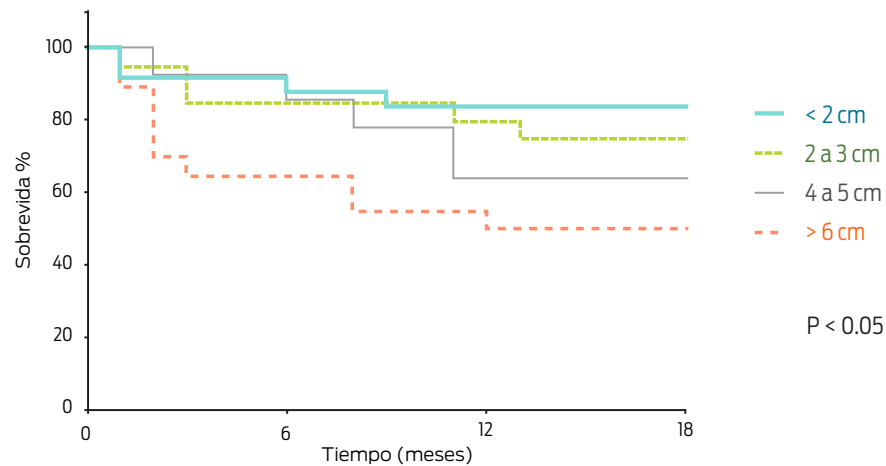


Figura 4. Análisis de supervivencia y su relación con el tamaño del tumor en pacientes con tumor mamario canino.

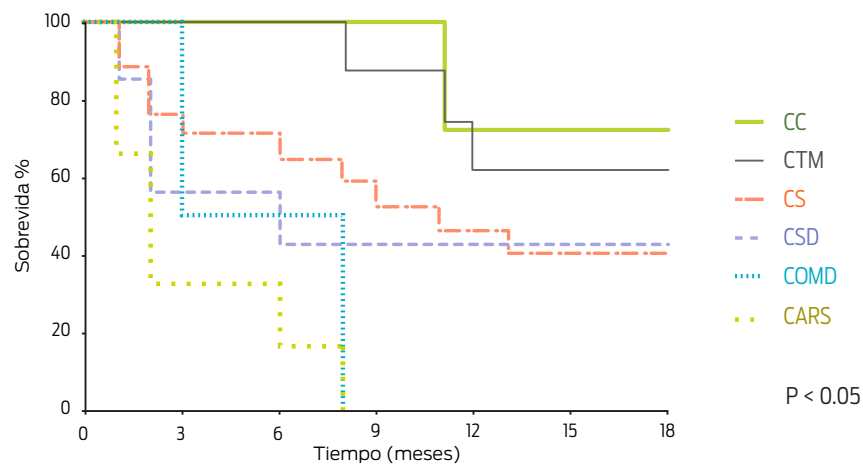


Figura 5. Análisis de supervivencia y su relación con el tipo histológico del tumor mamario canino. CS: carcinoma simple; CC: carcinoma complejo; CTM: carcinoma tipo mixto; CSD: carcinoma solido; COMD: comedocarcinoma, CARS: carcinosarcoma.

En cuanto a los factores de riesgo asociados a las neoplasias mamarias, los resultados del presente estudio fueron similares a los obtenidos en otros estudios epidemiológicos, que han reportado un amplio rango de edad en las pacientes con TMC. En este estudio, el rango de edad se encontró entre los 3 y 15 años, con una edad promedio de entre 8 y 12 años. De igual forma, *Kuldip et al. (2012)* reportaron la enfermedad en perras entre 2 y 16 años, con una media de 9 años; la incidencia fue mayor en aquéllas de 10 a 12 años (31.37 %). Asimismo, *Zatloukal et al. (2005)* encontraron que las perras mayores a los 13 años de edad mostraron un riesgo elevado de presentar tumores malignos.

La predisposición de raza reportada para el TMC es muy diversa. En este estudio se encontró que las razas más afectadas fueron las de talla pequeña; sin embargo, la ocurrencia de tumores mamarios se ha ido incrementando en las razas de talla grande, probablemente por la popularidad de esas razas en diferentes zonas geográficas (*Bronden et al. 2010*). *Rivera et al. (2009)*, en un estudio realizado en Suecia, hallaron que los Springer Spaniel ingleses mostraban una predisposición de 36% a generar cáncer de mama. Por su parte, *Egenvall et al. (2005)* reportaron una incidencia elevada en las razas Spaniel, Doberman, Pastor Alemán y Bóxer.

Es bien sabido que la popularidad de una raza varía entre países, lo que puede influir en los análisis de predisposición de raza (*Salas et al., 2015*); sin embargo, en este estudio se identificó un riesgo relativo moderado a padecer TMC en el Cocker Spaniel, y las perras Dachshund y las mestizas mostraron un mayor riesgo de desarrollar tumores mamarios malignos. En un estudio retrospectivo realizado en la Ciudad de México durante la última década (*Salas et al., 2015*), también se identificó que estas razas tienen predisposición al TMC. En otro estudio retrospectivo realizado en la República Checa de 1977 a 2001, *Zatloukal et al. (2005)* señalaron que el Poodle, el Schnauzer, el Cocker Spaniel y el Dachshund eran razas predispuestas a desarrollar neoplasias malignas. Sin embargo, estos autores no encontraron riesgo para TMC en razas de talla grande, contrario a lo hallado en el presente estudio, pues, a pesar de ser éstas razas menos populares, sí se manifestó un riesgo a padecer la enfermedad. Aún más, las perras de talla pequeña, en particular el Poodle, a pesar de ser las más afectadas, no mostraron un riesgo significativo. Esto demuestra que la frecuencia del TMC en una raza popular no necesariamente la predispone más.

Algunos autores encontraron una asociación entre la obesidad —particularmente en estadios tempranos— y el desarrollo de cáncer de mama en perras (*Sonnenschein et al., 1991; Pérez et al. 1998*). Aquí se encontró que muchas de las pacientes con sobrepeso tenían neoplasias malignas; sin embargo, no hubo una diferencia estadísticamente significativa para el desarrollo de cáncer entre perras con una condición corporal ideal y aquéllas con sobrepeso.

La exposición a las hormonas ováricas endógenas desde etapas tempranas y prolongadas de la vida es la causa más importante del desarrollo del tumor mamario en perras y el beneficio protector de la castración se consigue antes del primer celo. Esto significa que el efecto protector de la ovariectomía disminuye rápidamente después de los primeros años de vida. Los estrógenos se pueden activar por epoxidación, lo que daña el DNA e iniciará el proceso de carcinogénesis mamaria (*Yu, 2002*). Ninguna de las pacientes analizadas en esta investigación se castró antes de su primer celo, lo que permitió que su tejido mamario estuviera expuesto a una influencia hormonal significativa a lo largo de sus vidas.

La mayoría de las pacientes que se analizaron eran núlparas; sin embargo, contrario a la creencia vigente en medicina veterinaria y que se ha comprobado en mujeres, esta variable no representó un factor de riesgo predisponente de la enfermedad, lo que derriba el mito de que las perras deben gestar para disminuir la incidencia de tumor mamario. En mujeres es bien conocido que parir y lactar durante tres meses o más, reduce el riesgo a desarrollar cáncer mamario. La lactancia materna y la gestación a término ejercen un efecto protector contra el cáncer de mama (Rojas, 2008).

En este estudio se observó que la infiltración vascular y la presencia de émbolos neoplásicos en la luz de los vasos linfáticos, arteriales y venosos del tumor fueron factores de mal pronóstico. Chang *et al.* (2005) encontraron una correlación entre la presencia de émbolos neoplásicos y una supervivencia de entre 18 y 24 meses en perras con TMC. Asimismo, Diessler *et al.* (2009) observaron que la invasión vascular puede utilizarse como un parámetro acertado para pronosticar TMC.

El tipo histológico es otro factor independiente importante para pronosticar el TMC. Benjamin *et al.* (1999) encontraron que los carcinomas ductales (62.5%) y otros adenocarcinomas (27.4%: carcinoma sólido, papilar, tubular, simple y complejo) se asociaban a desenlaces fatales en el Beagle. También evaluaron la recurrencia y las metástasis: para carcinomas complejos, la recurrencia fue de 3.8% y la tasa de metástasis, 43.4%; para carcinomas simples los números fueron 4% y 52%, respectivamente, y para el carcinoma ductal, 4.3% y 59.6%, respectivamente. La tasa de metástasis para el carcinosarcoma fue de 100%. En el presente estudio, los peores pronósticos, en orden decreciente de sobrevida, fueron para los carcinomas sólidos, los comedocarcinomas y los carcinosarcomas. Por otro lado, los tipos menos agresivos fueron los carcinomas simples, los de tipo mixto y los complejos; estos últimos mostraron el tiempo de supervivencia más largo. Esta observación coincide con un informe previo que mostró que los carcinomas complejos exhibían una baja tasa de invasión local y permeación linfática (Misdorp, 1976).

Conclusiones

La mayoría de las pacientes presentaron masas mamarias múltiples y la mayoría de los tumores (58.4%) fueron benignos. La mayoría de los pacientes con masas neoplásicas múltiples tuvieron al menos un tumor maligno. Los tumores mamarios caninos afectaron con mayor frecuencia a las perras adultas mayores de 8 años de edad y las seniles mostraron propensión a formar tumores malignos. Las razas con mayor tendencia a desarrollar la enfermedad fueron el Poodle, el Cocker Spaniel y el Dachshund, pero sólo para el Cocker Spaniel el riesgo fue elevado, lo que demuestra que las razas más afectadas no necesariamente son las más predisuestas. El riesgo de que las perras núlparas generaran tumores mamarios fue similar al de las paridas. Las pacientes con tumores malignos mayores a 6 cm registraron la mortalidad más alta y el periodo de sobrevida más corto. Asimismo, en orden decreciente, las perras enfermas con carcinosarcoma, comedocarcinoma y carcinoma sólido mostraron los periodos de sobrevida más cortos.

Financiamiento

Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecimientos

Al personal del Departamento de Patología, del Hospital de Especialidades Veterinarias y a la Secretaría de Investigación, Innovación y Desarrollo Tecnológico de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

Conflictos de interés

Laura Romero es jefa del Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. El resto de los autores declara que no existe ningún conflicto de interés.

Contribución de los autores

Yaritza Salas y Laura Romero: diseñaron y realizaron la investigación, contribuyeron con técnicas de análisis nuevas, analizaron los datos y redactaron el manuscrito. Enrique Aburto y Rogelio Alonso: diseñaron la investigación, analizaron los datos y redactaron el manuscrito.

Adelys Márquez: contribuyó con técnicas de análisis, analizó los datos y redactó el manuscrito.

Hortensia Corona: aportó nuevos reactivos, apoyó en la recolección de las muestras y analizó los datos.

Referencias

- 1) Benjamin A, Lee AC, Saunders WJ. 1999. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in Beagles. *Veterinary Pathology*, 36:426-436.
- 2) Bronden LB, Nielsen SS, Toft N, Kristensen AT. 2010. Data from the Danish veterinary cancer registry on the occurrence and distribution of neoplasms in dogs in Denmark. *Veterinary Record*, 166:586-590.
- 3) Casal J, Mateu E. 2003. Tipos de muestreo. *Revista de Epidemiología de Medicina Preventiva*, 1:3-7.
- 4) Cassali G, Gobbi H, Malm C, Schmitt F. 2006. Evaluation of accuracy of fine needle aspiration biopsy for diagnosis of canine mammary tumors: Comparative features with the human tumors. *Cytopathology*, 17:1-7.
- 5) Chang S, Chang C, Chang T, Wong M. 2005. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (8-2002). *Journal of American Veterinary Medical Association*, 227(10):1625-1629.
- 6) Coffey DS, Walsh PC. 1990. Clinical experimental studies of benign prostatic hyperplasia. *Urologic Clinics of North American*, 17:461-475.
- 7) Costa PS, Santos NC, Cunha P, Cotter J, Sousa N. 2013. The use of multiple correspondence analysis to explore associations between categories of qualitative variables in healthy ageing. *Journal of Aging Research*, Article ID 302163. DOI: 10.1155/2013/302163.

- 8) Diessler ME, Castelland MC, Portianskyl EL, Burns SL, Idiar JR. 2009. Invasión vascular, expresión del receptor 2 del factor de crecimiento de endotelios vasculares (VEGFR-2) y densidad de microvasos en carcinomas mamarios de peras. Valor pronóstico. *Ciencias Morfológicas*, 11(1):15-24.
- 9) Egenvall A, Bonnett BN, Ohagen P, Olson P, Hedhammar A, von Euler H. 2005. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Preventive Veterinary Medicine*, 69:109-127.
- 10) Ferreira E, Bertagnolli AC, Cavalcanti MF, Schmitt FC, Cassali GD. 2009. The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Veterinary Comparative Oncology*, 7:230-235.
- 11) Fonseca CS, Daleck CR. 2000. Neoplasias mamárias em cadelas: influencia hormonal e efeitos da ovariectomia como terapia adjuvante. *Ciência Rural*, 30:731-735.
- 12) Gama A, Alves A, Schmitt F. 2008. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: Application of the human classification. *Virchows Archives*, 453(2):123-132.
- 13) Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R, Zappulli V. 2011. Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 48:117-131.
- 14) Im KS, Kim NH, Lim HY, Kim HW, Shin JI, Sur JH. 2014. Analysis of a new histological and molecular-based classification of canine mammary neoplasia. *Veterinary Pathology*, 51(3):549-559.
- 15) Kuldip G, Naresh K, Sanjeev K, Jitender M, Shashikant M, Raghunath M, et al. 2012. Epidemiological studies on canine mammary tumour and its relevance for breast cancer studies. *IOSR Journal of Pharmacy*, 2(Issue 2):322-333.
- 16) Misdrop W, Hart AAM. 1976. Prognostic factors in canine mammary cancer. *Journal of The National Cancer Institute*, 56(4):779-785. doi:10.1093/jnci/56.4.779
- 17) Oliveira LO, Oliveira RT, Loretto A, Rodrigues R, Driemeier D. 2003. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. *Acta Scientiae Veterinariae*, 31:105-110.
- 18) Perez Alenza D, Rutteman GR, Pena L. 1998. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 12:132-139.
- 19) Ressel L, Puleio R, Ruggero Loria G, Vannozzi I, Millanta F, Caracappa S, et al. 2013. HER-2 expression in canine morphologically normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissues and its correlation with the clinical outcome. *Research in Veterinary Science*, 94:299-305.
- 20) Rivera P, Melin M, Biagi T, Fall T, Häggström J, Lindblad-Toh K, von Euler H. 2009. Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. *Cancer Research*, 69:8770-8774.
- 21) Rojas C. 2008. Lactancia materna y cáncer de mama: Un estudio caso-control en pacientes del Hospital Nacional Arzobispo Loayza, Lima-Perú. *Anales Facultad de Medicina*, 69(1):22-28.
- 22) Salas Y, Márquez A, Díaz D, 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):e0127381. DOI: 10.1371/journal.pone.0127381.
- 23) Schneider R, Dorn CR, Taylor DO. 1969 Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *Journal National Cancer Institute*, 43:1249-1261.
- 24) Sonnenschein EG, Glickman LT, Goldschmidt MH, McKee LJ. 1991. Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: A case-control study. *American Journal Epidemiology*, 133:694-703.
- 25) Sorenmo K. Canine mammary gland tumors. 2003. *Veterinary Clinical Small Animal*, 33:573-596.
- 26) Sorenmo KU, Shofer FS, Goldschmidt MH. 2000. Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14:266-270.
- 27) Thomas A. Hematoxilina y eosina. Métodos histotecnológicos. 1995. *Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP) y el Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP)*, 55-58.
- 28) Wey N, Gutberlet K, Khon B. 2000. Mammatumore bei der huding: Hormolle abhängigkeit unter besonderer berucksichtigung von 17 β ostradiol und progesteron. *Kleintierpraxis*, 45:19-31.
- 29) Yu FL. 2002. 17Beta-estradiol epoxidation as the molecular basis for breast cancer initiation and prevention. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 11(Suppl 7):S460-S466.
- 30) Zatloukal J, Lorenzová F, Tich A, Neâas H, Kecová P, Kohout. 2005. Breed and age as risk factors for canine mammary tumours. *Acta Veterinaria Brunensis*, 74:103-109.

Yaritza Salas^{1,2*}

0000-0003-2129-3124

Enrique Aburto³

0000-0001-9190-0044

Rogelio A. Alonso⁴

0000-0002-4159-1682

Adelys Márquez⁵

0000-0001-6286-6043

Hortensia Corona⁶

0000-0002-3751-8319

Laura Romero⁷

0000-0002-5158-8129

¹Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud y Producción Animal
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México
Av. Universidad 3000, Ciudad de México
04510, México

²Departamento de Patología⁵Departamento de Fisiología
Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado"

Núcleo Héctor Ochoa Zuleta
Final Avenida Ribereña
Cabudare 3023, Lara, Venezuela

³Department of Pathology and Microbiology
University of Prince Edward Island
550 University Avenue, Charlottetown
Prince Edward Island, Canada C1A 4P3

⁴Departamento de Genética y Bioestadística⁶Departamento de Medicina, Cirugía y Zootecnia
en Pequeñas Especies

⁷Departamento de Patología
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México
Av. Universidad 3000, Ciudad de México
04510, México

***Corresponding author:**

Tel: 044-55-4554-1442

Email address:

ysalas@ucla.edu.ve

Association of histological features with potential risk factors and survival in canine mammary tumors

Abstract

The epidemiological and clinicopathological features of canine mammary tumors may provide valuable information to facilitate analysis of the behavior of the disease and represent a potential tool for the study of breast cancer in women. The aim of this study was to associate the histological features of canine mammary tumors with potential risk factors and survival. One hundred and seventy-eight mammary tumors were collected from 80 female dogs. The statistical analyses consisted of a series of univariate studies and frequencies of the different study variables, such as a bivariate analysis with the Chi squared test (χ^2), a relative risk and Kaplan Meier survival analysis, and a multiple correspondence analysis was used to correlate the tumor's biological behavior with the dogs' breed. Most patients were older than 8 years and had at least one malignant tumor, which was usually solitary and measured more than 6 cm; these patients had poor survival. The most frequent tumors were a complex adenoma, benign mixed tumor, carcinoma complex and mixed type carcinoma. The most commonly affected breeds were Poodle, Cocker Spaniel and Dachshund, and the breeds at the highest risk of tumor development were Cocker Spaniel, Labrador Retriever and German Shepherd. Overall, the data indicated that mammary tumors in dogs mainly affected older females with malignant tumors and that there were high mortality and short-term survival rates. However, the most commonly affected breeds were not necessarily the most susceptible. Our data do not support the hypothesis of an increased risk of canine mammary tumors in nulliparous female dogs.

Keywords: Canine mammary tumor; Epidemiology; Survival; Clinicopathological features.

Introduction

Mammary cancer is the most common malignant neoplasm in intact dogs. Canine mammary tumors (CMTs) can vary in size from a few millimeters to several centimeters; they can exist in multiples (at least in 50% of the cases) and usually involve the caudal glands (Wey *et al.*, 2000). Histologically, CMTs are classified as malignant epithelial neoplasms (carcinomas), special types of carcinomas, malignant

Received: 2015-07-30

Accepted: 2016-03-14

Published: 2016-03-28

Additional information and declarations
can be found on page 10

© Copyright 2016
Yaritza Salas *et al.*

open access 

Distributed under Creative Commons CC-BY 4.0

mesenchymal neoplasms (sarcomas), carcinosarcomas and benign neoplasms (Goldschmidt *et al.*, 2011).

Some risk factors associated with mammary gland tumors in dogs include gender and breed; it is well known that females are predisposed to the disease due to the tropism of natural estrogens for the mammary gland (Yu *et al.*, 2002). Epidemiological studies often report a higher susceptibility in small-size breeds, although the number of reports in large-size breeds is increasing. The most frequently affected breeds include Poodle, Maltese, Chihuahua, Beagle, Yorkshire Terrier, Bichon Frisé, Cocker Spaniel, Springer Spaniel, Irish Setter and German Shepherd, among others (Bronden *et al.*, 2010). In a retrospective study of biopsies of lesions in the mammary gland of female dogs, Salas *et al.* (2015) observed the epidemiological characteristics of canine mammary tumors and concluded the following: (1) mammary tumors in intact dogs had a high incidence (16.8%); (2) benign and malignant tumors had similar frequencies (47.7% vs. 47.5%, respectively); (3) epithelial tumors were the most common; (4) the most commonly affected dogs were old adult females (9 to 12 years old), purebreds (Poodle and Cocker Spaniel) and small-size dogs; and (5) there was an increase in malignant tumors in the last four years of the study. Therefore, mammary tumors in dogs are an important animal health problem that needs to be solved by improving veterinary oncology services in Mexico.

The increasing number of neoplastic conditions found in veterinary medicine, including mammary neoplasms, justifies further research efforts in the field of veterinary oncology. In this regard, it is necessary to develop studies that correlate histological features with a clinical outcome and to establish the most significant risk factors associated with the development and clinical behavior of canine mammary tumors. This development would provide valuable information that could be used to improve the diagnosis, prognosis and treatment of CMT patients. In addition, this information could be compared to data from other countries. It is also important to identify molecular markers that may help to achieve more accurate diagnoses, provide prognostic information, and offer better treatment options for canine patients with mammary cancer. In turn, because dogs with spontaneous mammary tumors have proven to be an animal model *par excellence* (Gama *et al.*, 2008; Cassali *et al.*, 2006), defining the most significant clinicopathological features of CMTs may offer valuable information for the study of breast cancer in women. We hypothesized that there is an association among histological features, risk factors and survival in female dogs with mammary tumors.

Material and methods

Eighty patients with mammary tumors undergoing lumpectomy or mastectomy at the Teaching Animal Hospital in FMVZ-UNAM from February 2012 to October 2013 were included in this study with the consent of their owners. Sampling was performed by convenience, as the typical cases were selected (Casal *et al.*, 2003).

Because most patients had more than one tumoral mass, a total of 178 different mammary tumors were analyzed. To calculate the relative risk (RR), 80 patients over 4 years of age were randomly selected from hospital files, and these patients did not have a medical appointment not related to a mammary neoplasia during

the same period of time were added to this study. Information on age, breed, body condition score and gynecological data (OVH and parity) was obtained from these patients.

The number and size (largest dimension) of tumors was obtained from each patient. Tissue specimens were fixed for 48 hours in 10% buffered formalin; they were trimmed, processed, embedded in paraffin, cut at 5 mm and stained with hematoxylin and eosin (H&E) (Thomas, 1995). Histological sections were reviewed and classified according to the grading of canine mammary tumors proposed by Goldsmith *et al.* (2011), which includes histogenesis, differentiation and anaplasia, and evidence of local invasion (stromal and vascular). Histological classification was established by the consensus of three experts. Risk factors included age, breed, body condition (based on a scale of 1 to 5, where: 1 = emaciated, 2 = underweight, 3 = ideal, 4 = overweight, and 5 = obese) and gynecological data.

To determine the biological behavior of the tumors, these 80 patients were followed up with regard to their general health status, evidence of recurrence or metastasis, and survival every 6 months during a period of 18 months after the initial surgery (patients were excluded if they died from suggestive causes of mammary disease, based on evidence of metastasis from clinical data. Some of the follow-up patients had X-ray analysis, others had X-rays and ultrasounds, and other patients were only examined physically.

Statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics 22 (IBM Corporation, 1994- 2016, USA) and consisted of a series of univariate analyses and frequencies of the different variables, bivariate analysis with the Chi Squared test (χ^2), relative risk and Kaplan Meier survival analysis. A $P < 0.05$ value was considered statistically significant. A multiple correspondence analysis (MCA) (Costa *et al.*, 2013) was performed between the biological behavior of the tumor and the dogs' breed (both purebreds and mixed-breeds were included). The graphs were built using the Prism 6.0 package (GraphPad Software, Inc., USA).

Results

Number and size of tumors

From the 80 dogs studied, 55 (68.7%) had multiple mammary masses in different mammary glands, whereas only 25 of them showed solitary tumors (31.3%). In total, 178 different tumors were analyzed. In most cases, the dogs had between 2 (59/178; 33.1%) to 3 tumoral masses (46/178; 25.8%), and a few patients showed 11 (5/178; 2.8%) to 18 (4/178; 2.2%) masses. Of these 178 tumors, 104 (58.4%) were benign tumors, and 74 were malignant (41.6%). In addition, it was observed that single malignant tumors (15/74; 20.3%) were more common than single benign tumors (10/104, 9.6%) ($\chi^2 P < 0.04$).

The sizes of the major tumoral masses varied; the most frequent size was < 3 cm (104/178; 58.4%), which was followed by tumors > 6 cm (43/178; 24.2%) and tumors between 4 to 5 cm (31/178; 17.4%). The biological behavior and size of the tumoral masses correlated, showing a highly significant difference ($\chi^2 P < 0.05$), with a trend for benign neoplasia < 3 cm and for malignant neoplasia > 6 cm (Fig. 1).

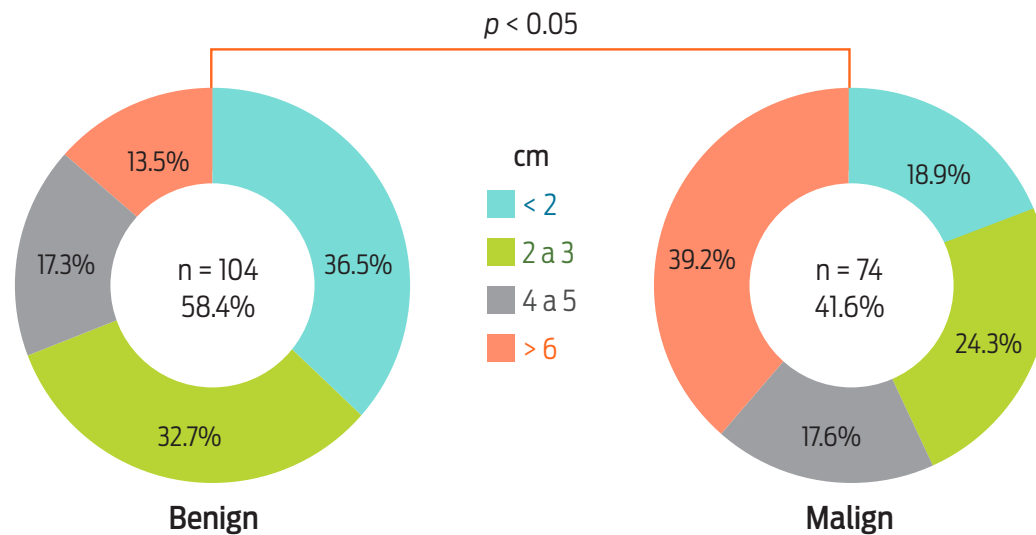


Figure 1. Frequency of canine mammary tumors according to their size (cm).

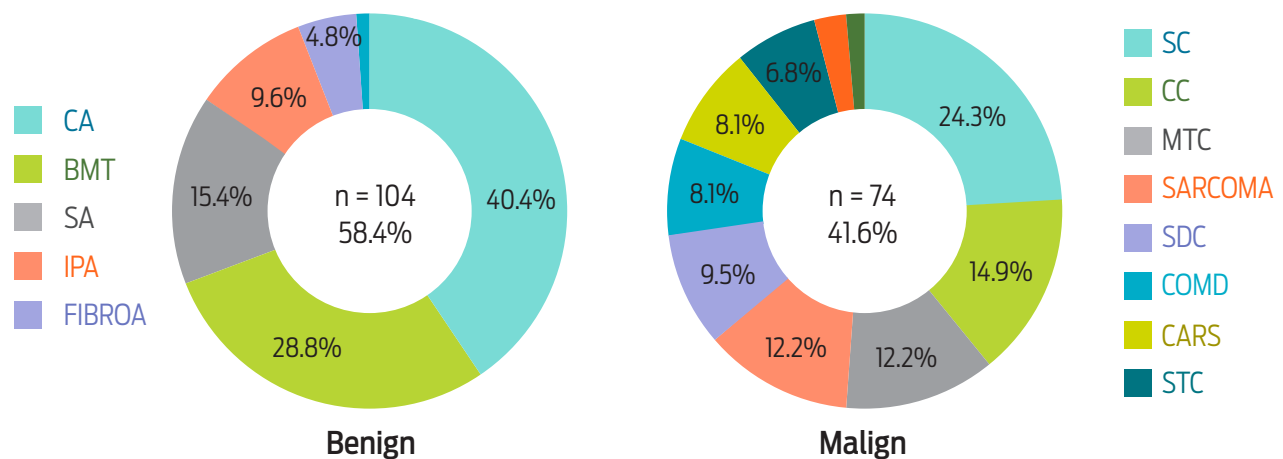


Figure 2. Frequency of canine mammary tumors according to their morphological classification.

CA: complex adenoma; BMT: benign mixed tumors; SA: simple adenoma; IPA: intraductal papillary adenoma; FIBROA: fibroadenoma; SC: simple carcinoma; CC: complex carcinoma; MTC: mixed type carcinomas; SARCOMA: sarcoma; SDC: solid carcinoma; COMD: comedocarcinoma; CARS: carcinosarcoma; STC: special type carcinomas.

- **CMT morphological classification.** The histological analysis of the mammary tumors per dog showed a higher frequency of benign than malignant tumors; however, most of the dogs had multiple tumors, some of which were benign and some were malignant. We noted that more patients had at least one malignant mammary tumor (48/80; 60%), whereas those with only benign tumors were fewer (32/80; 40%).

Figure 2 shows the frequency of the different histological tumor types that were found. The most frequent benign mammary tumor was the complex adenoma (CA) (42/104, 40.4%), which was followed by benign mixed tumors (BMT) (30/104, 28.8%). On the malignant side, the most frequent tumors

Table 1. Relative risk (RR) of mammary canine tumors according to age, size, breed and parity.

Variable		Total number	Number of CMT	Number of non-CMT	Number of MCMT	Number of BCMT	CMT RR	MCMT RR
Age	<7 years	49	17	31	9	8	0.5	1.1
	8-12 years	91	50	41	25	25	1.2	1.0
	>13 years	20	13	8	12	1	1.9	12.0
Breed size	Small	105	50	55	28	22	0.9	1.3
	Medium	31	15	16	9	6	0.9	1.5
	Large	24	15	9	8	7	1.7	1.1
Breed	Mixed breed	23	9	14	7	2	0.6	3.5
	Pure	137	71	66	45	35	1.1	1.3
	Cocker	17	11	5	6	5	2.2	1.2
	Poodle	36	21	15	12	9	1.4	1.3
	Dachshund	14	8	6	5	3	1.3	1.7
	Schnauzer	15	4	11	2	2	0.4	1.0
	Labrador	8	6	2	4	2	3.0	2.0
	Rottweiler	3	3	0	1	2	-	0.5
	German Shepherd	3	2	1	2	0	2.0	-
Parity	No	110	57	53	31	26	1.1	1.2
	Yes	50	23	27	14	9	0.9	1.6

CMT: canine mammary tumor; MCMT: malignant canine mammary tumor; BCMT: benign canine mammary tumor.

were simple carcinomas (SC) (18/74, 24.3%), complex carcinomas (CC) (11/74, 14.9%) and mixed-type carcinomas (MTC) (9/74, 12.6%). Moreover, the analysis of the CMT frequency based on the tissue of origin produced a similar occurrence of mixed and epithelial tumors. According to the biological behavior of the CMT, the mixed-type neoplasm was the most frequent (67%) of benign tumors; malignant tumors tended to be mainly epithelial (51%), showing a highly significant difference between groups (χ^2 $P < 0.05$).

Risk factors associated with CMT

- **Age:** a wide range of ages was observed in patients with CMT (3-16 years); the highest frequencies were for 8 (20%), 12 (16.3%), 11 (13.7%), and 9 years old (10%). In general, the most affected patients were dogs > 7 years old (67.5%), and they showed both benign (50%) and malignant CMTs (50%). In dogs > 13 years old, the ratio aligned towards malignant CMTs (92.3%), with a moderate risk of developing CMT and a higher risk that these tumors were malignant (χ^2 $P < 0.05$) (Table 1).
- **Breed:** As Table 1 shows, a wide variety of breeds affected with CMT was observed. Although purebred dogs had a higher frequency than mixed breeds, a significant relative risk predisposing them to the disease was not evident. However, mixed-breed dogs showed a higher risk of malignant tumors. In relation to the size of purebred dogs, the most affected were the small- and medium- size dogs, which did not show a risk or it was a non-effective risk disease. Among purebreds, the Poodle was one of the most frequently affected breeds, although its risk of disease was relatively low; the Cocker Spaniel had a moderate

risk; the Dachshund showed a moderate risk for malignant tumors, although it had a lower CMT risk; the Labrador Retriever had the least frequency of occurrence, but it showed a higher risk of mammary tumors and a moderate risk of malignant mammary tumors; the Rottweiler and the German Shepherd showed a moderate risk of developing CMT (Table 1).

Gynecological data

Almost none of the patients were neutered within the first year and a half (78/80, 97.5%), and most of them were ovary-hysterectomized at the time of mastectomy. It was also observed that most dogs with mammary tumors were nulliparous; however, this condition had a negligible risk for CMT (Table 1).

Body condition score

At the time of surgery, 53.8% (43/80) of the dogs studied showed a body condition score (BCS) of 3; 28.8% (23/80) had a BCS of 4; 10% (8/80) had a BCS of 5; and 7.5% (6/80) had a BCS of 2. None of the dogs had a BCS of 1. By relating the body condition of patients to the biological behavior of mammary neoplasms, 51.2% (22/43) and 48.8% (21/43) of the dogs with a BCS of 3 had benign and malignant tumors, respectively, whereas 73.9% (17/23) of the dogs with a BCS of 4 tended to have malignant tumors, although the difference was not statistically significant (χ^2 $P > 0.05$).

Recurrence and survival

Eighteen months after surgery, 15/80 (18.8%) patients had new tumoral masses. Of these patients, 7/15 (46.7%) had benign tumors, and 8/15 (53.3%) had at least one malignant tumor ($P > 0.05$). The recurrence of benign and malignant tumors was proportionally similar. Twenty-four out of 48 patients (50%) with at least one malignant mammary tumor, died; vascular infiltration was observed in 18/24 (75%) of these patients, and 14/18 (77.8%) died within the study period ($P < 0.05$).

Patients with malignant mammary tumors had a significantly shorter survival time than those with benign tumors (Fig. 3). Of the patients with malignant mammary tumors, 19/74 (25.7%) died during the post-surgical follow-up; of these, 89.5% (17/19) exhibited an early death or died within a year. On the other hand, patients with tumors < 2 cm had higher survival proportions than those with tumors > 6 cm. Tumor size could thus be considered an important prognostic factor ($P = 0.009$) (Fig. 4), as the following data shows: patients with CARS, COMD, and CSD tumors had a survival time of less than 6 months (2, 5.5, and 6 months of median survival, respectively), whereas patients with SC, CC, and MTC tumors had a median survival time of 11 months (Fig. 5).

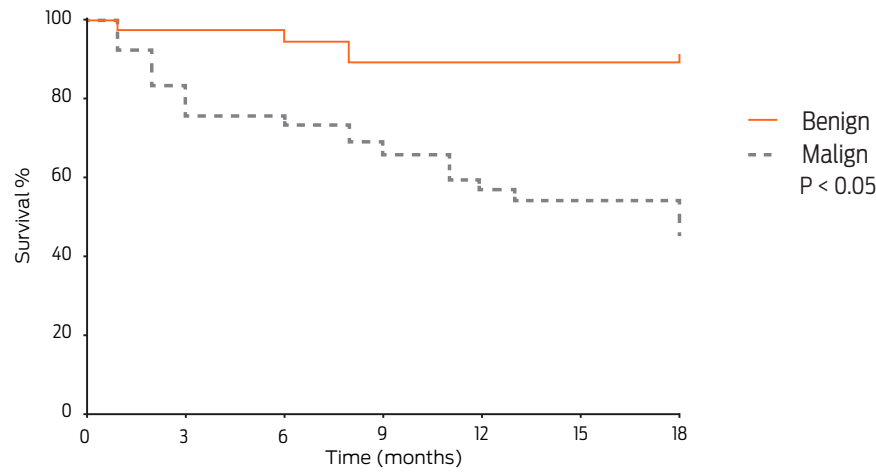


Figure 3. Survival analysis of patients with benign and malignant canine mammary tumors.

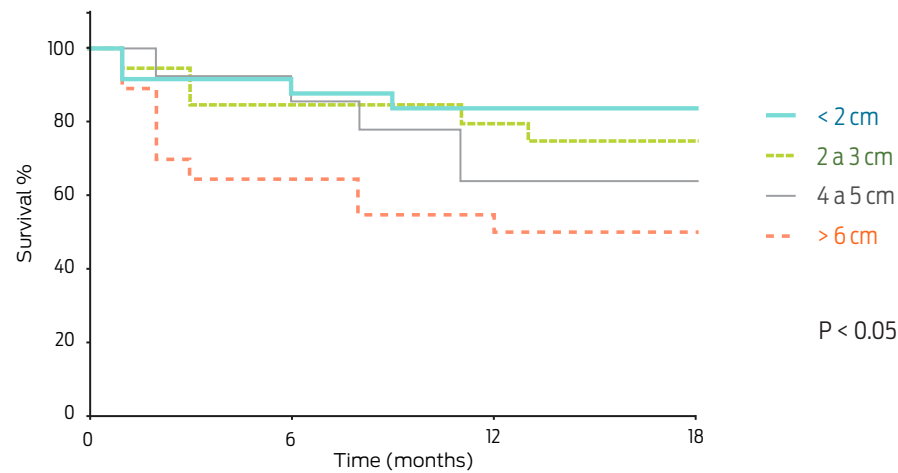


Figure 4. Survival analysis related to tumor size.

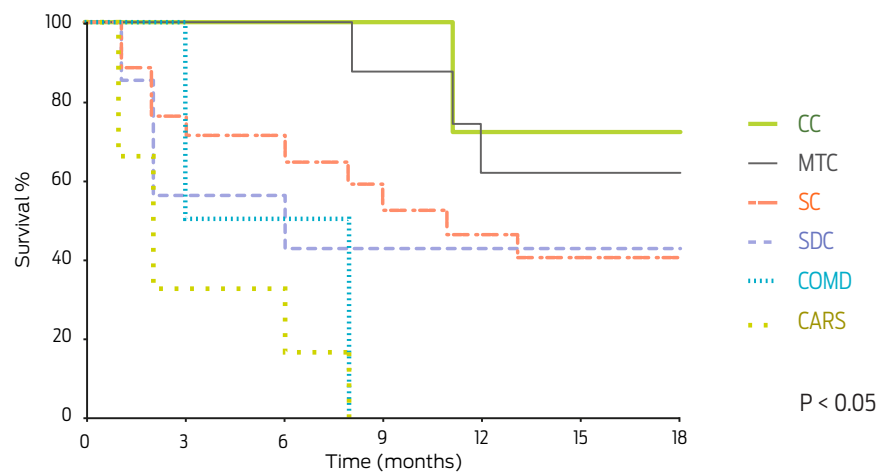


Figure 5. Survival analysis related to the morphological type of canine mammary tumors. SC: simple carcinoma; CC: complex carcinoma; MTC: mixed type carcinomas; SC: simple carcinoma; SDC: solid carcinoma; COMD: comedocarcinoma, CARS: carcinosarcoma.

Discussion

Similar to our findings, other researchers observed that tumor size is an important prognostic factor: small mammary masses tend to be benign, and larger tumors tend to be malignant. In our study, patients with tumors < 2 cm showed a higher survival period than those with tumors > 6 cm. [Ferreirai *et al.* \(2009\)](#) found that 80% of benign tumors were < 5 cm, whereas 87.1% of malignant tumors were > 5 cm, which emphasizes the importance of evaluating tumor size; this variable is inexpensive and simple to assess routinely. Similarly, [Ressel *et al.* \(2013\)](#) found that mammary carcinomas showed a larger diameter (8 cm) than adenomas (3 cm); a lower survival time was found in dogs with tumors > 5 cm.

[Oliveira *et al.* \(2003\)](#) reported that mammary tumors represent approximately 50% of neoplastic diseases in female dogs, and 41 to 53% of these are malignant ([Fonseca and Daleck, 2000](#)). In our study, 58.4% were benign tumors, and 41.6% were malignant tumors, which is similar to the observations of [Salas *et al.* \(2015\)](#), who performed an 11-year retrospective study (2002-2012) in Mexico City. In this study, 47.8% of the total of mammary tumors were benign, 47.5% were malignant and 4.7% were non-neoplastic mammary lesions (hyperplasia, dysplasia or mastitis).

Regarding histological variants, similar to this study, other researchers found that the most common benign variants include mixed tumors and complex adenomas. The most common malignant variants were carcinomas that originated with a previous benign tumor, simple carcinoma and complex carcinoma ([Im *et al.*, 2014](#)). In addition, [Ressel *et al.* \(2013\)](#) observed that complex adenomas were among the most common benign lesions, and simple carcinoma was the most common malignant variant.

Regarding the risk factors associated with mammary neoplasia, our results showed similarities with other epidemiological studies that had reported a wide age range in CMT patients. In our study, the range was from 3 to 15 years, with an average age of 8 to 12 years. Similarly, [Kuldip *et al.* \(2012\)](#) reported an age range from 2 to 16 years for mammary tumor development in dogs, with an average age of 9 years. The higher incidence was in dogs between 10 to 12 years old (31.37%). In addition, [Zatloukal *et al.* \(2005\)](#) found that dogs over 13 years of age showed the highest risk for the development of malignant tumors.

The breed predisposition reported for CMT is very diverse. In this study, the most commonly affected animals pertained to a small-size breed; however, the occurrence of mammary tumors has recently been increasing in large-breed dogs according to some authors, probably as a result of breed popularity in different geographic areas ([Bronden *et al.*, 2010](#)). [Rivera *et al.* \(2009\)](#) reported that in Sweden, English Springer Spaniels showed a 36% predisposition for mammary cancer. [Egenvall *et al.* \(2005\)](#) reported a high incidence for mammary tumor development in Spaniels, Dobermans, German Shepherds and Boxers ([Egenvall *et al.*, 2005](#)).

It is well known that dog breed popularity varies according to each country, which may influence breed predisposition analyses ([Salas *et al.*, 2015](#)); however, we identified a moderate relative CMT risk in Cocker Spaniels. In addition, Dachshunds and mixed-breed dogs showed an increased risk of developing malignant mammary tumors. These breeds were also identified to be predisposed for CMT in a retrospective study performed in Mexico City using data from canine patients from the last decade ([Salas *et al.*, 2015](#)). In a retrospective study conducted in the

Czech Republic from 1977 to 2001, [Zatloukal et al. \(2005\)](#) reported that Poodles, Schnauzers, Cocker Spaniels, and Dachshunds were predisposed to developing mammary neoplasia. On the other hand, these authors did not find any CMT risk in large-breed dogs. This finding was contrary to our study in which we found a risk of disease even though those breeds are less popular. Furthermore, small-size breeds, particularly Poodles, did not show a significant risk despite being the most frequently affected breed. This demonstrates that a high CMT frequency in a popular breed does not necessarily indicate high breed susceptibility.

Several authors have reported an association between obesity, particularly in early life stages, and the development of mammary cancer in bitches ([Sonnen-schein et al., 1991](#); [Perez et al., 1998](#)). We found that most fat dogs had malignant neoplasms; however, there was not a significant difference in cancer development between dogs with a healthy body condition and fat animals.

It appears that exposure to endogenous ovarian hormones early in life is the most important cause of mammary tumor development in dogs, and the protective benefit from ovarian hormonal ablation seems to be dose-dependent. This means that the protective effect of ovariectomy is strongest in patients with no exposure to minimal hormonal exposure and diminishes quickly after the first few years of life. Estrogen can be activated by epoxidation, thus gaining the ability to damage DNA and initiate mammary carcinogenesis ([Yu, 2002](#)). None of the patients analyzed in our study were neutered before their first estrous, which allowed their mammary tissue to be under a significant hormonal influence.

In this study, most CMT patients were nulliparous; however, contrary to the belief that has been held in veterinary medicine and has been tested in women, this variable was not a predisposing risk factor for the disease, which overthrows the myth that dogs must gestate to decrease the incidence of mammary tumor. It is well known that women who give birth and breastfeed for 3 months or more have a reduced risk of developing breast cancer; therefore, breastfeeding and term pregnancy have a protective effect against breast cancer ([Rojas, 2008](#)).

In this study, we observed that vascular invasion and the presence of neoplastic emboli in the lumen of lymphatic and blood vessels were poor prognostic factors. [Chang et al. \(1995\)](#) found a correlation between the presence of neoplastic emboli and a survival time between 18 to 24 months in dogs with CMT. Furthermore, [Diessler et al. \(2009\)](#) observed that vascular invasion can be used as an important CMT prognostic value.

The histological type is an important independent prognostic factor for CMT. [Benjamin et al. \(1999\)](#) reported fatal outcomes in Beagles associated with ductular carcinomas (62.5%) and adenocarcinomas of other origins (27.4%; solid, tubular, or papillary carcinomas; simple or complex). They also evaluated that in complex carcinomas, the rate of recurrence was 3.8%, and the rate of metastasis was 43.4%; for simple carcinomas, the numbers were 4% and 52%, respectively; and for ductular carcinomas, the numbers were 4.3% and 59.6%, respectively. The rate of metastasis for carcinosarcomas was 100%. In our study, the worst prognosis was observed in solid carcinomas, comedocarcinomas, and carcinosarcomas in decreasing survival time order. On the other hand, the least aggressive types were simple carcinomas, mixed carcinomas, and complex carcinomas; the latter histologic type showed the longest survival time. This observation coincides with a previous

report that showed that complex carcinomas exhibited a low rate of local invasion and lymphatic permeation (Misdorp and Hart, 1976).

Conclusions

In the present study, the majority of patients had multiple mammary masses, and most tumors (58.4%) were benign. Most patients with multiple neoplastic masses had at least one malignant tumor. Canine mammary tumors often affected dogs older than 8 years of age, and geriatric dogs tended to present malignant tumors. Commonly affected breeds included Poodles, Cocker Spaniels and Dachshunds, but only Cocker Spaniels presented a significant risk for mammary tumor development, which demonstrates that the most commonly affected breeds are not necessarily the most susceptible. In this study, the increased risk of disease in nulliparous dogs was not corroborated. Mortality was the highest and the survival periods were the shortest in patients bearing malignant tumors larger than 6 cm. The shortest survival periods were also noted in animals with solid carcinomas, comedocarcinomas, and carcinosarcomas, in decreasing order.

Funding

Department of Pathology, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

Acknowledgements

We thank the staff of the Department of Pathology, the Veterinary Specialty Hospital and the Secretary for Research, Innovation and Technological Development of Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

Conflicts of interest

Laura Romero is head of the Department of Pathology, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. The rest of the authors declare that they do not have any conflict of interest.

Author contributions

Yaritza Salas and Laura Romero: Designed and conducted the research, contributed new analytical techniques, analyzed the data, and wrote the manuscript.

Enrique Aburto and Rogelio A. Alonso: Designed the research, analyzed the data, and wrote the manuscript.

Adelys Márquez: Contributed analytical techniques, analyzed the data, and wrote the manuscript.

Hortensia Corona: Contributed new reagents, helped with sample collection, and analyzed the data.

References

- 1) Benjamin A, Lee AC, Saunders WJ. 1999. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in Beagles. *Veterinary Pathology*, 36:426-436.
- 2) Bronden LB, Nielsen SS, Toft N, Kristensen AT. 2010. Data from the Danish veterinary cancer registry on the occurrence and distribution of neoplasms in dogs in Denmark. *Veterinary Record*, 166:586-590.
- 3) Casal J, Mateu E. 2003. Tipos de muestreo. *Revista de Epidemiologia de Medicina Preventiva*, 1:3-7.
- 4) Cassali G, Gobbi H, Malm C, Schmitt F. 2006. Evaluation of accuracy of fine needle aspiration biopsy for diagnosis of canine mammary tumors: Comparative features with the human tumors. *Cytopathology*, 17:1-7.
- 5) Chang S, Chang C, Chang T, Wong M. 2005. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (8-2002). *Journal of American Veterinary Medical Association*, 227(10):1625-1629.
- 6) Coffey DS, Walsh PC. 1990. Clinical experimental studies of benign prostatic hyperplasia. *Urologic Clinics of North American*, 17:461-475.
- 7) Costa PS, Santos NC, Cunha P, Cotter J, Sousa N. 2013. The use of multiple correspondence analysis to explore associations between categories of qualitative variables in healthy ageing. *Journal of Aging Research*, Article ID 302163. DOI: 10.1155/2013/302163.
- 8) Diessler ME, Castelland MC, Portianskyl EL, Burns SL, Idiar JR. 2009. Invasión vascular, expresión del receptor 2 del factor de crecimiento de endotelios vasculares (VEGFR-2) y densidad de microvasos en carcinomas mamarios de peras. Valor pronóstico. *Ciencias Morfológicas*, 11(1):15-24.
- 9) Egenvall A, Bonnett BN, Ohagen P, Olson P, Hedhammar A, von Euler H. 2005. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Preventive Veterinary Medicine*, 69:109-127.
- 10) Ferreira E, Bertagnolli AC, Cavalcanti MF, Schmitt FC, Cassali GD. 2009. The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Veterinary Comparative Oncology*, 7:230-235.
- 11) Fonseca CS, Daleck CR. 2000. Neoplasias mamárias em cadelas: influencia hormonal e efeitos da ovariectomia como terapia adjuvante. *Ciência Rural*, 30:731-735.
- 12) Gama A, Alves A, Schmitt F. 2008. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: Application of the human classification. *Virchows Archives*, 453(2):123-132.
- 13) Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R, Zappulli V. 2011. Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 48:117-131.
- 14) Im KS, Kim NH, Lim HY, Kim HW, Shin JI, Sur JH. 2014. Analysis of a new histological and molecular-based classification of canine mammary neoplasia. *Veterinary Pathology*, 51(3):549-559.
- 15) Kuldip G, Naresh K, Sanjeev K, Jitender M, Shashikant M, Raghunath M, et al. 2012. Epidemiological studies on canine mammary tumour and its relevance for breast cancer studies. *IOSR Journal of Pharmacy*, 2(Issue 2):322-333.

- 16) Misdrop W, Hart AAM. 1976. Prognostic factors in canine mammary cancer. *Journal of The National Cancer Institute*, 56(4):779-785. doi:10.1093/jnci/56.4.779
- 17) Oliveira LO, Oliveira RT, Loretti A, Rodrigues R, Driemeier D. 2003. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. *Acta Scientiae Veterinariae*, 31:105-110.
- 18) Perez Alenza D, Rutteman GR, Pena L. 1998. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 12:132-139.
- 19) Ressel L, Puleio R, Ruggero Loria G, Vannozzi I, Millanta F, Caracappa S, et al. 2013. HER-2 expression in canine morphologically normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissues and its correlation with the clinical outcome. *Research in Veterinary Science*, 94:299-305.
- 20) Rivera P, Melin M, Biagi T, Fall T, Häggström J, Lindblad-Toh K, von Euler H. 2009. Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. *Cancer Research*, 69:8770-8774.
- 21) Rojas C. 2008. Lactancia materna y cáncer de mama: Un estudio caso-control en pacientes del Hospital Nacional Arzobispo Loayza, Lima-Perú. *Anales Facultad de Medicina*, 69(1):22-28.
- 22) Salas Y, Márquez A, Díaz D, 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):e0127381. DOI: 10.1371/journal.pone.0127381.
- 23) Schneider R, Dorn CR, Taylor DO. 1969 Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *Journal National Cancer Institute*, 43:1249-1261.
- 24) Sonnenschein EG, Glickman LT, Goldschmidt MH, McKee LJ. 1991. Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: A case-control study. *American Journal Epidemiology*, 133:694-703.
- 25) Sorenmo K. Canine mammary gland tumors. 2003. *Veterinary Clinical Small Animal*, 33:573-596.
- 26) Sorenmo KU, Shofer FS, Goldschmidt MH. 2000. Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14:266-270.
- 27) Thomas A. Hematoxilina y eosina. Métodos histotecnológicos. 1995. *Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP) y el Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP)*, 55-58.
- 28) Wey N, Gutberlet K, Khon B. 2000. Mammatumore bei der huding: Hormolle abhängigkeit unter besonderer berucksichtigung von 17 β ostradiol und progesteron. *Kleintierpraxis*, 45:19-31.
- 29) Yu FL. 2002. 17Beta-estradiol epoxidation as the molecular basis for breast cancer initiation and prevention. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 11(Suppl 7):S460-S466.
- 30) Zatloukal J, Lorenzová F, Tich A, Neâas H, Kecová P, Kohout. 2005. Breed and age as risk factors for canine mammary tumours. *Acta Veterinaria Brunensis*, 74:103-109.