InVet 2021, 23 (2): 01-10
ISSN 1514-6634 (impreso)
ISSN 1668-3498 (en línea)

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Expresión del factor de crecimiento de endotelio vascular y de ciclooxigenasa-2 en pacientes caninos con cáncer mamario

Vascular endothelial growth factor and cyclooxygenase-2 expression in canine patients with mammary cancer

PEREIRA, ME[1]; FIDANZA, MM[1]; ARTESE, J[1]; GONZALEZ, SP[1]; GABRIELE, C[1]

[1] Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Cátedra de Patología Clínica y Enfermedades Médicas, Chorroarín 280 (1427), Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

Se trabajó con 17 muestras histopatológicas pertenecientes a pacientes caninos con neoplasias mamarias malignas. Se evaluó por inmunohistoquímica la expresión del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), la ciclooxigenasa-2 (COX-2), los receptores para estrógenos (RE) y progesterona (RP), la sobreexpresión del proto-oncogén Herb2-Neu y el p53. El 47 % presentaron expresión positiva para el VEGF, COX-2, Herb2-Neu y p53. Este grupo presentó diferencias significativas en relación al grupo con expresión negativa, con una mediana de supervivencia de 175 y 850 días respectivamente. (p=0,009) El 100 % presentaron expresión negativa para RE y RP. El 57 % de carcinomas simples y el 100 % de carcinomas mixtos presentaron expresión positiva para el VEGF, COX-2, Herb2-Neu y p53, con compromiso de linfonodos y metástasis. El 100 % de carcinomas anaplásicos presentaron expresión positiva para el VEGF, Herb2-Neu y p53 y negativa para COX-2, con compromiso de linfonodos y metástasis. Si bien el estudio de estos marcadores permite evaluar el riesgo de metástasis se requieren más estudios que involucren un mayor número de pacientes que validen o no dichos hallazgos. El objetivo del presente trabajo fue investigar la expresión del VEGF y de COX-2 para establecer su relación con otros marcadores y para evaluar riesgo de metástasis en cáncer mamario canino.

Palabras clave: (factor de crecimiento de endotelio vascular), (ciclooxigenasa-2), (cancer mamario canino), (inmunohistoquímica).

Recibido: 15-07-2021
Aceptado: 25-11-2021
Correspondencia e-mail: Marcela Pereira
mpereira@fvet.uba.ar

ABSTRACT

It worked with 17 histopathological sections from canine patients with malignant mammary neoplastic. It was evaluated by immunohistochemistry the vascular endothelial growth factor (VEGF), cyclooxygenase-2 (COX-2) expression, estrogen (ER) and progesterone (PR) receptors, Herb2-Neu proto-oncogene overexpression and p53. The 47 % had positive expression for VEGF, COX-2, Herb2-Neu and p53. This group presented significant differences in relation to the group with negative expression, with a mean survival time of 175 and 850 days respectively. (p=0.009) The 100 % presented negative expression for ER and PR. The 57 % of the simple carcinomas and 100 % of mixed carcinomas presented positive expression for VEGF, COX-2, Herb2-Neu and p53, with lymph node involvement and metastases. The 100 % of the anaplastic carcinomas showed positive expression for VEGF, Herb2-Neu and p53 and negative for COX-2, with lymph node involvement and metastases. Although markers study make it possible to evaluate the risk of metastases, more studies involving a greater number of patients are required to validate or not these findings. The work objective was to investigate the VEGF and COX-2 expression in canine mammary cancer and its association to other marker and metastases risk.

Key words: (vascular endothelial growth factor), (cyclooxygenase-2), (canine mammary cancer), (immunohistochemistry)

INTRODUCCIÓN

La angiogénesis es un proceso esencial en el tumor primario para crecer e invadir estructuras adyacentes. El grado de densidad microvascular intratumoral refleja la actividad angiogénica generada por las células neoplásicas y el estroma[15]. El aumento de la angiogénesis está asociado a un diagnóstico desfavorable en enfermedades neoplásicas. El proceso está controlado por factores angiogénicos y angioestáticos que influyen en la proliferación, diferenciación y organización de células endoteliales[8,15].

La enzima ciclooxigenasa (COX), controla la síntesis de prostaglandinas (PGs) a partir del ácido araquidónico. Se reconocen tres isoformas de esta enzima COX-1, COX-2 y COX-3[14]. Esta última deriva del gen que codifica la COX-1 pero es estructural y funcionalmente diferente. Ambas, COX-1 y COX-3, son constitutivas mientras que la COX-2 es inducible[14]. Muchos tumores sobreexpresan COX-2, mientras que esto no sucede en los tejidos normales de los cuales proceden[3,10]. Puede ser inducida por hipoxia, factores de crecimiento, estímulos inflamatorios y varios oncogenes como el proto-oncogén Herb2-Neu[2,15]. En pacientes humanos los estudios indican que la expresión de COX-2 es inapreciable en tejido mamario normal pero aumenta en estadios pre-malignos, en carcinomas ductales, en carcinomas invasivos y en lesiones metastásicas[2,3,10]. También se ha observado que la sobreexpresión de COX-2 tiene lugar preferentemente en los casos que presentan sobreexpresión del proto-oncogén Herb2-Neu, lo cual se debería a la activación de ciertas quinasas y vías metabólicas que estimulan la transcripción de COX-2[2,16]. Aproximadamente de un 20 a un 30% de los cánceres de mama en humanos tienen amplificado y/o sobreexpresado el proto-oncogén Herb2-Neu[1,5]. Este se asocia a incrementos en las tasas de proliferación, comportamientos más agresivos, independencia hormonal y en algunos estudios, aumento de la resistencia a determinados agentes quimioterápicos[1,5,6,14]. En caninos su expresión en cáncer de mama fue correlacionada con un elevado índice mitótico lo que lleva a una rápida progresión y mal pronóstico con pobre respuesta a la quimioterapia[14]. También se ha demostrado que juega un importante papel en la carcinogénesis de la glándula mamaria canina[6].

La COX-2 produce el aumento de la capacidad invasora de un tumor mediante el incremento de la actividad de las metaloproteínas (MMP)4, que son enzimas responsables de la degradación de la matriz de colágeno[2,10,15]. Estimula la angiogénesis, a través de la producción excesiva del VEGF por parte de las células tumorales, fenómeno fundamental para el crecimiento de una neoplasia y el desarrollo de metástasis[7,10,11]. El VEGF es considerado el mitógeno más potente para células endoteliales. Su patrón de expresión citoplasmático se incrementa en relación a la agresividad tumoral[7,11,12,]. El proto-oncogén Herb2-Neu también es capaz de estimular la expresión del

VEGF y mientras que el gen supresor p53 disminuye la transcripción génica del VEGF inhibiendo el crecimiento neoplásico, la proteína p53 mutada tiene disminuida su capacidad de regular la transcripción del VEGF, dando lugar a que las células tumorales respondan menos a los agentes antiangiogénicos[14,17].

Las PGs derivadas de la COX-2 especialmente la prostaglandina E2 (PGE2) induce la síntesis y secreción de VEGF por parte de fibroblastos y macrófagos, y a su vez, el VEGF tiene la capacidad de inducir la expresión de COX-2 en las células endoteliales humanas, con lo que constituyen un bucle de señalización molecular de importancia capital para la angiogénesis[7,8,15]. También afectan el sistema inmune por disminución en la proliferación de las células T y B y en la producción de algunas citoquinas, entorpeciendo de esta manera los procesos de presentación antigénica y por tanto, favoreciendo el desarrollo de la neoplasia[15]. Las PGs estimulan la actividad de la aromatasa aumentando la producción local de estrógenos[8,9]. En pacientes humanos las altas concentraciones de PGE2, si bien inducen al aumento local de estrógenos, se han asociado a la pérdida de RE y RP y a un elevado riesgo de padecer metástasis[9].

El objetivo del presente trabajo fue investigar la expresión del VEGF y de COX-2 para establecer su relación con otros marcadores y para evaluar el riesgo de metástasis en cáncer mamario canino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se trabajó con 17 muestras histopatológicas pertenecientes a pacientes caninos con neoplasias mamarias malignas provenientes del Servicio de Oncología General de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. La edad, raza, estado ginecológico y estadificación clínica[13] de las pacientes se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Edad, raza, estado ginecológico y estadificación clínica de las pacientes.
*Castradas después de los 4 años de edad.

Paciente	Edad (años)	Raza	Estado ginecológico (Castrada No/Si*)	Estadificación clínica*
1	8	Dachshund	No	5
2	13	Cocker Spaniel	Si	4
3	8	Mastín Napolitano	No	5
4	6	Labrador Retriever	No	5
5	14	Pequinés	No	4
6	11	Mestizo	No	3
7	10	Ovejero Alemán	No	5
8	14	Caniche	No	3
9	6	Ovejero Alemán	No	3
10	7	Caniche	No	4
11	11	Mestizo	Si	3
12	15	Setter Irlandés	No	5
13	12	Mestizo	Si	5
14	7	Cocker Spaniel	No	5
15	12	Mestizo	No	5
16	13	Mestizo	Si	5
17	12	Mestizo	No	5

**Estadio clínico 1: T1 N0 M0. Estadio clínico 2: T2 N0 M0. Estadio clínico 3: T3 N0 M0. Estadio clínico 4: cualquier T con N1 y M0. Estadio clínico 5: cualquier T con N1 y M1[13].

T: tumor primário. T1: < 3 cm de diámetro máximo. T2: 3 a 5 cm de diámetro. T3: > 5 cm de diámetro[13].

N: linfonodos regionales. N0: sin metástasis histológica ni citológica. N1: con metástasis histológica o citológica[13].

M: metástasis a distancia. M0: sin metástasis a distancia. M1: con metástasis a distancia[13].

Histopatología

Las muestras de tejido mamario fueron fijadas en formalina bufferada al 10 % y procesadas por el método histológico convencional. Posteriormente los cortes de 5µm, se tiñeron con Hematoxilina-Eosina.

Inmunohistoquímica

Anticuerpos monoclonales utilizados

Anticuerpo monoclonal de ratón anti-VEGF (clon C-1), Santa Cruz, Biotechnology, CA, USA.

Anticuerpo monoclonal de ratón anti-COX-2 (clon 29), Santa Cruz, Biotechnology, CA, USA.

Anticuerpo monoclonal de ratón anti-p53 (clon EP9), Cell Marque, Rockling, CA, USA.

Anticuerpo monoclonal de conejo anti-RE (clon SP1), Cell Marque, Rockling, CA, USA.

Anticuerpo monoclonal de conejo anti-RP (clon Y85), Cell Marque, Rockling, CA, USA.

Anticuerpo monoclonal de ratón anti--Herb2-Neu (clon CB-11), Cell Marque, Rockling, CA, USA.

Procesamiento de las muestras

Para la detección de RE, RP, Herb2-Neu y p53 las secciones de tejido fueron desparafinadas y rehidratadas. Para la recuperación antigénica se utilizó la técnica de recuperación de epitopes inducida por calor (HIER) utilizando el reactivo Trilogy (Cell Marque) lo que permitió el desparafinado, rehidratación y recuperación antigénica en forma simultánea. Luego los portaobjetos se lavaron con agua destilada y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (Cell Marque, Rockling, CA, USA) en una dilución 1:100 durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con Tris-solución salina bufferada (TBS). El anticuerpo secundario correspondiente (Cell Marque, Rockling, CA, USA) se aplicó durante 10 minutos y luego los portaobjetos se lavaron nuevamente con TBS. El color fue desarrollado a los 5 minutos de incubación con el cromógeno. Por último, las muestras fueron deshidratadas y cubiertas con un cubreobjetos.

Para la detección del VEGF y de COX-2 las secciones de tejido fueron desparafinadas y rehidratadas. Se realizó la técnica HIER utilizando tampón de citrato de sodio 10 mM a pH 6.0 y a 95 °C durante 5 minutos. Posteriormente se lavaron con agua desionizada. Luego se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (Santa Cruz, Biotechnology, CA, USA) en una dilución 1:100 durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con TBS. El anticuerpo secundario correspondiente (Santa Cruz, Biotechnology, CA, USA) se aplicó durante 10 minutos y luego fue lavado con TBS. El color fue desarrollado a los 5 minutos de incubación con el cromógeno. Por último, las muestras fueron deshidratadas y cubiertas con un cubreobjetos.

Para el control negativo se sustituyó el anticuerpo primario y como control positivo se utilizó una muestra con reactividad conocida frente al anticuerpo primario.

Evaluación de la inmunomarcación

Las muestras fueron evaluadas a bajo aumento (10x) y luego a mayor aumento (40x). Para el VEGF (Figura 1a y b) se establecieron grupos a partir del porcentaje de células marcadas. La interpretación de los resultados se detalla en la Tabla 2.

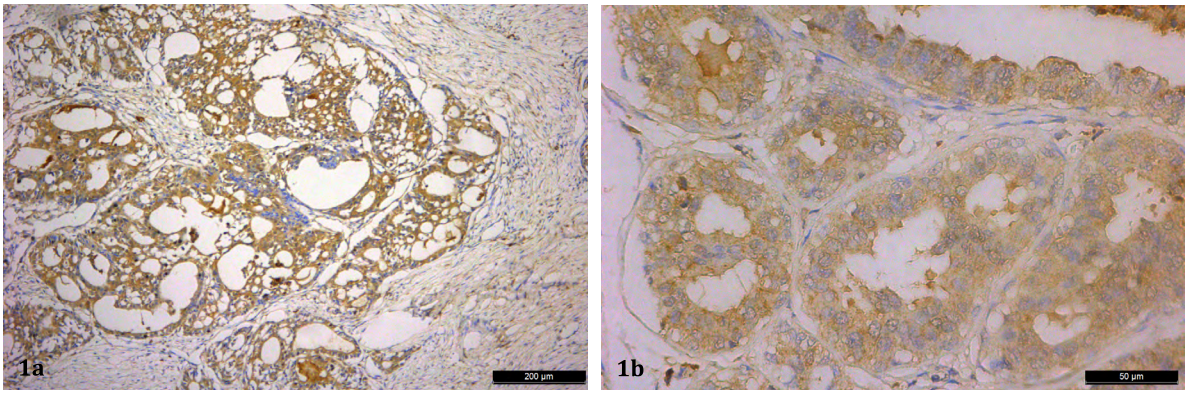

Figura 1a (10x) **1b**(40x). Tejido neoplásico mamario maligno con expresión positiva para la tinción inmunohistoquímica de VEGF.

Tabla 2. Patrón de tinción para VEGF.

Escala	Interpretación
Negativo: -	0-24% de células marcadas
Negativo: -	25-49% de células marcadas
Positivo: +	50-74% de células marcadas
Positivo: ++	≥75% de células marcadas

Para la COX-2 (Figura 2a y b) se valoró la intensidad de la tinción citoplásmica y se establecieron los grupos 0: ausencia de tinción, 1: débil tinción, 2: moderada tinción y 3: fuerte tinción. Luego se estimó el porcentaje de células positivas para cada intensidad en 10 campos de gran aumento y ese porcentaje se multiplicó por la intensidad de tinción. La interpretación de los resultados se detalla en la Tabla 3.

Para RE, RP, p53 y Herb2-Neu (Foto 3a y b) se calculó el porcentaje de células con expresión positiva sobre un total de 3000 células. La interpretación de los resultados se detalla en las Tablas 4, 5 y 6.

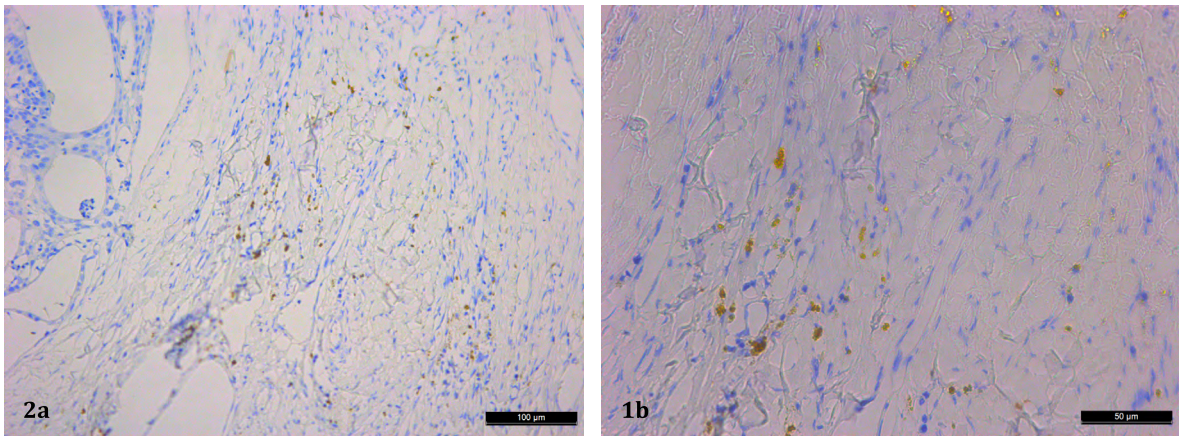

Figura 2a(20x) **2b**(40x). Tejido neoplásico mamario maligno con expresión positiva para la tinción inmunohistoquímica de COX-2.

Tabla 3. Patrón de tinción para COX-2.

Escala	Interpretación
Negativo : -	Intensidad de tinción x % de células teñidas = 0-100
Positivo : +	Intensidad de tinción x % de células teñidas = 101-200
Positivo : ++	Intensidad de tinción x % de células teñidas = 201-300

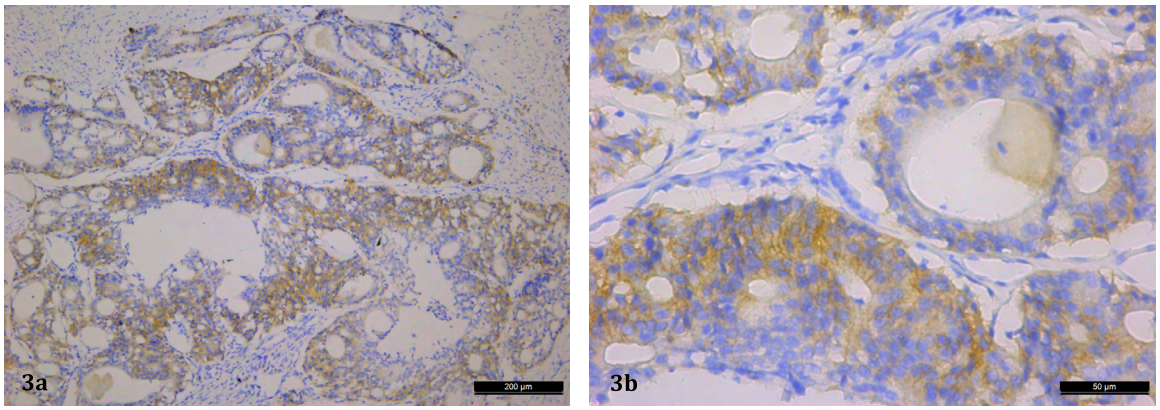

Figura 3a(10x) **3b**(40x). Tejido neoplásico mamario maligno con expresión positiva para la tinción inmunohistoquímica de Herb2-Neu.

Tabla 4. Patrón de tinción para receptores hormonales RE y RP.

Escala	Interpretación
Negativo : -	0-10% de células marcadas
Positivo : +	11-29% de células marcadas
Positivo: ++	≥30% de células marcadas

Tabla 5. Patrón de tinción para p53.

Escala	Interpretación
Negativo : -	0-10% de células marcadas
Positivo : +	11-29% de células marcadas
Positivo : ++	≥30% de células marcadas

Tabla 6. Patrón de tinción para Herb2-Neu.

Escala		Interpretación
Negativo : -	0-29% de células marcadas	(tinción en membrana)
Negativo : -	>30% de células marcadas	(tinción levemente perceptible en parte) de la membrana celular)
Positivo : +	>30% de células marcadas	(tinción leve/moderada en la membrana completa)
Positivo : ++	>30% de células marcadas	(tinción intensa en la membrana completa)

Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de la situación con medidas de posición y con el estudio de las frecuencias de distribución de los marcadores oncológicos determinados por inmunohistoquímica. Para evaluar sobrevida global de los grupos con expresión positiva y negativa de los marcadores oncológicos se empleó el método estadístico de análisis de supervivencia de Kaplan Meier. La comparación entre ellos se realizó mediante el Test de Log-Rank y Cox-Mantel, considerándose significativos los p menores o iguales a 0,05. Se analizó la correlación entre los resultados obtenidos de la

marcación del VEGF y de COX-2 con la marcación del gen mutante p53 y la sobreexpresión de Herb2-Neu y la correlación entre la sobrevida global y la expresión de los marcadores oncológicos, utilizando el coeficiente de correlación de Spearman (Rho). Valores de Rho positivos (+) o negativos (-) indicaron el sentido de la correlación. Rho (0,9 a 0,99) correlación muy alta (+/-), Rho (0,7 a 0,89) correlación alta (+/-), Rho (0,4 a 0,69) correlación moderada (+/-) y Rho (0,2 a 0,39) correlación baja (+/-). Se consideraron significativos los p menores o iguales a 0,05. Se determinó la prevalencia de los distintos tipos histológicos de las neoplasias mamarias malignas halladas (carcinoma complejo, carcinoma simple, carcinoma mixto y carcinoma anaplásico)[4]. Se realizó el estudio de las frecuencias de distribución de los marcadores oncológicos en los distintos tipos histológicos[18].

RESULTADOS

Del total (n=17) de muestras histopatológicas pertenecientes a pacientes con neoplasias mamarias malignas el 64,7 % (n=11/17) presentaron expresión positiva para el VEGF, el 47 % (n=8/17) para COX-2, el 64,7 % (n=11/17) para Herb2-Neu y el 76,5 % (n=13/17) para p53. El 100 % (n=17/17) presentaron expresión negativa para RE y RP. La expresión del VEGF, de COX-2, de Herb2-Neu, de p53 y la sobrevida global de los pacientes se detallan en la Tabla 7. El grupo de pacientes con expresión positiva para el VEGF, COX-2, Herb2-Neu y p53 presentó diferencias significativas en relación al grupo con expresión negativa, con una mediana de supervivencia de 175 y 850 días respectivamente. (p=0,009)

Tabla 7. Expresión de VEGF, COX-2, Herb2-Neu, p53 y sobrevida global de los pacientes.

Paciente	VEGF 64,7% (n=11/17)	COX -247% (n=8/17)	Herb2-Neu 64,7% (n=11/17)	p53 76,5% (n=13/17)	Sobrevida Global (días)
1	+	++	+	++	177*
2	-	-	-	-	128
3	++	++	+	++	93
4	+	+	+	++	171*
5	+	-	-	+	169*
6	-	-	-	-	281
7	+	+	+	++	185*
8	-	-	+	+	185
9	-	-	-	+	219
10	-	-	-	-	850*
11	-	-	-	-	940*
12	+	+	++	++	143*
13	++	++	++	++	118*
14	+	+	+	+	215*
15	+	++	++	++	190*
16	++	-	++	+	70
17	++	-	+	++	95

*Pacientes fallecidas al momento del estudio.

El tipo y grado histológico[4] de las neoplasias mamarias malignas y su frecuencia se detallan en la Tabla 8. El 57 % (n=4/7) de los carcinomas simples y el 100 % (n=4/4) de los carcinomas mixtos presentaron expresión positiva para el VEGF, COX-2, Herb2-Neu y p53 con compromiso de linfonodos y metástasis mientras que el 100 % (n=2/2) de los carcinomas anaplásicos presentaron expresión positiva para el VEGF, Herb2-Neu y p53 y negativa para COX-2, con compromiso de linfonodos y metástasis. Los pacientes con carcinoma anaplásico recidivaron desarrollando características clínicas de carcinoma inflamatorio mamario.

Tabla 8. Tipo, grado histológico y frecuencia de las neoplasias mamarias malignas.

Neoplasia mamaria			
Paciente	**Tipo histológico (OMS-2010)**	**Grado***	**Frecuencia (%)**
1	Carcinoma Simple	I	41,2% (n=7/17)
2	Carcinoma Simple	I	
3	Carcinoma Simple	A	
4	Carcinoma Simple	B	
5	Carcinoma Simple	I	
6	Carcinoma Simple	B	
7	Carcinoma Simple	A	
8	Carcinoma complejo	B	23,5% (n=4/17)
9	Carcinoma complejo	B	
10	Carcinoma complejo	I	
11	Carcinoma complejo	I	
12	Carcinoma mixto	A	23,5% (n=4/17)
13	Carcinoma mixto	I	
14	Carcinoma mixto	A	
15	Carcinoma mixto	I	
16	Carcinoma anaplásico	A	11,8% (n=2/17)
17	Carcinoma anaplásico	I	

*****Grado B: bajo (bien diferenciado). Grado I: intermedio (moderadamente diferenciado). Grado A: alto (pobremente diferenciado)[4].

Se observó una correlación positiva alta/moderada entre los resultados obtenidos de evaluar la expresión del VEGF y de COX-2 con la expresión del p53 (Rho=0.73 p=<0,0013 y Rho=0.76 p=<0,0005 respectivamente) y con la sobreexpresión de Herb2-Neu (Rho=0.71 p=<0,0018 y Rho=0.63 p=<0,007 respectivamente). Se observó una correlación negativa alta entre la sobrevida global y la expresión del VEGF (Rho=-0.77 p=<0,0004), una correlación negativa moderada entre la sobrevida global y la expresión del p53 (Rho=-0.50 p=<0,041) y la sobreexpresión de Herb2-Neu (Rho=-0.53 p=<0,030). Se observó una correlación negativa baja entre la sobrevida global y la expresión de la COX-2 (Rho=-0.22 p=<0,37).

CONCLUSIONES

En concordancia con la bibliografía consultada, la expresión positiva de VEGF, COX-2, Herb2-Neu y p53 se asoció a la pérdida de receptores RE y RP, corta sobrevida global, rápido crecimiento y progresión tumoral, con alta posibilidad de metástasis y recidiva del tumor lo cual se observó en el 57 % de los carcinomas simples y en el 100 % de los carcinomas mixtos positivos a la expresión de VEGF, COX-2, Herb2-Neu y p53 y en el 100 % de los carcinomas anaplásicos positivos a la expresión de VEGF, Herb2-Neu y p53[2,6,9]. Mientras el proto-oncogén Herb2-Neu se asoció a un comportamiento más agresivo con incremento en las tasas de proliferación e indepen-

dencia hormonal, la COX-2 contribuyó aún más al desarrollo de metástasis gracias a su habilidad para regular la angiogénesis, favoreciendo el aporte sanguíneo necesario para la diseminación de las células neoplásicas, lo cual se observó en los carcinomas simples y en los carcinomas mixtos, pero también en los carcinomas anaplásicos positivos a la expresión de VEGF, Herb2-Neu y p53 aunque negativos a la expresión de COX-2[2,7,15]. Los autores consultados señalan que altos niveles de COX-2 se asocian al fenotipo inflamatorio pero esto no fue observado en los 2 pacientes con carcinoma anaplásico que desarrollaron ese comportamiento clínico en el post-quirúrgico[16]. Se requiere de más estudios que involucren un mayor número de pacientes que validen o no dichos hallazgos y permitan su justificación.

Se observó una correlación positiva entre la expresión del VEGF y de COX-2 con la marcación del gen mutante p53 y la sobreexpresión de Herb2-Neu considerando que la expresión del VEGF y de COX-2 puede ser inducida por el proto-oncogén Herb2-Neu y que el 58,8 % de los pacientes con neoplasias mamarias malignas presentaron amplificado y/o sobreexpresado el proto-oncogén Herb2-Neu en un porcentaje mayor que el reportado por la bibliografía consultada[1,5,6,14]. Por otro lado, si bien el gen supresor p53 disminuye la transcripción génica del VEGF inhibiendo el crecimiento neoplásico, la proteína p53 mutada tiene disminuida su capacidad de regular la transcripción del VEGF, dando lugar a que las células neoplásicas respondan menos a los agentes antiangiogénicos[7,15]. Además la PGE2 derivada de la COX-2 también induce la síntesis y secreción del VEGF por parte de fibroblastos y macrófagos, y a su vez, el VEGF tiene la capacidad de inducir la expresión de COX-2 en las células endoteliales humanas. Este bucle de señalización molecular es de importancia capital para la angiogénesis[7,8,15].

También, acorde a lo reportado en pacientes humanos y en caninos, se observó la pérdida de RE y RP[7,9]. Si bien las altas concentraciones de la PGE2 inducen al aumento local de estrógenos, esto está asociado a la pérdida de RE y RP y a un elevado riesgo de padecer metástasis[8,9,15].

El estudio de estos marcadores permite evaluar el riesgo de metástasis y mejora la predicción del tiempo de sobrevida libre de enfermedad. No obstante se requiere de más estudios que involucren un mayor número de pacientes que validen dichos hallazgos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Andrea, GK.; Marko, H.; Branka, A.; *et. al*. Histopathological evaluation and immunohistochemical study of estrogen receptor α, HER-2 and Ki-67 in canine neoplastic mammary lesions. *Veternarski Arhiv.* 2011; 81(6):709-722.
2. De Nardia, AB.; Dalecka, CR.; Amorinb, RL.; *et. al*. Cyclooxigenase-2 expression in primary metastatic and non metastatic canine mammarian carcinomas. *Arch. Med. Vet.* 2013; 45(3):311-16.
3. Doré, M.; Lanthier, I.; Sirois, J. Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. *Veterinary pathology*. 2003; 40(2):207-212.
4. Goldschmidt, M.; Peña, L.; Rasotto, R.; Zappulli, V. Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary pathology*. 2011; 48(1):117-131.
5. Kabir, FML.; DeInnocentes, P.; Agarwal, P.; Mill, CP.; Riese, DJ.; Bird, RC. Estrogen receptor-α, progesterone receptor, and c-erbB/HER-family receptor mRNA detection and phenotype analysis in spontaneous canine models of breast cancer. *J. Vet. Sci.* 2017; 30;18(2):149-58. doi:10.4142/jvs.2017.18.2.149.
6. Kaszak, I.; Ruszczak, A.; Kanafa, S.; Kacprzak, K.; Król, M.; Jurka, P. Current biomarkers of canine mammary tumors. *Acta Vet. Scand.* 2018; 29;60(1):66. doi:10.1186/s13028.018.0417.1.
7. Koutras, A.; Kotoula, V.; Fountzilas, G. Prognostic and predictive role of vascular endothelial growth factor polymorphisms in breast cancer. *Pharmacogenomics.* 2015; 16:79-94.
8. Lala, PK.; Nandi, P.; Majumder, M. Roles of prostaglandins in tumor-associated lymphangiogenesis with special reference to breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2018 Sep; 37(2,3):369-84. doi:10.1007/s10555.018.9734.0.
9. Lange, CA. Integration of progesterone receptor action with rapid signaling events in breast cancer models. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2007; 108:203-12.
10. Lavalle, GE.; Bertagnolli, AC.; Tavares, WLF.; Cassali, GD. Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: cor-

relation with angiogenesis and overall survival. *Veterinary Pathology*. 2009; 46(6):1275-1280.

11. Moschetta, MG.; Maschio, LB.; Jardim-Perassi, BV.; *et. al.* Prognostic value of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor 1α in canine malignant mammary tumors. *Oncology Reports*. 2015; 33:2345-53.

12. Muhammadnejad, A.; Keyhani, E.; *et. al.* Overexpression of her-2/neu in malignant mammary tumors; translation of clinicopathological features from dog to human. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2012; 13(12): 6415-21.

13. Owen, LN. TNM Classification of Tumors in Domestic Animals. 1st ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 1980:1-53.

14. Pradilla, O. E. Ciclooxigenasa 3: La nueva iso-enzima en la familia. *MedUNAB*. 7(21):181-184. En: https://revistas.unab.edu.co/index.php/medunab/article/view/216 (Consultado el 27octubre2021).

15. Queiroga, F.; Pires, I.; Parente, M.; Gregório, H.; Lopes, CS. COX-2 over-expression correlates with VEGF and tumour angiogenesis in canine mammary cáncer. *Vet. Journal.* 2011; 189(1):77-82.

16. Raposo, TP.; Pires, I.; Prada, J.; Queiroga, FL.; Argyle, DJ. Exploring new biomarkers in the tumour microenvironment of canine inflammatory mammary tumours. *Vet. Comp. Col.* 2017; 15:65-66.

17. Santos, AA.; Lopes, CC.; Ribeiro, JR.; *et. al.* Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. *BMC Vet. Res.* 2013 Jan; 9:1. doi:10.1186/1746.6148.9.1.

18. Watson, P.; Petri, A. Statistic for Veterinary and Animal Science, 2nd ed. Blackwell Science, London. 2000.