

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA ANIMAL II

**INFLUENCIA DE LA NUTRICION,
ALTERACIONES GENETICAS Y ASPECTOS CLINICOS
EN LOS TUMORES MAMARIOS CANINOS**

MARIA DOLORES PEREZ ALENZA

**TRABAJO PRESENTADO PARA OPTAR AL GRADO
DE DOCTOR EN VETERINARIA**

Madrid, Septiembre de 1994

A M^a Dolores, Luis
y Pedro Juan

**La paciencia es amarga,
pero sus frutos son dulces**
JJ Rousseau

**Directores: Dr. Gerard R. Rutteman
Dr. Laura Peña Fernandez
Prof. Dr. Wim Misdorp
Prof. Dr. Anton C. Beynen**

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que han colaborado en el planteamiento y desarrollo de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar al Dr. Gerard R. Rutteman por haber ideado el presente trabajo y dirigirlo con éxito. Desde un principio, su gran experiencia investigadora y meticulosidad han hecho posible su realización y garantizado su fiabilidad.

Una mención especial a la Dra. Laura Peña quien con su participación científica y humana, en el diagnóstico histológico y en la elaboración de toda esta Tesis, ha favorecido que un trabajo rodeado de dificultades se convirtiera en la presente realidad.

Al Prof. Dr. Wim Misdorp y al Prof. Dr. Anton C. Beynen por su orientación y consejo científico en la dirección de este trabajo.

Al Prof. Dr. Cees J. Cornelisse y a Nel Kuipers-Dijkshoorn, por la ayuda prestada en la realización e interpretación de la citometría de flujo.

Al Prof. Dr. Manuel Rodriguez Sanchez por su apoyo y estímulo hacia el trabajo en todo momento.

Al Prof. Dr. Alberto Montoya Alonso, por depositar su confianza en mí y enseñarme a dar los primeros pasos en la investigación y en Medicina Veterinaria.

A las clínicas veterinarias Las Lomas, Don Can y San Francisco de Asis y, especialmente a Dr. Enrique Ynaraja, Manuel Gardoqui y Epifanio Martinez por su participación en la recogida de las muestras. Asimismo, a los propietarios que en general colaboraron en la obtención de la información necesaria y a sus animales, que ya son literatura veterinaria.

Al Dr. Bruce E. Belshaw por su inestimable y desinteresada ayuda, consejo y apoyo.

A todos los compañeros del Departamento de Patología Animal II que han contribuido y estimulado la realización de esta Tesis.

A mis familiares y amigos, que de una u otra manera me ayudaron y animaron constantemente a finalizar este trabajo.

Indice

I. Introducción

Introducción y objetivos	8
Revisión bibliográfica	13
<i>Incidencia de los tumores mamarios en la especie canina</i>	13
<i>Carcinogénesis mamaria</i>	13
1. Concepto de carcinogénesis	13
2. Etiología de los tumores mamarios caninos	15
3. Carcinogénesis y contenido de ADN	17
3.1. Determinación del ADN celular mediante citometría de flujo	17
3.1.1. El contenido de ADN en relación al ciclo celular	19
3.1.2. Determinación de la ploidía del ADN en las neoplasias	19
3.1.3. Determinación de la Fracción de Crecimiento	20
3.1.4. Interpretación de los resultados obtenidos mediante citometría de flujo .	21
3.2. Estudio del ADN con citometría de flujo de tumores mamarios en la especie humana	22
3.2.1. Relación con las variables clínicas	25
3.2.2. Relación con las variables histopatológicas	26
3.3. Estudio del ADN con citometría de flujo de tumores en la especie canina	26
4. Influencia de la nutrición en la carcinogénesis	28
4.1. Métodos de estudio de las relaciones entre la nutrición y el cáncer	28
4.1.1. Estudios epidemiológicos	28
4.1.2. Estudios experimentales	31
4.2. Influencia de la nutrición en la carcinogénesis mamaria en la especie humana	31
4.2.1. Ingesta calórica, obesidad y conformación corporal en relación a la carcinogénesis mamaria	31
4.2.1.1. Ingesta calórica, obesidad, conformación corporal y carcinogénesis mamaria: estudios epidemiológicos	31

4.2.1.2.	Ingesta calórica, obesidad, conformación corporal y carcinogénesis mamaria: estudios experimentales	35
4.2.2.	Nutrientes específicos en relación a la carcinogénesis mamaria	36
4.2.2.1	Contenido lipídico en relación a la carcinogénesis mamaria.	36
4.2.2.1.1.	Lípidos y carcinogénesis mamaria: estudios epidemiológicos	37
4.2.2.1.1.1.	Estudios epidemiológicos sobre el contenido graso de la dieta	37
4.2.2.1.1.2.	Estudios epidemiológicos sobre diferentes tipos de grasa	41
4.2.2.1.2.	Lípidos y carcinogénesis mamaria: estudios experimentales	45
4.2.2.1.2.1.	Estudios experimentales sobre el contenido graso de la dieta	45
4.2.2.1.2.2.	Estudios experimentales sobre diferentes tipos de grasa	48
4.2.2.2.	Contenido proteico en relación a la carcinogénesis mamaria	50
4.2.2.2.1.	Proteínas y carcinogénesis mamaria: estudios epidemiológicos	50
4.2.2.2.2.	Proteínas y carcinogénesis mamaria: estudios experimentales	51
4.2.2.3.	Contenido en hidratos de carbono en relación a la carcinogénesis mamaria	52
4.2.2.3.1.	Hidratos de carbono y carcinogénesis mamaria: estudios epidemiológicos	53
4.2.2.3.2.	Fibra y carcinogénesis mamaria: estudios epidemiológicos	54
4.2.2.3.3.	Hidratos de carbono y carcinogénesis mamaria: estudios experimentales	55
4.2.2.3.4.	Fibra y carcinogénesis mamaria: estudios experimentales	56
4.2.2.4.	Contenido en micronutrientes en relación a la carcinogénesis mamaria	57
4.2.2.4.1.	Mecanismos de defensa frente a la oxidación	57
4.2.2.4.2.	Selenio en relación a la carcinogénesis mamaria	57

4.2.2.4.2.1. Selenio y carcinogénesis mamaria: estudios epidemiológicos	58
4.2.2.4.2.2. Selenio y carcinogénesis mamaria: estudios experimentales	59
4.2.2.4.3. Vitamina A en relación a la carcinogénesis mamaria	60
4.2.2.4.3.1. Vitamina A y carcinogénesis mamaria: estudios epidemiológicos	61
4.2.2.4.3.2. Vitamina A y carcinogénesis mamaria: estudios experimentales	63
4.3. Influencia de la nutrición en la carcinogénesis mamaria en la especie canina	65
<i>Pronóstico de los tumores mamarios caninos</i>	66

II. Hallazgos clínicos e histológicos en 102 perras con tumores mamarios benignos y malignos

Introducción	68
Material y métodos	69
1. Animales	69
2. Examen clínico	70
2.1. Anamnesis	70
2.2. Exploración clínica	70
2.3. Estadaje clínico	71
2.4. Evaluación prequirúrgica	72
3. Tratamiento de los tumores mamarios	72
4. Estudio histológico	73
4.1. Toma de muestras	73
4.2. Procesado de las muestras	73
4.3. Diagnóstico histológico	73
4.4. Estudio citológico	74
5. Análisis estadístico	74
Resultados	74
1. Número y tipo de tumores	74
2. Influencia de la edad y del estado hormonal	75

3. Resultados clínicos	76
3.1. Localización de los tumores	76
3.2. Tamaño y crecimiento tumoral	76
3.2.1. Grupo I: Displasias y tumores benignos	78
3.2.2. Grupo II: Tumores malignos	80
4. Resultados histológicos	83
4.1. Grupo I: Displasias y tumores benignos	83
4.2. Grupo II: Tumores malignos	83
4.2.1. Tipo histológico	83
4.2.2. Grado de malignidad	84
Discusión	86

III. Análisis del contenido de ADN de los tumores mamarios caninos mediante citometría de flujo

Introducción	89
Material y métodos	89
1. Animales y examen clínico	89
2. Tratamiento quirúrgico y toma de muestras	90
3. Estudio histológico	91
4. Citometría de flujo:	92
4.1. Procesado de las muestras	92
4.2. Análisis mediante citometría de flujo	93
4.2.1. Estandardes	93
4.2.2. Mediciones	94
4.2.3. Definición de ploidía del ADN	94
4.2.4. Determinación de la fracción de células en fase S	95
4.3. Análisis estadístico	96
Resultados	96
1. Distribución de la ploidía del ADN en los tumores mamarios caninos	96

1.1.	Generalidades	96
A)	Displasias y tumores benignos	97
B)	Tumores malignos	97
1.2.	Distribución de la ploidía del ADN	99
A)	Displasias y tumores benignos	99
B)	Tumores malignos	99
C)	Ploidía del ADN en neoplasias múltiples	100
1.3.	Relación de la ploidía del ADN con el estadiaje clínico	104
A)	Displasias y tumores benignos	104
B)	Tumores malignos	106
B.1.	Ploidía del ADN en relación con el estadio clínico	106
B.2.	Ploidía del ADN en relación con el tamaño tumoral	106
1.4.	Relación de la ploidía con las características histológicas	107
A)	Displasias y tumores benignos	107
B)	Tumores malignos	108
B.1.	Ploidía del ADN en relación al tipo histológico	108
B.2.	Ploidía del ADN en relación al grado histológico y grado nuclear de malignidad	110
1.5.	Análisis de la ploidía del ADN en las metástasis	111
2.	Determinación de la fracción de células en fase S (SPF).	112
2.1.	Generalidades	112
A)	Displasias y tumores benignos	112
B)	Tumores malignos	112
2.2.	Relación de la SPF con el estadiaje clínico	113
A)	Displasias y tumores benignos	113
B)	Tumores malignos	113
B.1.	SPF en relación al estadio clínico	113
B.2.	SPF en relación al tamaño tumoral	114
2.3.	Relación de la SPF con las características histológicas	115

A) Displasias y tumores benignos	115
B) Tumores malignos	115
Discusión	117

IV. Influencia de la nutrición en la carcinogénesis mamaria en la especie canina. Estudio epidemiológico caso-control

Introducción	124
Material y métodos	125
1. Grupos de animales	125
A. Grupos controles	125
B. Grupo casos	126
2. Cuestionario dietético	127
3. Perfil dietético	129
4. Datos clínicos	130
4.1. Examen clínico	130
4.2. Estadiaje	130
5. Toma de muestras	131
5.1. Sangre	131
5.2. Grasa subcutánea	131
6. Análisis de indicadores nutricionales	131
6.1. Selenio sérico	132
6.2. Retinol sérico	132
6.3. Acidos grasos subcutáneos	132
7. Análisis estadístico	134
Resultados	134
1. Edad, raza y estado reproductivo	134
2. Conformación corporal	137
3. Factores dietéticos	139
I. Tipo de alimentación: casera/comercial	139

II. Contenido en macronutrientes: hidratos de carbono, grasas y proteínas	140
III. Consumo de determinados alimentos	142
IV. Indicadores nutricionales: selenio, retinol y perfil de ácidos grasos	143
Discusión	146
V. Conclusiones	152
VI. Resumen	154
VII. Summary	156
VIII. Bibliografía	157

Capítulo I
Introducción

INTRODUCCION Y OBJETIVOS

Introducción

Los tumores mamarios constituyen las neoplasias de mayor incidencia en la perra, pues se elevan a 260 casos de cada 100.000 perras no ovariectomizadas (Dorn y col., 1968); esto supone una frecuencia de aparición tres veces superior a la observada en la mujer (Schneider, 1970).

Los tumores mamarios caninos (TMC) se han propuesto como modelo comparativo para el estudio del cáncer de mama en la mujer por numerosos autores (Bostock, 1975; Dorn y col., 1968; Hamilton, 1974; Misdorp y Hart, 1976; Owen, 1979; Schneider, 1970; Strandberg, 1974), ya que estas neoplasias presentan características similares en ambas especies. Así, por ejemplo, tanto en la mujer como en la perra, los tumores se presentan en pacientes adultos o viejos, suelen ser de aparición espontánea, los principales factores conocidos que influyen en la carcinogénesis son las hormonas sexuales y no se ha podido establecer una etiología vírica en ninguno de los dos casos. Por otro lado, los tumores epiteliales guardan histológicamente cierta similitud.

Desde un punto de vista clínico, los tumores mamarios caninos tienen una presentación muy variable: desde pequeños nódulos que no infiltran los tejidos adyacentes y con un comportamiento aparentemente benigno, hasta nódulos de gran tamaño con signos evidentes de malignidad tales como ulceración, adherencia a planos profundos, afectación de los ganglios linfáticos regionales y, en último extremo, presencia de metástasis distales. Esta diversidad clínica de los TMC prosigue en su evolución posterior pues, a excepción de aquellos casos con presencia de metástasis a distancia cuyo desenlace es previsible, resulta difícil predecir el futuro comportamiento de la mayoría de los tumores ya que suelen ser detectados en estadios más iniciales.

La ya mencionada variabilidad en el comportamiento biológico de los TMC es

posiblemente una consecuencia de su complejidad histológica pues las células tumorales pueden proceder de cualquiera de los tres componentes celulares presentes en la glándula mamaria: epitelial, mioepitelial y mesenquimatoso (Hampe y Misdorp, 1974). Existen escasos estudios de seguimiento clínico en relación al tipo histológico (Schneider y col., 1969; Bostock, 1975; Misdorp y Hart, 1976; Brodey y col., 1983; Kurtzman y Gilbertson, 1986) concluyéndose que, aunque el diagnóstico histológico de los TMC resulta imprescindible, no es suficiente para el establecimiento de pronósticos más precisos.

Por ello, en los últimos años han aparecido nuevas investigaciones en los TMC encaminadas a la consecución de nuevos factores pronóstico y, más recientemente, de carcinogénesis. Los factores hormonales han sido los más estudiados hasta el momento; según se ha demostrado tanto en estudios de toxicidad como epidemiológicos, las hormonas ováricas y muchos derivados esteroides sintéticos ejercen un papel fundamental en la carcinogénesis (Rutteman, 1990); es un hecho conocido que la ovariectomía realizada a temprana edad es la medida preventiva más eficaz frente a estos tumores (Moulton y col., 1970; Misdorp, 1988; McEwen y Withrow, 1989) y, por otra parte, los tumores hormonodependientes gozan de un mejor pronóstico en mujeres postmenopausicas (Chevallier y col., 1988).

Sin embargo, la carcinogénesis es un proceso multifactorial en el que influyen tanto factores intrínsecos como extrínsecos que, de un modo u otro, producen una alteración en el ADN celular, afectando a la funcionalidad de determinados genes. Este es un campo de creciente interés para los investigadores, conlleva el conocimiento de las alteraciones del cariotipo, e incluye, por ejemplo, el estudio de ciertas características celulares mediante el análisis con citometría de flujo. En los últimos años, esta técnica analítica ha empezado a ser empleada en investigación y de forma rutinaria en Medicina Humana para conocer el contenido de ADN de las células tumorales. Por el contrario, en Medicina Veterinaria son muy escasos los trabajos que estudian las alteraciones del ADN celular y concretamente sólo existen dos que utilicen la citometría de flujo en el estudio de TMC (Rutteman y col., 1988;

Hellmén y col., 1988).

Dentro de los factores extrínsecos que influyen en la carcinogénesis se incluyen ciertos factores ambientales que son potencialmente carcinógenos y se encuentran en el medio que nos rodea. Existe una honda preocupación en la opinión pública sobre este tema, que ha originado la aparición de investigaciones encaminadas a determinar qué factores ambientales influyen en el proceso de carcinogénesis; de ellas un gran número tratan de esclarecer el papel de diversos elementos de la dieta en el desarrollo de ciertos tumores humanos y de animales de experimentación, entre ellos los más estudiados son los de mama y colon humanos (Alfin-Slater y Kritchevsky, 1991).

Es evidente que la determinación de aquellos componentes de la alimentación que influyen positiva o negativamente en la carcinogénesis, reviste una gran importancia, ya que se podría modificar su consumo evitando así un proceso inicial de carcinogénesis, o bien logrando un enlentecimiento de tumores ya aparecidos.

En la actualidad, existe una gran controversia a la hora de establecer relaciones dieta-cáncer definitivas, debido en parte a la complejidad de los estudios epidemiológicos en sí mismos y, en parte, a la falta de acuerdo entre los resultados obtenidos por los diversos grupos de investigación tanto a nivel experimental como epidemiológico. Asimismo, por un lado, una parte de la comunidad científica opina que los datos actuales no son hallazgos comprobados de manera inequívoca y que, en base a ellos, el establecimiento de recomendaciones dietéticas sería prematuro; por otro lado, ciertos grupos de investigadores sostienen que, si tras la aplicación de las recomendaciones dietéticas se consiguiera una ligera reducción de las elevadas cifras de mortalidad por cáncer en los países industrializados, este hecho merecería en cualquier caso la pena.

En Medicina Veterinaria son prácticamente inexistentes las investigaciones enfocadas a determinar la influencia de la dieta en la carcinogénesis de los tumores de los animales de compañía (Sonnenschein y col., 1991; Shofer y col., 1989).

En el caso de la nutrición, los TMC también sirven como modelo extrapolable

a los tumores mamarios humanos, debido fundamentalmente a que los animales de compañía conviven estrechamente con el hombre y que un gran número de ellos consumen en parte o en su totalidad los mismos alimentos que sus propietarios. Además el estudio en la especie canina presenta una ventaja añadida ya que la dieta del perro es mucho menos variable y diversa que la del ser humano, lo que origina que un estudio epidemiológico de este tipo entrañe una menor dificultad y por tanto un menor error que uno similar realizado en la población humana.

En definitiva, la ausencia de conclusiones fiables en los tumores mamarios en la especie humana y sobre todo en la especie canina en los diversos campos abordados en esta introducción, nos impulsaron a plantearnos este trabajo. No cabe duda de que el hecho de servir como modelo experimental para la especie humana le confiere a nuestro trabajo una gran importancia. No obstante, desde nuestro punto de vista veterinario el enfoque hacia la especie canina es en sí de gran interés al ser los TMC una de las causas más frecuentes de muerte de los animales de compañía.

Se trata, a grandes rasgos, de ofrecer mejores perspectivas en cuanto a la prevención, control y posibilidades terapéuticas del cáncer así como de calidad de vida de nuestros animales.

El formato empleado en este trabajo, difiere del tradicional de los trabajos de Tesis Doctorales presentados en la Universidad Complutense de Madrid, ya que consta de cuatro capítulos independientes. El primero corresponde a una revisión bibliográfica y los tres siguientes constituyen estudios diferentes y constan a su vez de apartados de introducción, material y métodos, resultados y discusión. Finalmente, se presentan las principales conclusiones de todo el estudio. El motivo de presentar esta Tesis Doctoral con el mencionado formato, aceptado por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido que se ha realizado en colaboración con centros de investigación holandeses y bajo la co-dirección de investigadores de este país, por lo que hemos tenido que homologar criterios de organización y presentación de trabajos de Tesis Doctorales en ambos países.

En el presente trabajo nos hemos planteado la consecución de los siguientes objetivos:

Objetivos

1. Realizar un estudio clínico completo de un número significativo de perras con tumores mamarios.
2. Analizar el contenido de ADN de los tumores mamarios objeto de este trabajo, determinando el Índice de ADN y la fracción de células en fase S mediante citometría de flujo.
3. Relacionar los resultados obtenidos del análisis del ADN tumoral con diversos aspectos clínicos e histológicos.
4. Establecer si la alimentación y la obesidad influyen en la incidencia de las neoplasias mamarias en la perra.
5. Determinar el posible efecto de ciertos alimentos y componentes de la dieta en la incidencia de los tumores mamarios caninos: grasas, proteínas y carbohidratos.
6. Estudiar la posible influencia de determinados micronutrientes (selenio y retinol) así como del perfil de ácidos grasos de tejido adiposo subcutáneo en la incidencia de los tumores mamarios caninos.

REVISION BIBLIOGRAFICA

Incidencia de los tumores mamarios en la especie canina

Los tumores mamarios constituyen la neoplasia más frecuente en la perra, con una incidencia anual de 260 de cada 100.000 perras no ovariectomizadas (Dorn y col., 1968), siendo esta incidencia tres veces superior a la de la mujer (Schneider, 1970). En machos, la frecuencia de presentación es muy baja, de 0 a 2'7% (Brodey y col., 1983) y la edad media descrita en la literatura es de 10'7 años, superior a la de las hembras. En el hombre, la incidencia supone un 1% de la frecuencia con que aparece en la mujer (Theilen y Madewell, 1987).

El riesgo de aparición de los tumores empieza a aumentar a partir de los 6 años de edad, siendo 10 años la edad media de mayor incidencia. Se han descrito los perros de caza como las razas de mayor riesgo (pointer, setter, spaniel breton y labrador retriever) aunque se han observado incidencias elevadas en otras razas no cazadoras (pastor de los pirineos, samoyedo, diversos tipos de caniches y terriers). Se consideran razas de bajo riesgo el collie y los mestizos (McEwen y Withrow, 1989; Theilen y Madewell, 1987).

Carcinogénesis mamaria

1. Concepto de carcinogénesis

Antes de comenzar a revisar la bibliografía existente sobre la etiología de los TMC creemos conveniente resumir algunas nociones básicas sobre la carcinogénesis para facilitar la comprensión de otros aspectos que posteriormente se tratarán en profundidad. Para ello comenzamos definiendo brevemente la carcinogénesis como el resultado final de múltiples alteraciones genéticas que originan un crecimiento celular autónomo y sin control (Cairns, 1981).

La transformación neoplásica puede producirse por numerosos agentes tales como sustancias químicas, energía radiante o determinados virus (Cotran, 1990). A

continuación nos vamos a referir sólo al proceso de carcinogénesis química, ya que no existen datos convincentes que avalen la participación de los otros dos grupos de agentes mencionados en la transformación maligna de las células de la glándula mamaria de la mujer y de la perra (Theilen y Madewell, 1987).

La carcinogénesis química es un proceso multifactorial y dinámico que se produce en generaciones sucesivas de células que pasan por múltiples estadios, los cuales se pueden resumir en iniciación y provocación (Pitot, 1986).

Iniciación. Es un estadio en el que se produce una alteración permanente e irreversible del ADN de las células diana, dando lugar a las denominadas células iniciadas. Los productos que "inician" el proceso de carcinogénesis se denominan *carcinógenos iniciadores*. Son compuestos altamente reactivos que pueden actuar sobre el ADN, el ARN o las proteínas celulares; parece ser que actúan preferentemente sobre el ADN ya que la mayoría de ellos poseen capacidad mutagénica. Estos compuestos iniciadores pueden actuar de forma directa (carcinógeno), o bien necesitar una transformación metabólica y actuar a través de sus metabolitos activos (procarcinógenos o carcinógenos indirectos). Además, pueden actuar de forma sinérgica con la acción transformadora de otros carcinógenos (co-carcinógeno).

Provocación. Para que la mutación del ADN que ha tenido lugar durante la iniciación se exprese, es necesaria la exposición posterior a otros carcinógenos denominados *provocadores* o promotores. Son compuestos no electrófilos que no lesionan el ADN. Las alteraciones producidas por los promotores son reversibles, a diferencia de las producidas por los carcinógenos. Su acción parece ser epigenética lo que implica la expresión alterada de la información genética contenida en las células (Cotran, 1990).

Estos dos procesos van seguidos del fenómeno conocido como **progresión** tumoral que se produce en el intervalo entre la transformación y la detección clínica del tumor y consiste en la aparición de múltiples subclones fenotípicamente diferentes surgidos por mutaciones en las células ya aberrantes, lo que les confiere

ciertas características en su capacidad de infiltración, su velocidad de crecimiento, su respuesta a las hormonas y su sensibilidad a los fármacos antineoplásicos (Foulds, 1975).

Las alteraciones del ADN que tienen lugar en la iniciación y progresión tumorales, pueden afectar a determinados genes cuya estructura y función resultan, así, modificadas. Estos genes pueden clasificarse en dos grupos: protooncogenes y genes supresores. Los protooncogenes (presentes en las células normales) están implicados en el control del crecimiento o en la diferenciación celulares y cuando sufren mutaciones tales como sustituciones de nucleótidos, deleciones, inserciones o amplificaciones genéticas entre otras, que actúen de un modo dominante, se transforman en oncogenes responsables de una proliferación celular excesiva e incorrecta. Los denominados genes supresores del cáncer, que en la célula normal inhiben la proliferación celular, tras sufrir mutaciones de tipo recesivo quedan inactivados, participando de este modo en la transformación maligna (Weinberg, 1989).

2. Etiología de los tumores mamarios caninos

El proceso de carcinogénesis en los tumores mamarios caninos hasta donde se conoce, se trata de una secuencia de transformaciones de tipo químico, al ser los factores etiológicos de mayor importancia los de tipo hormonal, siendo las hormonas ováricas las que ejercen un papel fundamental como agentes provocadores (Theilen y Madewell, 1987). Por ello, el riesgo de aparición de neoplasia mamaria en perras que son ovariectomizadas antes de la aparición del primer celo queda reducido a un 0'05% según algunos autores (McEwen y Withrow, 1989) o bien a un 0'5% según otros investigadores (Theilen y Madewell, 1987). Si la ovariectomía se realiza después del segundo celo, el riesgo se reduce a un 26% y si se lleva a cabo después de los dos años y medio de edad el riesgo de aparición de tumores de mama apenas disminuye (Theilen y Madewell, 1987). Además, según Rutteman (1990), en este último caso decrece sólo el riesgo de aparición de neoplasias benignas. No solo las

hormonas endógenas influyen en la carcinogénesis, sino que ésta depende también de ciertos esteroides hormonales empleados en la clínica veterinaria para evitar el celo, tratar pseudogestaciones, o cubriciones no deseadas (Rutteman y col., 1988). Algunos estudios han demostrado que el empleo combinado de estrógenos y progestágenos favorece la aparición de tumores malignos (Casey y col., 1979; Connannon y col., 1981), y dosis bajas o moderadas de progestágenos el desarrollo de neoplasias benignas (Rutteman, 1990; Misdorp, 1988).

Al igual que ocurre en los tumores mamarios de la especie humana (Kallioniemi y col., 1987; Chevallier y col., 1988), se ha demostrado la hormonodependencia de los TMC, detectándose la presencia de receptores de estrógenos, progesterona y prolactina (McEewen y col., 1982; Mialot y col., 1982; D'Arville y Pierrepoint, 1979). Dichos receptores hormonales suelen estar presentes en mayor número en glándulas normales y en neoplasias benignas que en tumores malignos y no están presentes en las metástasis (Rutteman y col., 1986 y 1988).

Otro factor que ha sido estudiado en relación con la carcinogénesis es el número de gestaciones; en algunos estudios clínicos se describe una mayor incidencia de TMC en perras nulíparas o que habían tenido pocos cachorros en comparación con perras que habían tenido camadas numerosas (Strandberg, 1974). Determinadas alteraciones como celos irregulares, presencia de quistes foliculares, cuerpo lúteo persistente, hiperplasia endometrial y pseudogestación no aumentan el riesgo (Schneider y col., 1969) así como tampoco la edad al primer parto (Taylor y col., 1976; Schneider y col., 1969).

Asimismo, el papel de las hormonas hipofisarias es confuso. Recientemente se ha comprobado que los progestágenos inducen la producción de hormona del crecimiento en la glándula mamaria en la perra (Selman y col., 1994) por lo que actualmente no se puede descartar un posible papel de esta hormona en la carcinogénesis mamaria. También se ha comprobado que los tratamientos prolongados con acetato de medroxiprogesterona y progesterona en la perra, aumentan la incidencia de tumores mamarios, originan cambios acromegálicos y

aumentan los niveles sanguíneos de hormona de crecimiento (El Etreby y col., 1980). Por todo ello algunos autores (Rutteman, 1990) mantienen la hipótesis de que la mayor secreción de hormona de crecimiento inducida en los tratamientos con progestágenos en la práctica veterinaria ejerce un efecto directo en la carcinogénesis mamaria independientemente del efecto de la progesterona. Sin embargo, se ha observado que los niveles sanguíneos de hormona del crecimiento en perras con tumores espontáneos, son similares a los de perras sanas (Rutteman y col., 1989). El papel de la prolactina tampoco se ha esclarecido, aunque cabe destacar que esta hormona, en otras especies, posee una acción mitógena en tumores (Manni y Wright, 1985; Peyrat y col., 1984) y que los receptores de prolactina se encuentran en menor medida en tumores que en tejido sano (Rutteman y col., 1988).

Para finalizar este capítulo referente a la carcinogénesis mamaria canina creemos conveniente mencionar que algunos autores han encontrado partículas retrovíricas en tumores de mama en la perra (Watrach y col., 1978) y en la gata (Calafat y col., 1977). Sin embargo, estos hallazgos parecen constituir hechos aislados, pudieran tratarse de virus transitorios no responsables de la enfermedad y en general no se consideran suficientes para establecer una posible etiología vírica de dichos tumores (Theilen y Madewell, 1987).

3. Carcinogénesis y contenido de ADN

3.1. Determinación del ADN celular mediante citometría de flujo

Como ya hemos señalado, y de acuerdo con todos los autores consultados, el hecho último que determina la aparición de las neoplasias en el proceso de carcinogénesis es la alteración en mayor o menor grado del ADN celular. Por ello, el contenido de ADN de las células tumorales en la mayoría de los tumores sólidos es anormal debido a las alteraciones cromosómicas que se producen durante el proceso de iniciación y/o progresión tumorales (Beerman, 1991) y puede investigarse de diversas formas, entre ellas la más utilizada en la actualidad es la citometría de flujo.

La citometría de flujo es una técnica analítica basada en la medición de la fluorescencia que emite una suspensión celular. Los tejidos a analizar son disgregados para obtener una suspensión monodispersa que posteriormente es teñida con determinados conjugados fluorescentes con capacidad de unirse de manera específica a componentes celulares como el ADN, el ARN, o antígenos celulares. Los conjugados empleados para analizar el contenido de ADN se denominan fluorocromos intercaladores ya que forman complejos con la doble cadena de ADN intercalándose entre los pares de bases de la cadena. Los más empleados son el yoduro de propidio (PI) y el bromuro de etidio (EB) (Magdelénat, 1991).

Una vez que las células en suspensión están teñidas, se hacen pasar en hilera en forma de flujo laminar mientras la fuente de luz (normalmente láser) emite un haz sobre las partículas que son así registradas en el sistema detector del citómetro. La información registrada es procesada de varias formas, la que a nosotros nos ocupa es la que ofrece los datos en forma de histogramas de frecuencia de las células, y almacenada en un ordenador (Magdelénat, 1991).

Los citómetros de flujo permiten actualmente un rango amplio de posibilidades analíticas, entre las que se incluyen el tamaño celular y nuclear, análisis mitocondrial, análisis del ARN y ADN, determinación de la estructura cromática, de las proteínas totales, entre otros muchos (Myc, 1991). Mediante citometría de flujo podemos detectar cambios en la ploidía del ADN ya que permite el análisis de un gran número de células, entre 10.000 y 20.000 en unos minutos, permitiendo la detección de, al menos, una diferencia en el contenido de ADN celular de un 40% del ADN (Vindelov y col., 1983) lo que corresponde al contenido de ADN del cromosoma número uno humano (Mendelson y col., 1973).

Sin embargo, esta técnica presenta el inconveniente de no detectar las alteraciones cromosómicas estructurales por lo un contenido normal de ADN no excluye la existencia de alteraciones citogenéticas (Devilee y Cornelisse, 1990). No obstante, y a pesar de ser una técnica cara, sofisticada y que necesita personal especializado, es la más empleada para la investigación del ADN en el cáncer en todo el mundo.

3.1.1. El contenido de ADN en relación al ciclo celular

El ciclo celular puede dividirse en 5 fases: la fase G_0 o fase de reposo celular, la fase G_1 o fase de producción de enzimas necesarias para la síntesis de ADN y de ARN, la fase S o de duplicación del ADN, la fase G_2 en la que tiene lugar la síntesis de ADN y de ARN, la formación del aparato mitótico y de proteínas necesarias, y la fase M de mitosis (Vielh y col, 1991).

El término ploidía hace referencia al número de cromosomas o cariotipo; mientras que el término ploidía del ADN hace referencia al contenido de ADN que, determinado mediante citometría de flujo se expresa en términos de Índice de ADN (Vielh y col., 1991).

Durante las fases G_0 y G_1 la célula posee una dotación cromosómica haploide, es decir un contenido de ADN en relación a la ploidía de $2C$. Durante la fase G_2 y en ciertas fases de la mitosis, la célula posee doble cantidad cromosómica, es decir un contenido de ADN de $4C$, y durante la fase S la dotación cromosómica oscila entre $2C$ y $4C$ (Vielh y col, 1991).

Al analizar un tejido normal, encontraremos una distribución de células que se encuentran en las diferentes fases del ciclo celular. Un histograma obtenido mediante citometría de flujo nos ofrece las frecuencias de distribución de las células según su contenido de ADN, es decir el porcentaje de células que se encuentran en cada una de estas fases celulares (Vielh y col., 1991).

3.1.2. Determinación de la ploidía del ADN en las neoplasias

Tras la publicación de varios estudios realizados mediante citometría de flujo en distintos tumores, y en especial en cáncer de mama, fue necesario uniformar criterios con respecto a las anomalías de la ploidía del ADN, para facilitar su clasificación. Así, en la Convención de 1984 de la Sociedad de Analítica se establecieron los conceptos básicos en este sentido (Hiddeman y col., 1984). Se estableció que el nivel de ploidía del ADN se expresaría en lo que se conoce como Índice de ADN o IA, definiéndose éste como la relación entre el contenido de ADN

de la población de células tumorales que se encuentra en las fases G_0 y G_1 ($G_{0,1}$) y el contenido de ADN de una población celular normal en fase $G_{0,1}$ que es diploide y que corresponde a un contenido de 23 pares de cromosomas en la especie humana (Hiddeman y col., 1984).

También se establecieron cómo debían realizarse los controles necesarios para verificar la población diploide en el histograma; se deben efectuar mediante la adición del denominado "estándar interno", el cual ha de ser una suspensión nuclear normalmente de glóbulos rojos de pollo o de trucha de acuerdo con lo señalado previamente por Vindelov (1983).

Asimismo se acordó que las poblaciones celulares cuyos índices de ADN difieran de 1.00 deben considerarse aneuploides. Dichas poblaciones aneuploides se clasificarán en función del Índice de ADN.

Las alteraciones de la ploidía en una población celular pueden deberse fundamentalmente a los siguientes mecanismos (Vielh y col., 1991): Segregaciones cromosómicas incorrectas que den lugar a pérdidas o ganancias completas de cromosomas, recombinaciones estructurales que produzcan deleciones o duplicaciones cromosómicas y amplificaciones y endorreduplicaciones que originen tetraploidía (Shackney y col., 1989).

3.1.3. Determinación de la Fracción de Crecimiento

Fracción de Crecimiento (FC) se denomina a la proporción de células de un tumor que se encuentra en el reservorio proliferativo, es decir en las fases G_1 , S, G_2 o M (Cotran, 1990). La FC puede determinarse empleando diversos métodos analíticos; entre otros, y como se ha realizado tradicionalmente se encuentran el índice mitótico, la medición de la incorporación al ADN de precursores específicos como el análisis por autorradiografía de la incorporación de timidina tritiada (Tubiana y col., 1984; Meyer y col., 1986).

También empleando citometría de flujo es posible calcular la FC mediante la determinación de la fracción de células en fase S del ciclo celular o S-phase fraction

(SPF). La fracción de células en fase S representa una pequeña proporción, ya que normalmente no supera el 10% del número total de células. Para su determinación, es necesario eliminar los artefactos que aparecen en el histograma debidos a los detritos celulares presentes en la muestra, bien por estar presentes en el propio tumor o por ser secundarios al procesado de la muestra (Vielh y col., 1991).

Para el cálculo de la SPF pueden emplearse sistemas matemáticos, entre otros, el modelo rectangular propuesto por Baisch y col. (1975) en el que la fase S corresponde al área de un rectángulo trazado sobre el histograma entre la mitad del pico $G_{0,1}$ y la mitad del pico G_2/M . Una variante del método anterior es el trapezoidal propuesto por el mismo autor (1982). Otros métodos empleados son el modelo propuesto por Barlogie y col. (1976) y el de distribución múltiple de Fried y col. (1976).

3.1.4. Interpretación de los resultados obtenidos mediante citometría de flujo

La obtención de resultados mediante la interpretación de los histogramas requiere, además de experiencia, uniformidad de criterios entre los distintos laboratorios, como hemos mencionado anteriormente. La dificultad de la interpretación puede agravarse por la presencia de varios factores como, por ejemplo, la autólisis que es una fuente potencial de falsos picos aneuploides en los histogramas obtenidos de material parafinado (Joensuu y col., 1990). Otro problema es la presencia en el histograma de picos excesivamente anchos, lo que puede ser debido a una mala preparación de la muestra o a la presencia de células con diferentes contenidos cromosómicos (Shackney y col., 1990).

Otra dificultad añadida es la identificación de poblaciones celulares hipoploides, sobre todo en muestras incluidas en parafina (Beerman, 1991) y que son muy importantes, ya que la pérdida de material genético se asocia a un incremento de la progresión tumoral (Harris, 1988). Cuando el material es fresco o congelado, el reconocimiento de las poblaciones hipoploides se realiza mediante el empleo de células diploides de referencia o estándar para establecer la posición de la población

diploide, sin embargo cuando las muestras están incluidas en parafina no se pueden añadir células de referencia (Beerman, 1991).

La calidad de las mediciones depende, además de los factores mencionados, de la calidad final de las células y así, por ejemplo, los detritos o agrupamientos celulares, o bien los factores mecánicos o bioquímicos que ocasionen cariólisis o cariorrexis, dan lugar a una absorción desigual del fluorocromo que interfiere en la resolución de los histogramas. Para valorar la precisión de los histogramas se utiliza el denominado coeficiente de variación (CV) de los picos del histograma (Vielh y col., 1991).

3.2. Estudio del ADN con citometría de flujo de tumores mamarios en la especie humana.

Uno de los objetivos del estudio del ADN ha sido su posible aplicación como factor pronóstico en tumores mamarios humanos, pero el análisis retrospectivo de muestras tumorales archivadas y conservadas en parafina no ha sido posible hasta que en 1983 Hedley y col. desarrollaron un método especial de digestión del material neoplásico. Ello ha originado la aparición de estudios enfocados a investigar el valor pronóstico de las alteraciones de la ploidía del ADN en pacientes que se encontraban bajo seguimiento clínico (Hedley y col., 1987). Sin embargo, aunque este análisis ofrece resultados interesantes, presenta problemas secundarios debidos a su menor capacidad de resolución, siendo los coeficientes de variación superiores a los obtenidos con material fresco (Kallioniemi y col., 1988). Además, en este tipo de análisis resulta muy difícil determinar la SPF, que es una fracción de importante valor pronóstico (Vindelov y col., 1990) y adecuada para evaluar la evolución clínica de los pacientes con tumores mamarios (Tubiana y col., 1984; Silvestrini y col., 1985; Meyer y col., 1986). Finalmente, no se ha llegado a una estandarización interna adecuada para esta técnica, por lo que los resultados de los estudios que la emplean son contradictorios (Vindelov y col., 1990).

Por ello, es más fiable el análisis de material fresco o congelado en el que el

procesado de la muestra se realiza mediante el método descrito por Vindelov y col. (1983) que consiste en la digestión enzimática con tripsina y posterior tratamiento con un detergente no iónico, aunque no permite un estudio retrospectivo de los casos sino prospectivo (Vindelov y col., 1990; Rutteman y Cornelisse, 1991).

La mayoría de la bibliografía consultada en este sentido corresponde a estudios prospectivos que demuestran que un 1% de los tumores mamarios benignos estudiados son aneuploides, mientras que los tumores malignos muestran porcentajes de aneuploidía del 70% (Christov y col., 1989; Cornelisse y col., 1983; Moran y col., 1984; Levack y col., 1987; Spyrtos y col., 1987). Según otros autores, son aneuploides de 57% a 89% de los tumores malignos analizados (Coulson y col., 1984; Baildam y col., 1987; Dowle y col., 1987; Hedley y col., 1987; Dressler y col., 1988; Kallioniemi y col., 1988; Lykkesfeldt y col., 1988; Clark y col., 1989). Finalmente, en un trabajo publicado en 1991 se revisan 56 estudios en este campo, comprobándose que la frecuencia de aneuploidía en carcinomas mamarios humanos es de un 63% (Frierson, 1991).

En dicho trabajo de revisión, la frecuencia de distribución de los IA es de tipo bimodal y no al azar observándose la presencia de dos zonas en el histograma en las que más frecuentemente se sitúan las poblaciones celulares tumorales: la zona situada en los límites de la diploidía (IA de 1.00, con un rango de 0.96 a 1.04) y la zona hipotetraploide. En base a esta frecuencia se han propuesto varias teorías sobre la evolución de la ploidía en los tumores y se ha descrito que sigue fundamentalmente dos directrices: por un lado, una segregación cromosómica o disyunción mitótica incorrecta sería el mecanismo que siguen los tumores con un bajo grado de aneuploidía (IA menor de 1.40), mientras que el fenómeno de tetraploidización seguido de pérdida o ganancia cromosómica sería el que siguen los tumores con un grado elevado de aneuploidía (hiperploides). Por otro lado, el fenómeno de endoreduplicación o fallo en la citoquinesis puede originar una duplicación del número cromosómico originando poblaciones tetraploides (Jacobsen y col., 1984;

Ewers y col., 1984; Cornelisse y col., 1984).

Shackney y col. (1989) emplearon un modelo computerizado para estudiar la evolución de la ploidía durante la progresión tumoral, basado en la capacidad de las células tumorales de doblar espontáneamente su dotación cromosómica y en la inestabilidad citogenética de las células con un excesivo número cromosómico, demostrando que los mecanismos mencionados ocasionan anomalías estructurales cromosómicas que afectan a genes implicados en el crecimiento celular. También se confirmó que la presencia de aneuploidía siempre se asociaba al desarrollo de anomalías en genes relacionados con el control del crecimiento celular.

La proporción de células en fase S observada en los estudios realizados en tumores mamarios con material fresco está comprendida entre 1% y 40% del total de la población celular, con un valor promedio entre el 5% y el 15% (Frierson, 1991). Los valores de SPF en los tumores aneuploides son significativamente superiores a los de tumores diploides. El valor promedio de SPF en tumores aneuploides oscila entre 10'3% y 12'0% y en diploides de 2'6% a 6% según los diversos autores consultados (Dressler y col., 1988; Eskelinen y col., 1989; Kallioniemi y col., 1988; Winchester y col., 1990).

3.2.1. Relación con las variables clínicas

Aunque la mayoría de los estudios muestran la existencia de una clara correlación entre la presencia de aneuploidía y el aumento de tamaño tumoral (Cornelisse y col., 1987; Dowle y col., 1987; Lewis y col., 1990) no todos han observado dicha relación (Hedley y col., 1987; Kallioniemi y col., 1988). Asimismo, algunos autores han encontrado una relación significativa entre valores elevados de SPF y de tamaño tumoral (Eskelinen y col., 1989; Visser y col., 1990), aunque no todos los estudios confirman la citada asociación (Kallioniemi y col., 1988; Hedley y col., 1987).

Con respecto a la relación existente con la afectación ganglionar los resultados también son diversos puesto que aunque la mayoría de los estudios no encuentran asociación entre la frecuencia de aparición de aneuploidía y la afectación ganglionar (Ewers y col., 1984; Cornelisse y col., 1987; Dowle y col., 1987; del Bino y col., 1989; McDivitt y col., 1986), otros autores han encontrado una discreta relación (Stal y col., 1989; Jacobsen y col., 1984; Feitcher y col., 1988; Dressler y col., 1988) e incluso una muy significativa relación (Hedley y col., 1987; Kallioniemi y col., 1988).

Asimismo, no se han encontrado diferencias significativas en los valores de SPF entre pacientes con afectación ganglionar y sin ella (McDivitt y col., 1986; Hedley y col., 1987; Feitcher y col., 1988; Kallioniemi y col., 1988; Visscher y col., 1990; O'reilly y col., 1990). Otros autores (Dressler y col., 1988) han indicado en tumores diploides valores de SPF mayores en pacientes con afectación ganglionar que en pacientes ganglio-negativos, aunque no señalan esta relación en los tumores aneuploides.

Aunque se ha observado una mayor frecuencia de aneuploidía (Hedley y col., 1987; Dressler y col., 1988; Visscher y col., 1990) y valores de SPF elevados (McDivitt y col., 1986; Dressler y col., 1988; Visscher y col., 1990) en los tumores con características indicativas de progresión tumoral como negatividad a receptores de estrógenos y progesterona, la mayoría de los autores no han encontrado correlaciones significativas (Frierson, 1991).

3.2.2. Relación con las variables histopatológicas

Diversos autores han encontrado una relación significativa entre la ploidía del ADN y el tipo histológico tumoral de los tumores mamarios humanos (Taylor y col., 1983; Kallioniemi y col., 1987; Feichter y col., 1988; Christov y col., 1989; del Bino y col., 1989; Lewis y col., 1990; Keyhani-Rofagha y col., 1990), siendo los carcinomas ductales y medulares los más frecuentemente aneuploides, mientras que los lobulares, tubulares y mucinosos son más frecuentemente diploides.

En muy pocos trabajos se ha estudiado la relación entre la proporción de células en fase S y el tipo histológico. Se ha descrito que los carcinomas tubulares y mucinosos presentan un 3'1% a 4'3% del total de células en fase S, mientras que en carcinomas ductales y lobulares este porcentaje es de 4'8% a 7'4%. Los carcinomas medulares presentan el mayor valor de SPF, siendo la media de 7'8 a 13% (Moran y col., 1984; Feichter y col., 1988; Hatcheck y col., 1989; McDivitt y col., 1986).

3.3. Estudio del ADN con citometría de flujo de tumores en la especie canina

Son escasas las investigaciones enfocadas al estudio del ADN celular en el perro. En el primer estudio encontrado en la literatura (Johnson y col., 1981) relativo al contenido de ADN en tumores sólidos caninos (melanomas, sarcomas de tejidos blandos, carcinomas mamarios, adenocarcinomas gastrointestinales, osteosarcomas y hemangiopericitomas, entre otros) un 80% de los tumores analizados fueron aneuploides con un IA promedio de 1.4. Los tumores se clasificaron en función del contenido de ADN en dos grupos: tumores diplo-hiperploides, fundamentalmente formado por melanomas y sarcomas de tejidos blandos y tumores con IA mucho mas divergentes como los carcinomas mamarios y los condro y osteosarcomas.

Posteriormente, Hellmén y col. (1988) y Rutteman y col. (1988) publicaron los resultados obtenidos en tumores mamarios caninos, que resumimos a continuación.

Hellmén y col. (1988) trataron de determinar el valor diagnóstico de la ploidía del ADN tumoral en relación al estudio histológico y citológico y la progresión

tumoral reflejada mediante la ploidía del ADN. Posteriormente, este grupo de trabajo ha publicado los resultados sobre el valor pronóstico de la ploidía en un estudio de seguimiento postquirúrgico en perras con tumores de mama (Hellmén y col., 1993). Se encontraron unos porcentajes de aneuploidía de 52% en los tumores malignos y de 27% en los benignos. Los Índices de ADN obtenidos se encontraron en un rango entre 0.72 y 2.35. No se apreciaron relaciones significativas entre la ploidía del ADN y otras variables clínicas e histopatológicas.

En el trabajo de Rutteman y col. (1988) se estudiaron tumores benignos y malignos (primarios y metastáticos), apareciendo aneuploidía en un 61'8% de los tumores malignos y en un 17'4% de los benignos. No existieron relaciones significativas entre la ploidía del ADN y ciertas variables clínicas e histopatológicas, ni con la presencia o ausencia de receptores de estrógeno y progesterona. Sí se demostró que los tumores con una mayor capacidad metastásica eran aneuploides con mayor frecuencia, aunque esta tendencia no fué significativa.

En los tumores mamarios caninos se ha observado un mayor número de tumores hipoploides (20'6%) superior a lo recogido en la literatura en el cáncer de mama en la mujer (0 a 8%) (Hellmén y col, 1988; Rutteman y col., 1988).

Otro estudio en TMC recientemente publicado por Scanzianni y col. (1991), muestra resultados diferentes a los anteriores pues la totalidad de los tumores benignos fueron diploides y se observó una relación significativa entre la ploidía tumoral y el estadiaje clínico. Probablemente estas diferencias se deben a que en este estudio el material empleado fue conservado en parafina, a diferencia de los anteriores en los que el material fue fresco o congelado.

4. Influencia de la nutrición en la carcinogénesis

Existen numerosos trabajos publicados sobre la influencia de la nutrición en la carcinogénesis de diversas neoplasias humanas tales como tumores mamarios, pulmonares, cutáneos e intestinales entre los más frecuentes, ya que este aspecto de la biología tumoral ha sido objeto de investigación desde hace más de cinco décadas. Por ello la bibliografía encontrada es abundante aunque no existen conclusiones definitivas respecto a la influencia de la nutrición en la carcinogénesis mamaria humana. Hemos de señalar, sin embargo, la ausencia de datos en la especie canina tanto en tumores mamarios como en el resto de las neoplasias. Este breve comentario justifica que la gran mayoría de las referencias citadas en este apartado de la revisión bibliográfica se refieren a la especie humana.

4.1. Métodos de estudio de las relaciones entre la nutrición y el cáncer

Las fuentes de datos que muestran la influencia de la dieta en la aparición de cáncer son los estudios epidemiológicos en el hombre y los experimentales en animales. A continuación vamos a mencionar la bibliografía más relevante en este sentido referente a los tumores mamarios.

4.1.1. Estudios epidemiológicos

Existen principalmente cuatro tipos de estudios epidemiológicos (Zaridje, 1985) que resumimos a continuación.

Estudios ecológicos. Son estudios de población que comparan la incidencia o los índices de mortalidad por cáncer de diversos países, o de diferentes poblaciones dentro de un mismo país, tratando de relacionar las posibles diferencias encontradas con los factores potenciales de riesgo a estudiar como, por ejemplo, la obesidad, el peso relativo en relación a la altura de los individuos, el consumo calórico, la ingesta de determinados alimentos o de macronutrientes (grasa, proteína e hidratos de carbono) y de micronutrientes.

Estudios caso-control. El grupo de individuos enfermos denominado "grupo de casos" se compara, con respecto a los factores potenciales de riesgo, con un grupo libre de cáncer denominado "grupo control".

Estudios cohorte. La condición que deben cumplir los individuos para participar en el estudio es la de no padecer cáncer, por lo que suele tratarse de una población relativamente joven; en este momento se toman los datos referentes a su alimentación, peso corporal, talla y demás factores a considerar. Posteriormente, y durante varios años, se lleva a cabo un estudio de seguimiento de los individuos, registrándose la incidencia de cáncer y/o la mortalidad por esta causa. Finalmente se valora la influencia de los factores considerados sobre la posible aparición de la enfermedad cancerosa.

Estudios de intervención. Si los anteriores estudios se encuadran dentro de los denominados de observación, en los que la dieta de los individuos no se modifica, los estudios de intervención utilizan dietas diseñadas de forma específica con el fin de comparar a medio o largo plazo sus efectos sobre la aparición del cáncer en personas sanas, o bien en individuos de alto riesgo (con antecedentes familiares o con patologías tumorales benignas). Actualmente, se están realizando varios estudios de este tipo, la mayoría enfocados a valorar el efecto que ejerce la disminución del consumo de grasa a un nivel del 15% del total de calorías de la dieta (Boyd y col.; 1992; White y col, 1992; Cohen y col, 1993).

Asimismo se encuadran como estudios de intervención aquellos en los que a partir de una población de individuos cancerosos se crean dos grupos: un grupo control y un grupo de intervención en el que se modifica el factor de riesgo a estudiar (Wynder y col., 1990).

En las investigaciones epidemiológicas en las que es necesario conocer el consumo de alimentos de los individuos (estudios caso-control y cohorte) se requiere una metodología determinada que permita conocer la exposición a una determinada dieta y a sus componentes concretos y que refleje la ingesta de los

individuos durante un largo tiempo, dado el prolongado periodo de latencia del cáncer (Alfin-Slater y Kritchevsky, 1991).

Entre otros, los métodos más frecuentemente empleados con este fin son:

Diario de comidas. Los individuos deben anotar la cantidad y el tipo de alimentos que consumen durante un período de tiempo que suele ser de una semana, incluyendo todas las comidas que realizan al día (Heady, 1961).

Entrevistas sobre las ingestas de épocas pasadas (desde 5 hasta 20 años anteriores) (Burke, 1947) o bien entrevistas sobre ingestas más recientes, es decir, a corto plazo (Beaton y col., 1979).

Cuestionarios de frecuencia. En ellos se registra la frecuencia con que los individuos consumen actualmente un determinado número de alimentos y permiten examinar la asociación entre la frecuencia de consumo de un determinado alimento o de nutrientes específicos y la aparición de cáncer. El efecto de los nutrientes específicos puede calcularse mediante una fórmula matemática en la que se multiplica la frecuencia de consumo de cada alimento por la cantidad de nutriente que contiene, sumándose al final las aportaciones para cada nutriente en los distintos alimentos (Stefanik y Troulson, 1962).

Aunque cada método tiene sus ventajas e inconvenientes, el cuestionario de frecuencia de consumo es el más adecuado para emplear en estudios a gran escala y según Byers y col. (1983) los hábitos alimenticios actuales son un buen indicador de la dieta ingerida en el pasado.

La validez de este método queda avalada al considerar que sus resultados se corresponden con los de otros métodos más precisos (Heady, 1961; Stefanik y Troulson, 1962; Willett y col., 1985) y con determinados indicadores del consumo nutricional tales como alfa tocoferol y carotenoides plasmáticos (Willett y col., 1983). Además, este tipo de cuestionarios ofrecen resultados más fiables cuando se trata de valorar el consumo en el pasado, ya que aunque los hábitos alimenticios hayan cambiado con el tiempo, estas modificaciones parece que afectan más a la hora de describir el consumo actual (Hislop y col., 1990).

4.1.2. Estudios experimentales

Existen gran número de estudios nutrición-cáncer realizados con animales de experimentación. Los más frecuentemente empleados son el ratón y la rata, aunque también se han empleado el conejo, el cobaya, el cerdo y ciertos primates. Estos modelos experimentales se han llevado a cabo con tumores espontáneos e inducidos químicamente, y en todo caso, sus resultados deben tomarse con mucha precaución si se extrapolan al ser humano, ya que existen diferencias metabólicas interespecies. Además, la extrapolación se hace prácticamente imposible si consideramos que en este tipo de experimentos se suelen utilizar dietas específicas modificadas de forma extrema, casi farmacológica (Alfin-Slater y Ktritchevsky, 1991).

4.2. Influencia de la nutrición en la carcinogénesis mamaria en la especie humana

4.2.1. Ingesta calórica, obesidad y conformación corporal en relación a la carcinogénesis mamaria

4.2.1.1. Ingesta calórica, obesidad, conformación corporal y carcinogénesis mamaria: estudios epidemiológicos

Las posibles relaciones causa-efecto entre los hábitos de vida y el cáncer comenzaron a estudiarse tras descubrirse que las áreas con mayor incidencia de **cáncer de mama** son Estados Unidos y Europa Occidental, mientras que la mayoría de los países del continente asiático tienen una menor frecuencia de presentación (Armstrong y Doll, 1975). Casi todos los estudios ecológicos internacionales en los que se compara la ingesta de *grasa per capita* con la incidencia e índice de mortalidad por cáncer de mama, han demostrado que existe una relación muy importante entre el consumo calórico y los índices de mortalidad por este tipo de cáncer (Armstrong y Doll, 1975; Hems, 1978; Gray y col., 1979).

En un estudio reciente de este tipo, en el que la mortalidad por cáncer de mama en China fué comparada con la correspondiente en los Estados Unidos, donde es 3

veces superior a la registrada en China, se ha observado que son factores de riesgo el consumo total de lípidos, el de calorías, así como la altura de los individuos, niveles elevados de colesterolemia, de lipoproteínas de baja densidad y de apoproteína A₁ (Marshall y col., 1992).

Por otro lado, se ha observado que la incidencia del cáncer de mama no es uniforme en la población de un mismo país (Rose, 1986). Las diferencias encontradas podrían ser debidas a diversidades étnicas, económicas o religiosas que implicaran un particular hábito de vida; así por ejemplo, la incidencia de cáncer de mama comienza a aumentar a partir de la segunda generación en los emigrantes japoneses de Estados Unidos, lo que indica que se debe al estilo de vida de los Estados Unidos, diferente sin duda al japonés, más que a un factor racial. Una de las características más destacadas del estilo de vida americano es el elevado contenido graso de la dieta (Rose, 1986).

También se ha observado en Finlandia, que las poblaciones rural y urbana tienen distinta frecuencia de aparición de cáncer de mama, debido probablemente a los diferentes hábitos alimenticios existentes entre ambas poblaciones (Teppo y col., 1975).

Algunos autores opinan que la mayor incidencia de cáncer puede ser atribuida a otros factores secundarios y no exclusivamente a los hábitos alimenticios, ya que en los países más industrializados no sólo la dieta es más rica en grasa sino que además la población es más sedentaria y con una menor necesidad energética que en los países agrícolas menos industrializados (Howe, 1992).

Varios de los estudios epidemiológicos caso-control han investigado si el consumo calórico constituye un factor de riesgo, encontrándose asociaciones positivas entre dietas hipercalóricas y elevadas incidencias de cáncer (Nomura y col., 1978; Shun-Zhang y col., 1990). Sin embargo, otros autores (Rohan y col., 1990) en un estudio con mujeres australianas que presentaban lesiones mamarias proliferativas benignas no encontraron dicha asociación de forma clara.

Debido a que el consumo calórico individual depende de muchas variables (tamaño corporal, actividad física y eficiencia metabólica, entre otros), si este se asocia a la incidencia neoplásica mamaria también debería encontrarse una cierta asociación con dichas variables; así, Willett y Stampfer (1986) observaron que la actividad física y la eficiencia metabólica influían en el riesgo de cáncer, mientras que el tamaño corporal, una vez realizados los ajustes sobre el consumo calórico, no influía de forma determinante.

La relación entre la incidencia del cáncer de mama y la obesidad como factor asociado a los hábitos nutricionales está siendo también objeto de estudio. Los resultados obtenidos hasta el momento son contradictorios debido, probablemente, a que dependen de la selección de controles, de la definición de sobrepeso y del ajuste del peso corporal con respecto a la altura (de Waard, 1982). Sirva como ejemplo para ilustrar esta controversia lo que a continuación se señala:

Este mismo autor en un primer estudio observó en 1964 una mayor incidencia en individuos obesos; en 1974, señaló una mayor incidencia en relación a la obesidad y a la elevada altura de los individuos y tres años después, comparando la población holandesa y la japonesa (de Waard y col., 1977) también encontraron incidencias superiores en individuos altos y obesos. No obstante, al aplicar el índice de Quetelet, definido como la relación entre el peso corporal y la raíz cuadrada de la altura, no pudieron confirmar sus resultados (de Waard y col., 1977).

Otros autores señalan que en individuos mayores de 50 años, la incidencia es superior en los individuos obesos que en los delgados y, sin embargo, no parecen existir diferencias con respecto a la altura (Lin y col., 1971). En este último aspecto no existen resultados unánimes pues en otras investigaciones más recientes (Hirayama y col., 1978; Kelsey y col., 1981; Vatten y Kvinnsland 1990) sí se ha encontrado una relación positiva entre los pesos corporales y alturas elevadas y la incidencia tumoral mamaria. Asimismo, la relación es aún mas evidente al aplicar el índice de Quetelet en pacientes postmenopáusicas (Paffenbarger y col., 1980; Helmrich y col., 1983; Lubin y col., 1985).

Posteriores estudios epidemiológicos han confirmado que la obesidad es un factor de riesgo de cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas (Ingram y col., 1991; Rose y col., 1986; Kato y col., 1992), señalándose incluso que el riesgo está también relacionado con la conformación corporal de la grasa de manera que la distribución de la grasa a nivel central, abdominal principalmente, se asocia a un aumento del riesgo de cáncer, incluso independientemente del grado de obesidad (Ballard-Barbash, 1990).

Es sabido que la conformación del depósito adiposo en la mujer está influenciada por factores hormonales por lo que, el incremento de riesgo según la distribución grasa probablemente sea debido al aumento de los niveles de estrógeno metabólicamente activo asociado al acumulo de grasa en estas zonas (Bruning, 1987).

Como hemos indicado, aunque la mayoría de las investigaciones relacionan claramente la obesidad con la incidencia de tumores mamarios, no podemos olvidar que algunos autores no han encontrado esta correlación (Stavraky y Emmonds, 1974; Wynder y col., 1978; Soini, 1977). Otros, casi de manera accidental, observaron incluso un mayor riesgo en mujeres premenopáusicas con un peso corporal bajo (Kelsey y col., 1981). Willett y col. (1985) en un estudio cohorte en el que participaron 120.000 enfermeras encontraron una relación inversa entre el peso corporal relativo determinado mediante el Índice de Quetelet y el riesgo en mujeres premenopáusicas; también desecharon la hipótesis de otros autores (de Waard, 1975; Sherman y col., 1981) de que una hipernutrición durante la adolescencia aumenta el riesgo de cáncer premenopáusico.

Los mecanismos por los que la obesidad, es decir el exceso de tejido adiposo, influye en la carcinogénesis mamaria han sido objeto de diversas investigaciones, la mayoría enfocadas a comprender su relación con los factores hormonales (de Waard, 1991).

Así, se ha demostrado que el tejido adiposo influye sobre los niveles y sobre la disponibilidad de los estrógenos (Siiteri, 1987). Expondremos, a modo de síntesis,

estos mecanismos que son:

1) El tejido adiposo permite la síntesis de estrona, un estrógeno a partir de androstenediona al aumentar la actividad aromatasa en este tejido. (Vermuelen y Verdonck, 1978)

2) El metabolismo de los estrógenos en individuos obesos se desvía hacia la reacción de la 16 α hidroxilación, que activa la hormona, en lugar de producirse la reacción de la 2 α hidroxilación que la inactiva (Siiteri, 1987).

3) En los individuos obesos, la biodisponibilidad de los estrógenos es mayor que en los delgados, al estar disminuidos en los primeros los niveles de la globulina transportadora de hormonas sexuales (DeMoor y Joosens, 1970). Por otro lado, se ha observado que en individuos con cáncer de mama los niveles de estradiol no ligado globulina eran superiores que los de personas controles; mientras que no se encontraron diferencias en los niveles hormonales cuando los individuos se clasificaron con respecto a su peso (Moore y col., 1982; Reed y col., 1983).

4.2.1.2. Ingesta calórica, obesidad, conformación corporal y carcinogénesis mamaria: estudios experimentales

Los primeros trabajos experimentales dirigidos hacia el estudio de la relación entre la dieta y el desarrollo de tumores mamarios fueron los de Rous (1914), que **observó** una menor incidencia de tumores espontáneos en ratonas mantenidas con una **restricción calórica** en comparación con las mantenidas en un régimen de **alimentación *ad libitum***. Posteriormente, Tannenbaum (1940) con tumores mamarios inducidos, estudió los efectos de la alimentación, comparando la incidencia de tumores entre ratonas alimentados ***ad libitum*** con aquellas sometidas a restricciones calóricas y observó una incidencia de tumores de 30% y 7% respectivamente en ambos grupos.

Estudios posteriores confirmaron estos resultados, destacando que la incidencia y el período de latencia de los tumores depende del grado de restricción calórica y de la composición de la dieta, ya que las dietas ricas en grasa aumentan la incidencia

tumoral mamaria independientemente del contenido calórico total (Visscher y col., 1942; Tannenbaum, 1942, 1944 y 1945).

Durante los 20 años siguientes, se realizaron numerosas investigaciones utilizando diferentes tipos de tumores experimentales en roedores (White y col., 1944; Ross y Bras, 1971 y 1973). White publicó una amplia revisión de la literatura hasta el momento (1961).

Más recientemente, otros autores han indicado los efectos de la restricción calórica en la iniciación y promoción de numerosas neoplasias mamarias y no mamarias en roedores (Pariza, 1986 y 1987; Albanes, 1987). Actualmente se acepta, tras las investigaciones de Thompson y col. (1985) y Kritchevsky y col. (1986) que los efectos de la grasa sobre la promoción en la carcinogénesis mamaria experimental en roedores dependen del consumo calórico, ya que para que tenga lugar el efecto promotor es necesario que los animales se mantengan en un sistema de alimentación *ad libitum* que asegure un determinado nivel de consumo calórico. Trabajos posteriores con tumores mamarios inducidos con 7,12 dimetilbenzantraceno (DMBA) (Beth y col., 1987) y con 3-metilnitrosourea (MNU) (Cohen y col., 1988) en la rata confirman este punto.

4.2.2. Nutrientes específicos en relación a la carcinogénesis mamaria

4.2.2.1. Contenido lipídico en relación a la carcinogénesis mamaria

Dada la importancia de la dieta como factor de riesgo de los tumores mamarios y de otras neoplasias, la Academia Nacional de las Ciencias de Estados Unidos (NAS) hizo público en 1980 un documento en el que se recopilaba la literatura más importante sobre el tema concluyéndose que los datos obtenidos hasta la fecha no eran suficientes para establecer ciertas recomendaciones dietéticas (NAS, 1980).

Dos años más tarde, la citada Academia publicó otro informe en el que junto con una extensa revisión de la literatura, una descripción de los mecanismos conocidos de carcinogénesis y las implicaciones de la dieta en los mismos, se establecían unas recomendaciones dietéticas, fundamentalmente referentes al contenido en grasa y

fibra de la dieta para la prevención del cáncer (NAS, 1982).

Las diferencias entre ambos documentos generaron cierta confusión en la opinión pública americana y controversia en la comunidad científica por lo que se publicaron posteriormente otras recomendaciones, entre ellas, la recientemente establecida por el Comité de Salud y Dieta del National Research Council de Estados Unidos de reducir el consumo de grasa saturada a un 10% o menos de las calorías totales de la dieta si se quieren prevenir las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (National Research Council, 1989).

Según Carroll (1992) la mayoría de los estudios epidemiológicos, que suelen ser internacionales al comparar poblaciones de diversos países, y casi todos los estudios experimentales, afirman la existencia de una correlación positiva entre el consumo de grasa y el riesgo de cáncer de mama. Por el contrario, los estudios epidemiológicos caso-control y cohorte, que se basan en grupos de poblaciones menores y homogéneas, muestran resultados contradictorios. Además, en ellos resulta difícil la valoración del consumo de grasa de los individuos.

El estudio del contenido lipídico de la dieta en relación a la carcinogénesis mamaria se ha enfocado en dos vertientes, por un lado se ha estudiado el contenido graso total y por otro el tipo de grasa. Por ello, señalamos la bibliografía encontrada referente al contenido y al tipo de grasa de la dieta de forma separada.

4.2.2.1.1. Lípidos y carcinogénesis mamaria: estudios epidemiológicos

4.2.2.1.1.1. Estudios epidemiológicos sobre el contenido graso de la dieta

Tras una minuciosa revisión, hemos podido constatar que de todos los estudios epidemiológicos realizados, los más numerosos son aquellos que determinan la influencia de la grasa en la incidencia del cáncer de mama.

Entre los primeros trabajos se encuentra el llevado a cabo por Phillips y col. (1975) en el que se estudiaron dietas pertenecientes a una población de vegetarianos en California. Los factores de riesgo encontrados fueron el consumo de alimentos fritos, de productos lácteos excepto la leche y el de pan blanco. Posteriormente, en

un estudio epidemiológico caso-control realizado en Canadá, Miller y col. (1978) observaron un mayor riesgo asociado a ingestas elevadas de grasa.

Por otra parte, se ha tratado de relacionar la incidencia del cáncer de mama en diferentes países y el consumo de determinados alimentos. En esta línea, Hems (1978) encontró relaciones significativas entre el consumo total de grasa y de proteína y la incidencia en 41 países estudiados. En un estudio realizado en Hawaii (Kolonel y col., 1981) se apreciaron relaciones positivas entre el consumo de grasa y la incidencia de tumores malignos de mama y de útero. Otro equipo investigador (Lubin y col., 1981) observó, tras un estudio caso-control en Canadá, que el riesgo relativo de cáncer mamario aumentaba con el consumo de grasa.

Por el contrario, posteriormente en varios estudios caso-control realizados en el área de Nueva York (Graham y col., 1982), Japón (Hirohata y col., 1985) y Hawaii (Hirohata y col., 1987), no encontraron una mayor incidencia asociada al consumo de grasa.

Como queda reflejado en los párrafos anteriores, los resultados de los estudios epidemiológicos llevados a cabo durante estos años (1975 - 1987) no eran coincidentes y justificaron la aparición de un trabajo de recopilación de los estudios internacionales, nacionales y regionales más importantes hasta la fecha (Goodwin y Boyd, 1987). En dicha revisión se pone de manifiesto que siete de los trece estudios internacionales evaluados en los que se investigaba el consumo total de grasa, la **relación** con la incidencia de aparición de cáncer mamario fue positiva, mientras que en el resto no se encontró dicha asociación. En cinco de los siete estudios regionales revisados sí se encontraron relaciones positivas, aunque de 14 estudios caso-control, solamente uno de ellos mostró una relación positiva. Tras este estudio de recopilación, la disparidad en los resultados ha continuado; sirvan como ejemplo los trabajos que a continuación se citan.

Así, diversos autores no han señalado una asociación significativa entre el consumo de grasa y la incidencia de cáncer de mama (Rohan y col., 1988; Mills y col., 1989; Knekt y col., 1990; Graham y col., 1992).

Por el contrario, en otros estudios sí se ha encontrado una clara asociación y así se ha observado un menor riesgo en mujeres cuya ingesta grasa suponía un 28% del total de calorías que en aquellas con ingesta del 36% (Toniolo y col., 1989). Howe y col. (1990) en un estudio cohorte, estudiaron el efecto de la grasa ingerida en mujeres pre y postmenopáusicas, llegando a la conclusión de que la posible asociación entre el consumo de grasa y el riesgo de cáncer de mama es débil. Pero al realizar estos mismos autores un análisis combinado de los datos originales de doce estudios caso-control, separando las mujeres pre y postmenopáusicas, encontraron que el riesgo de cáncer mamario se relaciona de forma directa y estadísticamente significativa con la altura de los individuos en el grupo de premenopáusicas y en el grupo de postmenopáusicas con el peso, la ingesta total de calorías y el consumo total de grasas. Esta última relación no se modificó después del ajuste del análisis con respecto a otras fuentes energéticas como las proteínas y los hidratos de carbono de la dieta, concluyéndose que si se llevara a cabo una reducción en el consumo de grasa, la proporción de tumores malignos mamaros que podrían evitarse sería aproximadamente del 24% en mujeres postmenopáusicas y del 16% en premenopáusicas.

Destacamos los estudios de Willett y col. (1992) y de Van den Brandt y col. (1993), en los que dichos autores, aunque no establecen una asociación significativa entre el consumo total de grasa y un aumento en la incidencia debido a la metodología empleada, incluyen la posibilidad de que exista cierta relación muy débil con la ingesta grasa. También consideran importante el estudio del consumo durante la adolescencia, aunque no establecen resultados concretos a este respecto.

Asimismo, Kushi y col. (1992) coinciden con los anteriores autores al encontrar una relación muy ligera entre el consumo total de grasa y además justifican la disparidad en los resultados de los estudios epidemiológicos al señalar que dependen en gran medida del método empleado para el ajuste del consumo calórico. Para demostrarlo, sometieron los datos obtenidos al análisis de 4 métodos diferentes que son los utilizados por los diversos autores. Dada la importancia que la selección del

método de análisis confiere a la interpretación de los datos, exponemos a continuación los 4 sistemas mencionados anteriormente:

A) Método estandar multivariado, en el que el nutriente a estudiar, en este caso la grasa, se valora según la *cantidad consumida/día* y el consumo energético total se incluye en el análisis de regresión como otro factor covariable más.

B) Método residual, descrito por Willett y Stampfer (1986), en el que el valor del nutriente en estudio se obtiene mediante regresión a partir de la proporción de dicho nutriente en el total del consumo energético.

C) Método de partición de la energía, donde la energía total se divide según su procedencia, es decir de la grasa y de otras fuentes energéticas (Howe y col., 1986).

D) Método de la densidad de los nutrientes en el que los datos para cada nutriente se obtienen dividiendo el consumo de cada nutriente entre el consumo total energético (Willett, 1990).

Kushi y col. (1992) confirmaron sus sospechas de que el método empleado es decisivo. Al emplear el método A, el consumo energético total no influía en el riesgo de cáncer mamario, mientras que sí lo hacían el consumo de grasa total y el de grasa poliinsaturada. Al emplear el método C el único factor que se asociaba al riesgo era el consumo total de grasa y al aplicar los métodos B y D el consumo total de grasa presentaba una asociación con el riesgo muy débil o nula, respectivamente. Además, resulta curioso que en las investigaciones en las que no se han encontrado asociaciones entre el riesgo y determinados nutrientes, principalmente la grasa, se emplearon los métodos B y D (Willett y col., 1987; Jones y col., 1987), mientras que aquellas realizadas con el A o el C (Howe y col., 1991) si encontraron asociaciones.

A modo de síntesis destacamos un estudio ecológico que recoge datos de 30 países y que demuestra que el consumo de grasa animal saturada se asocia de manera estadísticamente significativa a la mortalidad por cáncer de mama en mujeres mayores de 50 años (Sasaki y col., 1993).

Si analizamos con minuciosidad todo lo expuesto anteriormente es evidente que

la mayoría de los estudios ecológicos referidos afirman que el consumo de grasa es factor de riesgo, mientras que un gran número de estudios cohortes y caso-control no llegan a la misma conclusión. Hay que tener en cuenta que los estudios ecológicos deben ser considerados menos fiables que los cohortes y caso-control (Schatzkin y col., 1989; Stephan y Wald, 1990; Willett y col., 1992) ya que en los primeros, el consumo de grasa se obtiene de los datos nacionales referentes a la producción e importación de alimentos, lo que se conoce como "desaparición" de alimentos, y no es probable que coincida exactamente con el consumo real.

Otros autores (Goodwin y Boyd, 1987), han señalado que en los estudios epidemiológicos cuyo rango de consumo de grasa es pequeño, existe una débil relación con el riesgo de cáncer (Willett y col., 1987; Jones y col., 1987; Rohan y col., 1988; Knekt y col., 1990; Howe y col., 1990; Graham y col., 1991; Howe y col., 1991), mientras que en los estudios de población internacionales, con una mayor variabilidad en el contenido graso, se ha observado una clara relación entre el consumo de grasa y el cáncer (Carroll, 1986; Goodwin y Boyd., 1987; Prentice y col., 1988; Schatzkin y col., 1989; Prentice y col., 1990; Sasaki y col., 1993). Además, esta hipótesis explica, en parte, el hecho de que la gran mayoría de los estudios cohorte (prospectivos) no encuentren una asociación significativa entre la grasa de la dieta y el cáncer de mama (Hunter and Willett, 1993; Boyd et al., 1993).

Por último, cabe señalar que si la relación entre la grasa de la dieta y el cáncer fuera real, ésta es muy pequeña, siendo necesario llevar a cabo más estudios en diversas áreas geográficas, así como agrupar y sintetizar los resultados de diferentes estudios prospectivos para valorar la citada relación de una forma cuantitativa (Kushi y col., 1992).

4.2.2.1.1.2. Estudios epidemiológicos sobre diferentes tipos de grasa

Los estudios epidemiológicos que investigan el efecto de los diferentes tipos de grasa sobre la incidencia de cáncer mamario también ofrecen resultados contradictorios como mencionamos a continuación.

En algunas investigaciones caso-control llevadas a cabo en mujeres premenopáusicas (Miller y col., 1978; Nomura y col., 1978) y postmenopáusicas (Howe y col., 1990) se ha establecido una clara relación entre el elevado consumo de grasa saturada y una mayor incidencia de cáncer mamario.

En esta misma línea se encuentra el trabajo de Brisson y col. (1989) que determinaron que la ingesta elevada de grasa saturada se asocia a un incremento de las típicas características morfológicas mamográficas de alto riesgo, con posibilidad de convertirse en neoplasias, mientras que el consumo de grasa poliinsaturada o de colesterol no modifica la morfología mamaria.

Pero en un estudio caso-control realizado recientemente por el National Health and Nutrition Survey Epidemiologic Follow-up Study (NHEFS) (Kritchevsky, 1992) se ha encontrado una relación inversa entre la grasa saturada, concretamente ácido oleico, y la incidencia de cáncer mamario e intestinal, lo que coincide con otros estudios similares (Jones y col., 1987; Willett y col., 1987).

También en el estudio del tipo de grasa, la metodología empleada parece jugar un papel crucial como lo demuestra el trabajo de Willett y Stampfer (1986). Estos autores sometieron los datos del estudio previo de Howe y col. (1990), en el que en 12 estudios caso-control se relacionaba la ingestión de grasa saturada en mujeres postmenopáusicas con la aparición de cáncer mamario, a otro tipo de análisis estadístico no encontrando la mencionada relación.

Coincidiendo con dichos resultados, en otros estudios no han encontrado relaciones significativas entre consumos elevados de grasa monosaturada, saturada, ácidos grasos poliinsaturados ni colesterol y la incidencia de cáncer de mama (Graham y col., 1982; Hirohata y col., 1987; Jones y col., 1987, Willett y col., 1987). Asimismo tampoco se han encontrado diferencias en la composición de los ácidos grasos (incluyendo PUFA) de la grasa corporal de mujeres con cáncer de mama, con lesiones proliferativas benignas y sin ningún tipo de patología mamaria (London y col., 1993).

El hecho de que no se haya señalado una relación significativa entre el consumo

de grasas ricas en ácidos grasos poliinsaturados y el riesgo de cáncer de mama, se contradicen con lo obtenido en la mayoría de los estudios experimentales (Carroll, 1992). Según este autor, dicha contradicción puede deberse a que el contenido de grasa poliinsaturada en la dieta del hombre no supera el límite necesario para la carcinogénesis, establecido en un 4- 5% en los estudios experimentales. Además, se ha de tener en cuenta que en las dietas hiperlipídicas de los países occidentales predominan los ácidos grasos saturados y monoinsaturados, aumentando su contenido a medida que aumenta el contenido graso de la dieta, a diferencia de los ácidos grasos poliinsaturados, cuyas proporciones varían muy poco de unas dietas a otras, y no se relacionan tan estrechamente con el contenido lipídico total de la dieta, hecho que puede influir en la ausencia de la relación mencionada entre la grasa poliinsaturada de la dieta y los índices de mortalidad por cáncer (Carroll, 1992).

Con respecto a la influencia de la **colesterolemia** en la carcinogénesis mamaria, tampoco las investigaciones son coincidentes. Algunos estudios han observado que los individuos con cáncer de mama llevaban una alimentación tendente a no producir hipercolesterolemia ya que o bien consumían bajas cantidades de grasa saturada y colesterol, o bien era mayor la proporción ingerida de grasa poliinsaturada (Willett, 1989; Hursting y col., 1990; Vatten y Foss, 1990).

Otros autores tampoco han encontrado una asociación significativa entre los niveles de colesterolemia y el riesgo de neoplasias mamarias (Malarkey y col., 1977; Hiatt y col., 1982).

Sin embargo, Taioli y col. (1991) comparando la alimentación del Sur de Italia, un área donde se registran índices de mortalidad por cáncer de mama bajos, con la típica dieta de Estados Unidos, un país con un alto riesgo de mortalidad por esta causa, han señalado que la dieta italiana, es decir, el consumo de grasa saturada y de ácido linoleico en escasa cantidad y un mayor consumo de grasa monoinsaturada, evita en cierta medida la aparición de cáncer mamario.

Resultados semejantes se indican en otros estudios (Bani y col., 1986; Dyer y col., 1981; Wallace y col., 1982; Cowan y col., 1990) y coincidiendo con ello, se

han detectado incrementos en los niveles de colesterol total, de colesterol unido a HDL (que contiene menos de un 25 % de colesterol), de colesterol unido a LDL (que contiene un 70% de colesterol) y HDL total en las pacientes con cáncer con respecto a los controles (Alexopoulos y col., 1987). Además Schatzkin y col. (1988) han indicado que los niveles de colesterol unido a VLDL (que en su mayoría deriva de triglicéridos endógenos) son menores en los casos que en los controles.

Por otro lado, se ha observado que los niveles de colesterol son bajos durante los cinco años anteriores al diagnóstico del cáncer, lo cual podría indicar según Cowan y col. (1990) que el proceso de carcinogénesis disminuye los niveles de colesterol. Potischman y col. (1991) también detectaron menores niveles de colesterol en los casos de enfermedad muy avanzada a pesar de que la dieta de los enfermos contenía más ácidos grasos saturados y menos ácidos grasos poliinsaturados que la de los individuos controles.

Puesto que la vitamina E y otros carotenoides se transportan mediante la LDL y sus niveles circulantes se relacionan con los del colesterol (Thurnham, 1989), es posible que la relación observada entre los niveles bajos de colesterolemia y elevadas incidencias de cáncer mamario se deba al descenso de los niveles de vitamina E o de otros carotenoides (Kritchevsky, 1992).

Actualmente se cree que ciertos productos del metabolismo del colesterol afectan a la replicación del ADN y a la proliferación celular, lo que sugiere que la disminución del colesterol puede acelerar el crecimiento de tumores ya existentes (Kritchevsky, 1992).

Según Kritchevsky (1992), la literatura referente a la relación entre el riesgo de cáncer y los niveles de colesterolemia, aunque es contradictoria en ocasiones, permite concluir que existe una asociación muy ligera entre niveles bajos de colesterolemia y elevadas incidencias de cáncer de mama y útero (Schatzkin y col., 1987; Sherwin y col., 1987; Cowan y col., 1990; Stemmerman y col., 1991), aunque en la mujer esta relación es menor que la observada en el hombre con respecto al riesgo de tumores de próstata, pulmón y piel.

Por último, cabe destacar el posible efecto protector de determinados ácidos grasos procedentes del pescado frente a la carcinogénesis mamaria, y así, aunque los índices de mortalidad e incidencia de cáncer más elevados se registran en países con grandes consumos de grasa, existen excepciones como la de la población de esquimales nativos de Finlandia, cuya dieta es rica en grasa y sin embargo la incidencia tumoral es baja (Kromman y Green, 1980). Hay que señalar que dicha alimentación está constituida principalmente por pescados y mamíferos acuáticos y, por tanto, con un elevado contenido en ácidos grasos poliinsaturados de la clase omega-3 (Bang y Dyerberg, 1980). Igualmente, Kaizer y col. (1989) han observado que en Japón, donde el consumo de pescado y de grasa de pescado es elevado, la incidencia de tumores mamarios es baja (1989). Recientemente se ha señalado que una dieta que contenga aceites de pescado ricos en ácidos grasos de la clase omega-3 o en sus precursores, junto con un buen equilibrio de PUFA de la clase omega-6, pueden originar una mayor producción de mediadores antiinflamatorios y ser así beneficiosos en enfermedades autoinmunes y en el cáncer (Fernandes y Venkatraman, 1993).

4.2.2.1.2. Lípidos y carcinogénesis mamaria: estudios experimentales

4.2.2.1.2.1 Estudios experimentales sobre el contenido graso de la dieta

Los trabajos pioneros a nivel experimental fueron los de Tannenbaum (1942), demostrando que los tumores mamarios espontáneos se desarrollaban más rápidamente en ratonas alimentadas con dietas ricas en grasa que en las mantenidas con dietas pobres en grasa.

A partir de entonces, son numerosos los trabajos que han demostrado la relación existente entre el consumo de grasa y el desarrollo de tumores en roedores, principalmente en la rata y la ratona, comprobándose tanto en neoplasias mamarias espontáneas como en las inducidas químicamente con DMBA y MNU entre otros carcinógenos químicos.

En la mayoría de los estudios se han observado los efectos potenciadores de la grasa cuando esta se administraba después de la iniciación tumoral, es decir, en la promoción de la carcinogénesis; se han obtenido efectos similares en todos los modelos tumorales empleados, por lo que se ha establecido que el efecto carcinogénico de la grasa se produce en la fase de promoción tumoral (Cohen y col., 1981; Davidson y Carroll, 1982; Ip e Ip, 1980; Thompson y col., 1985). Algunos autores han encontrado también efectos en la fase de iniciación (Kritchevsky y col., 1984).

Se ha demostrado que las dietas con un contenido graso elevado aumentan la incidencia y el número de tumores espontáneos en la ratona (Gridley y col., 1983; Boeryd y Hallgren, 1986; Olson y col., 1987; Silverman y col., 1989) y en la rata (Brown, 1981), así como de tumores inducidos en la ratón (Cameron y col., 1989), en la rata (Carroll y Khor, 1970 y 1971, Carroll 1985; Davidson y Carroll, 1982; Cohen y col., 1982 y 1988; Alyswoth y col., 1984 y 1986; Aksoy y col., 1987; Beth y col., 1987; Klurfeld y col., 1989) y de tumores transplantables en la ratona (Hopkins y West, 1977; Giovarelli y col., 1980; Hubbard y col., 1988).

Paralelamente, en numerosos estudios se ha comprobado que las dietas hipocalóricas inhiben o retrasan el desarrollo de tumores mamarios en roedores (Ip e Ip, 1980 y 1990; Davidson y Carroll, 1982; Boissonneault y col., 1986; Klurfeld y col., 1987 y 1989; Cohen y col., 1988; Kritchevsky y col., 1984; 1989). En el último trabajo citado se ha observado además que la restricción calórica disminuye el crecimiento tumoral en todas las etapas de la carcinogénesis independientemente del contenido graso de la dieta.

La obtención de estos resultados experimentales hizo que se avivara la polémica sobre si el efecto promotor de la carcinogénesis era debido al contenido graso o calórico de la dieta. Klurfeld y col. (1989) demostraron con tumores inducidos con DMBA en la rata, que una dieta con bajo contenido graso pero hipercalórica inducía la carcinogénesis en mayor grado que una dieta rica en grasa pero hipocalórica y coincidiendo con los resultados previos de Kritchevsky y col. (1984) y Thompson

y col., (1985) en tumores mamarios inducidos en ratas con MNU, no registraron durante el período de restricción del alimento diferencias significativas en la incidencia tumoral ni el número de tumores aparecidos en los animales alimentados con distintos contenidos en grasa; sin embargo, durante la alimentación *ad libitum*, se registraron más tumores en los animales alimentados con elevados contenidos de grasa.

Sin embargo, otros autores (Chan y col., 1977; Cohen y col., 1984; Gammal y col., 1967; Silverman y col., 1980; Welsch y DeHoog, 1988), empleando dietas isocalóricas con diferentes proporciones de grasa, señalan que la incidencia y número de tumores es superior en los animales alimentados con dietas ricas en grasa.

En los últimos años se le ha conferido mayor importancia al contenido calórico que a la grasa en sí, ya que el incremento calórico que supone un aumento de la grasa en la dieta, parece ser el responsable en la promoción tumoral, aunque también influye el tipo de grasa (Welsch, 1992). Así, aunque los niveles de grasa elevados incrementan considerablemente la carcinogénesis en la rata, solamente se produce este efecto en alimentación *ad libitum*, y no cuando se reduce el consumo calórico (Welsch y col., 1990). Además, el contenido graso de la dieta no sólo influye de forma cualitativa, sino también cuantitativamente como demostraron Carroll y Khor (1971) en tumores inducidos con DMBA en ratas, en los que un aumento de la grasa ingerida de 10 veces la cantidad habitual (de 0'5% a 5%) no afectaba a la incidencia, multiplicidad o latencia tumorales; un incremento de un 5% a un 10% de grasa aumentaba la incidencia a un 22%, la multiplicidad a un 74% y reducía el período de latencia en un 22%. Finalmente, un incremento de los niveles de 10 a 205 veces no ejercían mayores efectos que los anteriores.

Por último, comentamos el estudio de revisión de Freedman y col. (1990) en el que analizan un gran número de experimentos publicados, afirmando que consumos elevados de grasa y de calorías incrementan de manera independiente la incidencia de tumores de mama en la rata y la ratona.

4.2.2.1.2.2. Estudios experimentales sobre diferentes tipos de grasa

Existen numerosos estudios experimentales referentes al tipo de grasa en relación a la carcinogénesis mamaria. Ciertos ácidos grasos insaturados derivados de aceites vegetales como maíz y girasol, producen un aumento de la carcinogénesis mamaria en la ratona y en la rata (Alysworth y col., 1984 y 1986; Boisseneault y col., 1986; Carroll y Khor, 1970; Carroll, 1985; Carter y col., 1983; Cohen y col., 1984, 1986, 1987 y 1988; Davidson y Carroll, 1982; Hill y col., 1977; Hopkins y West, 1979). Especialmente, el contenido de ácidos grasos poliinsaturados ("polyunsaturated fatty acids", PUFA) es fundamental para que tenga lugar el efecto carcinógeno (promotor) de la grasa y, por ello, los aceites con un elevado contenido en PUFA aumentan la carcinogénesis en mayor grado que los aceites ricos en ácidos grasos saturados (Carroll y col., 1971 y 1979; Tinsley y col., 1981). De hecho, se ha comprobado que para que tenga lugar el efecto promotor tumoral de la grasa, es necesario que ésta proporcione un nivel mínimo de PUFA, del 4-5% del total de calorías que proporciona la dieta debe provenir de ácidos grasos poliinsaturados esenciales, concretamente de ácido linoleico (Hopkins y col., 1981; Ip y col., 1985; Carroll y Noble, 1987; Thompson y col., 1985; Lasekan y col., 1990). Cuando este requerimiento se cumple, el efecto promotor de la carcinogénesis depende más del contenido de grasa que del tipo, saturada o insaturada (Ip y col., 1985; Carroll y Noble, 1987; Jacobson y col., 1988). El mecanismo de acción del ácido linoleico en la carcinogénesis parece ser que radica en la alteración de la funcionalidad de la membrana celular, en la modificación de los sistemas inmune y hormonal, en la alteración de las comunicaciones intercelulares y en la síntesis de prostaglandinas (Welsch, 1987) y eicosanoicos (Rose y Connolly, 1993). En este sentido, se ha comprobado que la disponibilidad del ácido araquidónico (precursor de las prostaglandinas) puede modificarse según los niveles de ácido linoleico (Fisher y col., 1992). Aunque cabe señalar que tomando como ejemplo el ácido oleico derivado de los aceites de oliva o de palma, los resultados son contradictorios: mientras que Carroll y col. (1971) observaron que no ejercía ningún efecto sobre la

incidencia de tumores inducidos con DMBA en la rata (1971), otros autores le atribuyen un efecto inhibitor de la carcinogénesis de tumores mamarios en ratas inducidos con NMU (Cohen y col., 1986) y con DMBA (Lasekan y col., 1990) e incluso se señala que aumenta la incidencia de tumores inducidos en rata (Chan y col., 1983). Welsch (1992) trata de aclarar esta disparidad indicando que es posible que las dietas cuya principal fuente de grasa es el aceite de oliva o el de palma, no contengan la cantidad de ácido linoleico necesaria para el desarrollo de la carcinogénesis mamaria.

A diferencia de lo que ocurre con los ácidos grasos insaturados citados anteriormente, en varios estudios se ha observado que los ácidos grasos poliinsaturados del tipo omega-3 (eicosapentanoico y docosahexanoico), que forman parte de la grasa de ciertos tipos de pescado, inhiben la carcinogénesis mamaria en tumores inducidos en la rata (Carroll, 1985; Branden y Carroll, 1986; Abou-el-ela y col., 1988 y 1989), inducidos en la ratón (Cameron y col., 1989) y transplantables en el ratón (Erickson y Thomas, 1985) y en la rata (Karmali y col., 1984; Kort y col., 1987). Recientemente se ha comprobado que una dieta rica en PUFA de tipo omega-3 y pobre en PUFA de tipo omega-6 (linoleico) inhibe el crecimiento y el desarrollo de metástasis a partir de células tumorales mamarias de mujer transplantadas a ratón atímico (Rose y Connolly, 1993).

Sin embargo, otros estudios han encontrado un incremento en la carcinogénesis mamaria empleando ácidos grasos saturados (Aksoy y col., 1987; Beth y col., 1987; Chan y col., 1977; Cohen y col., 1981 y 1982; Hopkins y col., 1976 y 1981; Rogers, 1983; Rogers y col., 1986; Silvester y col., 1986); mientras que otros han mostrado que este tipo de grasa inhibe el desarrollo de tumores mamarios (Welsch, 1992), inhibición que desapare al suplementar con ácidos grasos insaturados (linoleico) (Welsch, 1992).

Algunos autores opinan, sin embargo, que el efecto depende de la cantidad de energía neta utilizable más que de la cantidad o tipo de grasa (Klurfeld y col., 1987; Thompson y col., 1985).

4.2.2.2. Contenido proteico en relación a la carcinogénesis mamaria

La influencia del contenido proteico en la carcinogénesis mamaria no ha sido estudiada tan extensamente como la relación existente con otros nutrientes de la dieta, entre otros el contenido graso, el calórico y el de ciertos micronutrientes como la vitamina A o el selenio (NAS, 1982).

Tal vez ello sea debido, en parte, a la dificultad que entraña el estudio en sí del contenido proteico, puesto que los alimentos ricos en proteínas suelen contener a su vez elevadas proporciones de grasa y kilocalorías, y son bajos en fibra. Ello justifica, en parte, que los estudios epidemiológicos no hayan podido esclarecer hasta el momento los efectos sobre la carcinogénesis debidos exclusivamente a la proteína, siendo para ello más válidos los estudios experimentales (Visek y Clinton, 1991).

4.2.2.2.1. Proteínas y carcinogénesis mamaria: estudios epidemiológicos

La primera observación importante referente a la proteína se debe a Armstrong y Doll (1975) al indicar que la incidencia de cáncer de mama en diferentes países se relacionaba directamente con las cifras de "disponibilidad" de alimentos ricos en proteínas, en especial proteínas de origen animal, así como de "disponibilidad" de productos grasos.

Tres años después se completó el informe anterior al señalarse que las tasas de incidencia y mortalidad por cáncer de mama se correlacionaban con el consumo de **grasa total**, proteína y calorías de origen animal, aunque, debido a la asociación tan estrecha entre estos componentes, no se pudo determinar si las correlaciones eran independientes entre sí (Hems y col., 1978). Posteriormente (Hems y col., 1980), establecieron que la relación resulta ser mucho mayor con la grasa que con la proteína de la dieta.

Gaskill y col. (1979) observaron la existencia de una asociación entre las cifras de ventas de productos lácteos, de calorías totales, de grasas, de proteínas, de carne de vacuno y de grasas de mesa (mantequilla o margarina) y la mortalidad e incidencia de cáncer de mama, aunque dichas relaciones no fueron significativas

después de incluir en el análisis otras variables de riesgo como por ejemplo la edad en la primera gestación.

En un estudio en el que se incluyó población caucasiana, japonesa, china, filipina y hawaiana, se ha encontrado una correlación entre el riesgo y el consumo de determinados tipos de grasa, especialmente de origen animal así como con el consumo de proteínas de origen animal (Kolonel y col., 1981). Otras investigaciones refieren asociaciones entre el consumo de carne de vacuno y porcino y el riesgo de cáncer de mama (Lubin y col., 1981; Talamini y col., 1984; Hislop y col., 1986; Lee y col., 1991).

Sin embargo, en dos estudios caso-control en los que se encontró asociación entre el consumo de grasa y el riesgo, no se encontró ninguna relación con respecto a la proteína (Phillips, 1975, Miller y col., 1978) y Rohan y col., (1990) han encontrado sólo una ligera relación entre el riesgo y el consumo de energía, proteína y grasa.

La mayoría de los estudios epidemiológicos sugiere que el consumo de proteína aumenta el riesgo de tumores mamarios, aunque no se ha podido establecer hasta la fecha un efecto exclusivo de la proteína, independiente del consumo calórico total, del consumo de grasa o de productos animales (Visek y Clinton, 1991).

4.2.2.2.2. Proteínas y carcinogénesis mamaria: estudios experimentales

Los estudios experimentales encontrados en la literatura respecto a la proteína en la dieta han sido escasos y con resultados contradictorios, a diferencia de los que han investigado el papel de la grasa y del consumo calórico. Ross y Brass (1973), estudiando la prevalencia de tumores mamarios espontáneos en la rata observaron que la proteína no ejercía ningún efecto sobre la fase de promoción tumoral. Otros autores, le atribuyen a la proteína efectos potenciadores de la carcinogénesis mamaria (Hawrylewicz y col., 1982 y 1986). Clinton y col. (1979, 1986 y 1988) comprobaron que al aumentar la proteína durante el período de iniciación se aumentaba la incidencia; sin embargo, este efecto no se observó cuando el contenido proteico se modificó durante la fase de promoción tumoral, confirmando los

resultados previamente descritos por Ross y Brass (1973).

Según Clinton y col. (1980) el efecto carcinogénico de la proteína ingerida está relacionado con el metabolismo del carcinógeno, ya que han descrito que al aumentar el consumo proteico se incrementa la actividad de enzimas hepáticas (Clinton y col., 1980). Parece que las dietas hipoproteicas disminuyen la detoxificación del carcinógeno (DMBA) hacia metabolitos sin actividad carcinogénica y aumentan la proporción de aquellos potencialmente carcinógenos para el tejido mamario (Vissek y Clinton, 1991).

Hawrylewicz (1986) ha demostrado que la disminución del contenido proteico ingerido, da lugar a un descenso en el crecimiento y, en consecuencia, a un menor desarrollo de los conductos mamaros. Este autor señala además que las ratas mantenidas con una dieta hipoproteica, hijas de madres que tuvieron la misma alimentación, presentan una menor incidencia de tumores mamaros inducidos con DMBA, lo que atribuye a un retraso en la maduración sexual, con la consiguiente alteración de los niveles hormonales y del desarrollo mamario.

4.2.2.3. Contenido en hidratos de carbono en relación a la carcinogénesis mamaria

La importancia de los hidratos de carbono en la incidencia del cáncer de mama es mucho menor si se compara con otros macronutrientes como la grasa y la proteína y queda reflejado en el escaso número de investigaciones tanto epidemiológicas como experimentales (NAS, 1982).

Los hidratos de carbono de la dieta están constituidos por los denominados hidratos de carbono solubles, entre otros, diversos monosacáridos (glucosa, fructosa), disacáridos (lactosa, sacarosa) y polisacáridos (almidón) y los polisacáridos insolubles o no digestibles (celulosa), que podrían considerarse como la fibra de la dieta (Alfin-Slater y Kritchevsky, 1991).

Según Paul y Southgate (1978) se define fibra como "la suma de polisacáridos y lignina (polímero de alcoholes aromáticos, presente en las plantas) que no son

digeridos por el hombre" y cuyos componentes se clasifican según Alfin-Slater y Kritchevsky (1991) en:

1. **Fibra insoluble**, que disminuye el tiempo del tránsito intestinal y aumenta el volumen de heces.
2. **Fibra soluble**, que enlentece el vaciado gástrico.
3. Otros componentes denominados **componentes menores de la fibra**: cutinas, ceras y ácido fítico.
4. **Componentes relacionados con la fibra**, donde se encuentran algunos azúcares y proteínas resistentes a los enzimas digestivos y los lignanos.

Aunque la fibra es un término que incluye estas sustancias y, por tanto sus propiedades dependerán de la naturaleza de estos constituyentes y de su proporción en la dieta, en los trabajos consultados se habla de los efectos de la fibra globalmente y en este sentido se ha demostrado que produce un aumento del volumen de heces, disminuye el tiempo del tránsito intestinal y aumenta la capacidad de retención de agua de las heces (Shetty y Kurpad, 1986; Spiller y col., 1986).

Debido a su importancia, los estudios referentes a la fibra se señalan separadamente de los del resto de hidratos de carbono.

4.2.2.3.1. Hidratos de carbono y carcinogénesis mamaria: estudios epidemiológicos

Puesto que la proporción de hidratos de carbono en la dieta se relaciona de una forma directa, aunque ligera, con las calorías y con el contenido proteico, así como de forma inversa con el contenido graso, es difícil esclarecer su efecto en la carcinogénesis de forma individualizada de los otros componentes. Por ello, los estudios epidemiológicos internacionales donde se observan correlaciones entre la incidencia y mortalidad de tumores malignos de mama y de colon y la cantidad de grasa disponible para el consumo, muestran también una asociación con las calorías y la proteína, mientras que con los hidratos de carbono la correlación suele ser negativa (Alfin-Slater y Kritchevsky, 1991). Sin embargo, se han encontrado

relaciones positivas entre las tasas de incidencia y mortalidad y el consumo de azúcar y negativas con el consumo de carbohidratos más complejos (Hems y Stuart, 1975; Carroll, 1977; Hems, 1978, NAS, 1982).

Conviene señalar que, al igual que sucede con la grasa, el contenido en azúcares de la dieta puede influir de forma indirecta en la incidencia al aumentar el contenido calórico de la dieta (Cummings, 1986).

4.2.2.3.2. Fibra y carcinogénesis mamaria: estudios epidemiológicos

Los estudios epidemiológicos revelan que los consumos elevados de fibra y de productos derivados de cereales se relacionan con un menor riesgo de cáncer de mama (Kolonel y col., 1981; Lubin y col., 1986; Brisson y col., 1989; Van't Veer y col., 1990).

Otras investigaciones en las que se han comparado las incidencias de cáncer entre personas vegetarianas y omnívoras, han puesto de manifiesto que los vegetarianos presentan menores excreciones urinarias de estrógenos, niveles plasmáticos inferiores de estrona y estradiol, así como una disminución en el riesgo de aparición de neoplasias mamarias (Goldin y col., 1981, 1986 y 1988; Barbosa y col., 1990; Arts y col., 1991, Rose y col., 1991).

Una observación interesante es que la población finlandesa consume más fibra que la americana, mientras que la relación consumo de grasa/fibra es mayor en el grupo de enfermos cancerosos americanos y de individuos no vegetarianos americanos (casos y controles), que en el resto de la población finlandesa (Alderkreutz y col., 1989). Posteriormente, se han confirmado estos resultados al encontrarse una relación inversa entre el consumo de cereales, y posiblemente de fibra, y el riesgo de cáncer, aunque no existió dicha relación con el consumo de vegetales y frutas (Alderkreutz, 1990).

Dos factores protectores conocidos frente al riesgo de padecimiento de cáncer de mama son la menarquia a una edad tardía y la primera gestación a una edad joven

(menor de 20 años) (Staszewski, 1971), y se sabe que la menarquia, así como el desarrollo mamario, pueden retrasarse en la mujer con una dieta rica en fibra, especialmente en fibra derivada de cereales (de Ridder y col., 1991).

Por último, unas de las características de la dieta occidental es su elevado contenido en grasa y proteína y su escasez en fibra, y, puesto que se ha observado que dicha dieta se asocia a la presencia de niveles plasmáticos de hormonas sexuales elevados, a niveles de globulinas transportadoras de hormonas sexuales reducidos y a una menor excrección de estrógenos y lignanos e isoflavonoides, se cree que estas asociaciones son debidas a estas características nutricionales (Alderkreutz y col., 1992). Además, los dos componentes de la fibra mencionados, lignanos e isoflavonoides, se asocian a un menor riesgo de cáncer mamario como se demostró anteriormente (Alderkreutz, 1990).

4.2.2.3.3. Hidratos de carbono y carcinogénesis mamaria: estudios experimentales

En general, en los estudios experimentales se ha comprobado que el efecto de los hidratos de carbono sobre la carcinogénesis es ligero o nulo y además, en ocasiones, los resultados de estos estudios son difíciles de interpretar debido a que el diseño no ha sido cuidadoso con respecto a la proporción de carbohidratos, siendo por tanto **dudosos** su contenido y tipo en la ración de los animales de los experimentos (Alfin-Slater y Kritchevsky, 1991).

Posteriormente, se ha observado que la carcinogénesis en ciertos modelos experimentales no se modifica en relación a los diferentes tipos de hidratos de carbono, por ejemplo, la incidencia de tumores en ratón C3H/ HeJ no varió al alimentar a los animales con dextrina y sucrosa respectivamente (Gridley y col., 1983).

4.2.2.3.4. Fibra y carcinogénesis: estudios experimentales

La fibra que contienen las frutas y los vegetales está compuesta principalmente por celulosa y pectina, componentes que pueden ser degradados parcial o completamente por la flora intestinal y que, además, no se unen a hormonas esteroideas; por otro lado, la fibra de los cereales está compuesta por lignina y hemicelulosa unida a lignina, que no puede ser degradada por la flora intestinal y sí tiene la capacidad de unirse a los estrógenos (Arts y col., 1991) y a compuestos carcinógenos como el DMBA (Gulliver y col., 1983). Además, los cereales pueden aportar diez veces más cantidad de lignanos como enterodiol y enterolactona por gramo que los vegetales y las frutas. Así, el salvado de trigo, la soja, la avena y la linaza contienen una mayor proporción de lignina en su fibra, tienen capacidad de unirse a los estrógenos con relativa afinidad y se piensa que son los protectores más potentes frente al cáncer (Arts y col., 1991).

Se ha demostrado que el contenido en fibra afecta a la composición de la flora y a la actividad de ciertas enzimas intestinales como la beta glucuronidasa, que realiza la hidrólisis de glucurónidos y la nitrorreductasa y la azorreductasa, responsables de la reducción de aminas aromáticas, ya que en ratas alimentadas con dietas ricas en fibra existe una disminución de la actividad de estas enzimas (Reddy y col., 1974).

Asimismo, se ha comprobado que la fibra influye en la promoción de la carcinogénesis, ya que ésta se retrasa en ratas con tumores inducidos con MN al aumentar en la alimentación el contenido en fibra (Arts y col., 1991; Cohen y col., 1991).

Además, se sabe que la pubertad y el desarrollo mamario en la rata puede ser más tardío si se incrementa la proporción de fibra de la dieta (Arts y col., 1992).

4.2.2.4. Contenido en micronutrientes en relación a la carcinogénesis mamaria

4.2.2.4.1. Mecanismos de defensa frente a la oxidación

El hombre y los animales reciben la agresión de moléculas de oxígeno reactivo, producidas durante la actividad bioquímica normal de los organismos, que lesionan los tejidos de diversas formas, entre otras, desnaturalizando proteínas, alterando los ácidos nucleicos o saturando los dobles enlaces de los ácidos grasos de las membranas celulares, alterando así su estructura y función (Sun, 1990). Frente a esta oxidación, existen mecanismos de defensa naturales tales como las enzimas mineralodependientes, entre ellas por ejemplo la glutatión-peroxidasa, y pequeñas moléculas secuestradoras del oxígeno libre como la vitamina C, el glutatión, el ácido úrico, los carotenoides y la vitamina E (Byers y Perry, 1992). Estas moléculas antioxidantes pueden prevenir la iniciación de la carcinogénesis al proteger al ADN de mutaciones. También son desfavorables a la promoción y progresión tumorales posteriores pues evitan el daño a las membranas celulares y actúan en su reparación (Sies, 1990). El mecanismo de antioxidación, aunque sí es el más conocido, no es el único por el que los micronutrientes previenen la carcinogénesis (Williams y Dickerson, 1990). Algunos autores han señalado que ciertos micronutrientes (compuestos con actividad de vitamina A, entre otros) inhiben la expresión *in vitro* de algunos factores moleculares de riesgo como determinados oncogenes y sistemas de comunicaciones intercelulares, además de inducir la diferenciación celular e inhibir el crecimiento en células transformadas (Prasad y Edwards-Prasad, 1990).

A continuación citamos la bibliografía más relevante con respecto a los micronutrientes más estudiados en relación a la carcinogénesis del cáncer de mama en la mujer: el selenio y la vitamina A.

4.2.2.4.2. Selenio en relación a la carcinogénesis mamaria

El selenio (Se) es un elemento traza esencial que puede inhibir de forma reversible las etapas de iniciación y, fundamentalmente, de promoción de la carcinogénesis (Morrison y col., 1988). El Se celular, que se encuentra de forma

inorgánica, parece no afectar al crecimiento, mientras que son las seleno-proteínas localizadas en el citoplasma, las que lo inhiben de una forma rápida, no letal y reversible (Morrison y col., 1988). Asimismo, se ha comprobado mediante estudios *in vitro* con citometría de flujo en líneas celulares mamarias de ratón que el Se inhibe la síntesis de ADN (Medina y col., 1984 y 1985), así como las fases S y G₂ del ciclo celular (Medina y col., 1983).

4.2.2.4.2.1. Selenio y carcinogénesis: estudios epidemiológicos

Broghamer y col. (1976) en un estudio caso-control observaron que niveles elevados de Se en sangre se relacionaban de forma significativa con menores porcentajes de recurrencias o de aparición de otros tumores (mamarios y no mamarios) y con tiempos de supervivencia prolongados. Posteriormente, se ha demostrado que los individuos con cáncer mamario avanzado presentan niveles de Se en sangre relativamente inferiores a los de los controles (McConnel y col., 1980; Schrauzer y col., 1985; Comstock y col., 1992), aunque otros estudios revelan que los niveles de selenio en sangre (Meyer y Verreault, 1987; Overbad y col., 1991) y en las uñas (Van y col., 1987) son similares en los casos que en los controles. Incluso, se ha encontrado una asociación positiva entre los niveles séricos de selenio y el riesgo de cáncer de mama (Coates y col., 1988).

Es evidente que los datos que aportan los estudios epidemiológicos no son concluyentes y una de las cuestiones que quedan por resolver es si los niveles de selenio se modifican por la enfermedad, o si son en parte responsables de ella (Overbad y col., 1991). Además, parece que la eficacia anticarcinogénica del selenio depende de su metabolismo y retención en el organismo y puede que elevadas concentraciones de selenio en los tejidos o en la sangre, no indiquen una menor riesgo de cáncer (Ip y Hayes, 1989). Actualmente, son necesarios nuevos estudios epidemiológicos, especialmente de tipo prospectivo (cohorte) que clarifiquen el papel del selenio en la carcinogénesis mamaria en el hombre (Garland y col., 1993).

4.2.2.4.2.2. Selenio y carcinogénesis mamaria: Estudios experimentales

Los estudios experimentales tampoco aclaran definitivamente el papel del Se pues se han llevado a cabo numerosos experimentos con diferentes especies animales y modelos tumorales y se ha observado que, en cada caso, la respuesta a la suplementación con selenio es diferente (Alfin-Slater y Kritchevsky, 1991).

Así, por ejemplo, se ha demostrado que el selenio actúa como un potente inhibidor de los tumores inducidos química o víricamente en la rata y en el ratón (Medina y col., 1980 y 1983). Sin embargo, sólo en cinco de los quince trabajos experimentales en los que se empleó selenito sódico como fuente de selenio, se apreció un descenso en la incidencia de tumores y de 33 estudios en los que se administraba aceite de maíz junto con selenito sódico, se observó un descenso en la incidencia en 15 de ellos (Morrison y col., 1988).

Yan y col. (1991) utilizando el ratón atómico como animal de experimentación, comprobaron que el crecimiento del trasplante de células tumorales mamarias no se inhibió ni con la suplementación ni con la deficiencia de selenio, resultado que confirma la variabilidad de los efectos de este mineral según los modelos tumorales empleados. Se observó además que, al disminuir el magnesio en la dieta, el crecimiento tumoral se retrasaba aunque se potenciaba la toxicidad del selenio; este efecto se debe a que la detoxicación del Se tiene lugar a través de la síntesis de selenoglutación, proceso que requiere ciertos niveles de magnesio (Yan y col., 1991).

Como ocurre con frecuencia en los estudios nutricionales, los resultados de estos experimentos deben extrapolarse al hombre con reserva, ya que en nuestra dieta, el Se se encuentra en forma orgánica, asociado a proteínas y aminoácidos y, sin embargo, la mayoría de los estudios experimentales emplean compuestos inorgánicos de selenio (Ip y col., 1992). Hemos de decir, finalmente, que también se han descrito dos componentes orgánicos, la selenometionina y la selenometilselenocisteína como compuestos capaces de inhibir la carcinogénesis mamaria (Ip y Hayes, 1989).

4.2.2.4.3. Vitamina A en relación a la carcinogénesis mamaria

Antes de citar la bibliografía más importante, mencionamos brevemente algunos conceptos básicos referentes a la vitamina A y a su influencia en la carcinogénesis.

La forma activa de la vitamina A en los tejidos es el retinol. La vitamina A en la dieta tiene dos orígenes: los retinoides, formados por el retinol (productos lácteos, carne, hígado) y sus ésteres; y los carotenoides. Existen dos clases principales de pigmentos carotenoides, los carotenos o carotenoides hidrocarbonados (α , β y γ carotenos), el más abundante es el β -caroteno (vegetales de hoja amarilla y verde) y las xantofilas o carotenoides oxigenados. El β -caroteno se absorbe en la mucosa intestinal y se transforma en retinal, pudiendo luego convertirse en retinol. El retinol es a su vez fuente de retinal y de ácido retinóico, retinoides con propiedades que mencionamos a continuación (Alfin-Slater y Kritchevsky, 1991).

Según Ong y Chytil (1983), los retinoides (retinol, retinal y ácido retinoico, entre otros) actúan como los esteroides, es decir, forman un complejo proteína-retinoide en la célula que puede desplazarse al núcleo y alterar la expresión genética. Por otro lado, los retinoides afectan a las glucoproteínas y a la síntesis de glucoconjugados, lo que puede a su vez alterar el genoma y modificar el reconocimiento, adhesión y agregación celulares (Roberts y Sporn, 1984).

Algunos autores han demostrado *in vitro* que la vitamina A inhibe el crecimiento de determinadas líneas celulares de tumores de mama en la especie humana y que el efecto de los retinoides consiste en una actividad antiproliferativa y fibrinolítica. Estos dos mecanismos pueden explicar algunos de los resultados contradictorios que se obtienen con la terapia con retinoides, puesto que la actividad fibrinolítica puede aumentar los procesos de invasión y metastatización (Halter y col., 1990). También se ha demostrado empleando líneas celulares tumorales mamarias con diferentes capacidades de invasión, que el ácido retinóico convierte la línea celular no invasiva en invasiva y viceversa (Brake y col., 1991).

4.2.2.4.3.1. Vitamina A y carcinogénesis mamaria: estudios epidemiológicos

En primer lugar, conviene señalar que la mayor parte de la literatura consultada hace referencia a la relación entre vitamina A y el cáncer de pulmón y los estudios respecto a los tumores mamarios son escasos.

El consumo de alimentos ricos en vitamina A se asocia a un menor riesgo de tumores en general (mamarios y no mamarios) (Shekelle y col., 1981; Graham y col., 1982). Micozzi y col. (1990) determinaron que los vegetales verdes contienen de un 80% a un 90% de xantofilas y de un 10% a un 20% de β -carotenos, mientras que los amarillos y otros vegetales como tomates y fresas, presentan de un 80% a un 90% de carotenoides hidrocarbonados (β -caroteno). Además, se ha comprobado que la cocción reduce drásticamente el contenido en xantofilas, principalmente luteína y en mucha menor medida el de caroteno. Por ello, y teniendo en cuenta que la protección frente al cáncer es mayor si se consumen los vegetales crudos y no cocinados (Graham y col., 1972), es posible que los carotenoides oxigenados (xantofilas) protejan frente al cáncer independientemente de los carotenos (Micozzi y col., 1990).

Steinmetz y col. (1991) en una revisión de la literatura referente al tema, concluyeron que el consumo elevado de vegetales y frutas se asocia de forma consistente, aunque no siempre, con un menor riesgo de cáncer, particularmente de tumores epiteliales del tracto digestivo, y destacaron que los vegetales crudos son especialmente beneficiosos ya que contienen un elevado número de agentes anticarcinógenos, principalmente carotenoides (hidrocarbonados y oxigenados).

El estado nutricional de los individuos respecto a la vitamina A se puede conocer, entre otros métodos, determinando el nivel plasmático de retinol, ya que el nivel plasmático de β -caroteno refleja un consumo reciente de dicho nutriente (Ramaswamy y col., 1990). No obstante, la mayoría de los estudios citados en esta revisión bibliográfica han tenido en cuenta ambos niveles. Así, Wald y col. (1984) en un estudio caso-control no encontraron diferencias entre los niveles séricos de retinol y caroteno en mujeres con tumores mamarios respecto a los controles (Wald

y col., 1984) y semejantes resultados se obtuvieron en otros dos estudios similares en los que no se encontraron relaciones entre el consumo de β -caroteno o sus niveles séricos y el riesgo de cáncer de mama (Marubini y col., 1988; London y col., 1992).

Sin embargo, algunos autores han encontrado que existe un menor consumo de vitamina A en las enfermas de cáncer mamario que en los controles, diferencias observadas incluso después del ajuste con respecto al consumo calórico y a otras variables asociadas al riesgo (Katsouyanni y col., 1988); igualmente, otras investigaciones han revelado que los niveles de retinol son inferiores en los casos que en los controles (Basu y Sasmal, 1988; Knekt y col., 1990; Potischman y col., 1990). Con respecto a la enfermedad metastásica Rigby y col. (1992) señalan que existen menores niveles de retinol y de proteína transportadora de retinol en los casos sin presencia de metástasis que en los controles, aunque los pacientes con metástasis presentan niveles de retinol similares a los controles, y una disminución de la proteína transportadora de retinol (CRBP).

Asimismo, se ha observado que la suplementación con vitamina A y en general el consumo de vegetales, evitan el desarrollo de lesiones mamarias benignas pero no el de malignas, lo que puede significar que la vitamina A no ejerce ninguna protección una vez que la transformación maligna ha tenido lugar (Hislop y col., 1990).

Todos los estudios citados anteriormente son de tipo retrospectivo, sin embargo, en dos estudios de tipo prospectivo se ha observado que el consumo de vitamina A produce un ligero efecto preventivo (Hunter y col., 1991) o ningún efecto (Paganini y col., 1987) en relación al riesgo de cáncer de mama en la mujer.

De nuevo en este punto, es necesario realizar nuevos estudios epidemiológicos que investiguen no sólo el papel de la vitamina A en general, sino el efecto en particular de los diferentes carotenoides y retinoides presentes en la dieta (Garland y col., 1993).

4.2.2.4.3.2. Vitamina A y carcinogénesis mamaria: estudios experimentales

La mayoría de estos trabajos confirman el carácter beneficioso de la vitamina A ya que señalan que su deficiencia aumenta la susceptibilidad a la aparición de tumores inducidos químicamente en diversos órganos (Alfin-Slater y Kritchevsky, 1991) y algunos autores han comprobado en la rata que el empleo de retinoides previene o reduce la aparición de tumores de mama (Moon y col., 1977; McCormick y col., 1980).

Más recientemente se ha demostrado en tumores experimentales mamarios y de piel que es en la fase de promoción tumoral donde los retinoides ejercen su efecto inhibitorio de la carcinogénesis (Grubbs y col., 1990) y que modifican la expresión genética a través de proteínas que actúan como ligandos intracelulares y de receptores nucleares (Sani y col., 1990).

Hay que indicar que, en general, los compuestos más empleados en los estudios experimentales han sido el retinol y el palmitato de retinol (Brandes y col., 1966) y que los retinoides de mayor actividad frente a los tumores de mama son los que carecen del grupo funcional carboxilo, como el retinol y derivados, mientras que el ácido retinoico y el 13-cis-ácido retinoico poseen una escasa actividad antitumoral mamaria (Moon y col., 1983). Asimismo, actúan como agentes preventivos el retinil metil éter y la 4 hidroxifenil retinamida (4-HPR) (McCormick y col., 1982; Bollag y col., 1987; Grubbs y col., 1990).

Otros compuestos que también han mostrado su efectividad en ratas con tumores mamarios inducidos con DMBA (Hill y Grubbs, 1982) y NMU (Hill y Grubbs, 1982; Welsch y col., 1984; Shealy, 1989) son el acetato de retinol. Sin embargo, en el ratón el acetato de retinol y la 4-HPR no son preventivos (Maiorana y Guillino, 1980; Welsch y col., 1984).

En la glándula mamaria la CRBP puede estar implicada en el mecanismo de prevención de los retinoides, ya que la mayoría de los compuestos preventivos eficaces se unen a esta proteína (Hill y Sani, 1991). La 4-HPR es una excepción ya que no se une a esta proteína, pero se cree que un metabolito suyo, que es la forma

biológicamente activa, sí se une a la CRBP (Mehta y col., 1988).

Finalizamos este capítulo de la revisión puntualizando los aspectos más interesantes que recogen Alfin-Slater y Kritchevsky, (1991):

1. Los estudios experimentales confirman que los antioxidantes, y por tanto de los retinoides, actúan en la fase de promoción tumoral (Moon, 1989; Krinsky, 1991).

2. Los retinoides son en algunos animales de experimentación carcinógeno-específicos y la vía, la duración y la dosis administrada pueden influir, ya que la administración de retinoides antes, no después, de la del carcinógeno puede aumentar la incidencia de tumores de mama; sin embargo, si la administración se continúa durante más tiempo, la incidencia final se reduce (Grubbs y col., 1990).

3. El β -caroteno, independientemente de su papel en la síntesis de vitamina A, previene la carcinogénesis en diferentes animales de experimentación, actuando en las últimas fases de la promoción y en la progresión tumorales (Birt, 1986; Krinsky, 1991).

4.3. Influencia de la nutrición en la carcinogénesis mamaria en la especie canina

Tras una extensa revisión de la bibliografía referente a la influencia de la nutrición en la carcinogénesis de los TMC, los estudios en este campo, tanto a nivel epidemiológico, experimental, como *in vitro* son escasos.

En el único estudio caso-control realizado en la perra (Sonnenschein y col., 1991). se ha observado que una dieta rica en grasa, así como la obesidad un año antes del diagnóstico no se asocian, en líneas generales, a un aumento del riesgo. Sin embargo, cuando se dividió la población objeto de estudio en animales ovariectomizados o no, los resultados variaron. Si se consideran solo las perras ovariectomizadas, la incidencia de tumores mamarios fue menor en perras que habían sido delgadas a los 9-12 meses de edad. Por el contrario, en perras no ovariectomizadas, el hecho de una delgadez en la etapa juvenil influyó ligeramente sobre la incidencia, aunque no de forma significativa.

Asimismo se determinó en este trabajo que el porcentaje de calorías consumidas derivadas de la grasa es significativamente menor en los casos que en los controles sin tumores y que el porcentaje de calorías derivadas de comida casera era menor en los casos que en los controles.

A continuación, referimos aquellas investigaciones de carácter experimental que se han enfocado en concreto al estudio de los tumores mamarios caninos, mediante la utilización de células neoplásicas mamarias caninas en otros animales de experimentación diferentes del perro.

En estudios *in vitro*, los trabajos con referencia a los TMC han sido también muy escasos. El componente de la dieta más estudiado ha sido el micronutriente selenio y así Watrach y col. (1982) estudiaron su efecto sobre células de carcinoma mamario canino transplantadas a ratón atómico. En esta investigación, el grupo tratado con selenio (selenito sódico por vía parenteral) presentó un crecimiento tumoral significativamente inferior al del grupo no tratado, observándose además que la

administración de selenio originaba su acúmulo de forma desigual en los tejidos.

Posteriormente, Fico y col. (1986) empleando líneas celulares de tumores mamarios caninos determinaron que el seleniodiglutación es la forma más efectiva para inhibir el crecimiento y que el efecto inhibitor depende de la concentración total de selenio, del tiempo de exposición, del tipo celular y del estado de crecimiento de las células. En este estudio, ninguna forma química de selenio fue efectiva sobre las células normales y además, se afirmó que el selenio inhibe la síntesis proteica al alterar la transcripción del ARN.

Recientemente se ha comprobado que las células poseen una sensibilidad diferente a los efectos tóxicos del seleniodiglutación debido no a una distinta capacidad de retención de selenio sino más bien de metabolización de este hacia formas menos tóxicas (Fico y Milner, 1991). Estos autores han señalado que la capacidad del selenio de alterar el crecimiento *in vitro* de las células tumorales mamarias caninas depende de la cantidad y duración de la exposición al selenio y de la densidad del cultivo (Kuchan y Milner, 1992).

Pronóstico de los tumores mamarios caninos

El pronóstico de los tumores mamarios caninos depende en gran medida del estadiaje clínico, el cual se realiza mediante el sistema TNM (Owen, 1980), especialmente del tamaño del tumor, pero también del tipo histológico y de la velocidad de crecimiento (Misdorp y col., 1973; Fowler, 1974; Bostock, 1975; Else y Hannant, 1979; Chrisp y Spangler, 1980; Kurzman y Gilbertsson, 1986). El comportamiento biológico del tumor estimado mediante el tipo histológico, el grado de invasión en los vasos y/o el estroma, la morfología y diferenciación celulares y el índice mitótico, se ha señalado como válido para predecir la supervivencia de los animales (Misdorp y Hart, 1976). Sin embargo, el valor pronóstico de la afectación ganglionar es controvertido (Misdorp y col., 1973; Gilbertson et al., 1983).

Con respecto al tipo histológico, se ha observado que los sarcomas se asocian a supervivencias menores que los carcinomas complejos, mientras que los carcinomas

solidos se asocian a periodos de supervivencia intermedios (Brodey y col., 1983). Ciertas características clínicas asociadas a un pronóstico adverso como la presencia de metástasis pulmonares, presencia de linfedema, la infiltración tumoral de la línea media, y la presencia de nódulos satélites entre el tumor y los ganglios linfáticos, se asocian no sólo a un mal pronóstico sino a que su curación no podrá establecerse exclusivamente con la resección quirúrgica (Brodey y col., 1983).

El tipo de intervención quirúrgica, así como el realizar la ovariectomía en el momento de la cirugía carecen de valor pronóstico (Allen y Mahaffey, 1989).

Estos son los factores clásicos que ayudan a establecer el pronóstico en los TMC. En los últimos años se está comenzando a evaluar otros factores como son el contenido de ADN tumoral y la fase S. Solamente existe un trabajo publicado en el que se estudia el valor pronóstico del análisis del contenido de ADN y de la fase S en tumores caninos. Los factores indicativos de mal pronóstico encontrados mediante un análisis multivariado fueron la edad, una elevada fase S y la presencia de sarcomas (Hellmén y col., 1993).

Respecto a la influencia de la dieta, en el único estudio caso-control realizado en la perra se ha observado que una dieta rica en proteína y con un bajo contenido en grasa, se relaciona con un mejor pronóstico, mientras que el contenido en grasa de la dieta sin tener en cuenta el de proteína, no presenta ninguna asociación con la supervivencia de los casos (Shofer y col., 1989).

Como se comprueba, es necesario ampliar los estudios sobre los "nuevos" factores pronóstico en los TMC, tales como el ADN, la fase S y los factores dietéticos entre otros, para poder contar con más datos fiables y de posible aplicación clínica.

Capítulo II

Hallazgos clínicos e histológicos en 102 perras con tumores mamarios benignos y malignos

INTRODUCCION

Los tumores mamarios son las neoplasias más frecuentes en la perra (Dorn y col., 1968). En animales menores de 4 años son muy infrecuentes, sin embargo, a partir de esta edad la incidencia empieza a aumentar, especialmente a partir de los 6 años (MacEwen y Withrow, 1989). En la etiología de los tumores mamarios caninos (TMC) influyen fundamentalmente las hormonas esteroides sexuales. Muestra de esta influencia es el hecho de que la ovariectomía realizada antes de los 2 años de edad, reduce en gran medida el riesgo de aparición de estas neoplasias. Asimismo, se ha comprobado que la administración de hormonas esteroides influye en la carcinogénesis mamaria en la perra (Rutteman, 1990).

La presentación clínica de los TMC es muy variable, ya que pueden aparecer de forma única o bien ser múltiples. En el último caso, las neoplasias pueden ser del mismo o de diferente tipo histológico, en ocasiones son resultado del crecimiento de una única neoplasia que afecta a varias glándulas (Brodey, 1983; Theilen y Madewell, 1987). Además, se presentan en forma de nódulos bien delimitados de crecimiento lento o estacionario, o bien como nódulos de crecimiento rápido e invasivo, adheridos a tejidos subyacentes y con otros signos de malignidad (Theilen y Madewell, 1987).

Los TMC malignos metastatizan con frecuencia, los de tipo epitelial a través del sistema linfático, o sanguíneo, o ambos. Sin embargo, los sarcomas metastatizan más frecuentemente a través del sistema sanguíneo (Theilen y Madewell, 1987).

El diagnóstico inicial de los TMC se realiza en función de las características clínicas, aunque puede emplearse como método adicional al diagnóstico la citología con aguja fina (Allen y col., 1986; Hellmén y Lindgren, 1989). No obstante, para poder establecer un diagnóstico definitivo es necesario en muchos casos el estudio histopatológico (Allen y col., 1986).

Los tumores mamarios caninos son complejos no solamente en su presentación clínica; su histopatología es igualmente complicada, por lo que resulta difícil

desarrollar un sistema de clasificación histológica que aporte un valor pronóstico. La clasificación histológica de los tumores mamarios caninos más frecuentemente empleada a nivel mundial es la clasificación de la OMS (Hampe y Misdorp, 1974).

En el presente trabajo se han estudiado las características clínicas e histopatológicas de 102 perras que presentaban displasias, tumores mamarios benignos y malignos. Hemos incluido displasias mamarias aunque no son tumores, ya que se consideran lesiones premalignas. Estas se han encuadrado dentro de un mismo grupo junto con los tumores benignos.

MATERIAL Y METODOS

1. Animales

En este estudio hemos empleado 102 perras que acudieron a las consultas del Departamento de Patología Animal II de la Facultad de Veterinaria de Madrid y que presentaban tumores mamarios. La edad de los animales se encontraba en un rango entre 5 y 13 años, ambos inclusive. La media de edad de los animales fue 9,86 años \pm 0,22 (error estándar de la media). El valor mediana de edad fue 10 años.

Un 58% los animales eran de raza pura, siendo la de mayor frecuencia de presentación la raza pastor alemán. Un 42% de los casos fueron mestizos y cruces entre razas puras.

Noventa y un casos (89%) fueron perras no ovariectomizadas en el momento del diagnóstico, mientras que 11 (10%) habían sido ovariectomizadas anteriormente a esta fecha.

Los animales han sido reseñados mediante las letras CO seguidas de un número.

Para comparar las variables entre animales con diferentes tipos de tumores, los grupos empleados han sido:

I: grupo con displasias y tumores benignos y

II: grupo con tumores malignos con o sin tumores benignos.

2. Examen clínico

A continuación describimos el examen clínico realizado a todos los animales en la primera visita a las consultas.

2.1. Anamnesis

En primer lugar realizamos una anamnesis general y sistemática. Posteriormente, hicimos referencia al problema mamario, obteniendo la siguiente información:

Datos del tumor: observación del mismo por primera vez, tamaño que presentaba en aquel momento y ritmo de crecimiento (categorizado este en estacionario, lento, moderado y rápido).

Además, se preguntó acerca de la posible existencia de otros tumores de mama y su diagnóstico histológico, así como de otros tumores no mamaros.

Asimismo, mediante el empleo del cuestionario de alimentación descrito en el apartado de material y métodos del capítulo IV, se obtuvo la información referente al estado hormonal del animal.

2.2. Exploración clínica

En primer lugar, realizamos una exploración general del animal incluyendo la exploración de la cavidad oral en busca de posibles signos acromegálicos, la auscultación torácica y la palpación abdominal.

La exploración de las glándulas mamarias se realizó mediante la inspección y palpación de las mismas. Se evaluó el aspecto de las glándulas tumorales o no, y de los pezones así como la eventual presencia de secreciones glandulares.

Los tumores fueron identificados mediante el sistema de letras y números que se describe a continuación: los tumores de la cadena mamaria izquierda se denominaron con la letra L (Left= izquierda) seguida de un número del 1 al 5 según su localización en la cadena mamaria en dirección cráneo caudal. Los tumores localizados en la cadena mamaria derecha se denominaron con la letra R (Right= derecha) seguida de la misma numeración descrita para la cadena izquierda.

De cada tumor se hizo una ficha atendiendo a su localización en la cadena mamaria, determinándose el tamaño en centímetros mediante la valoración de 3 diámetros con la ayuda de un calibrador. También se valoró la consistencia, clasificándola en dura, firme, o blanda, la adherencia o no a la piel y/o a planos profundos y la ulceración o no de la piel.

Posteriormente, exploramos el sistema linfático que drena la región mamaria, el cual está formado por los ganglios inguinales superficiales que drenan las dos glándulas inguinales, los ganglios inguinales profundos que drenan los ganglios inguinales superficiales y los ganglios axilares principales y secundarios que drenan las 3 glándulas craneales.

Para la valoración de posibles metástasis torácicas se realizó una radiografía de tórax en proyección latero-lateral, siendo necesario en la mayoría de los casos hacer dos proyecciones.

2.3. Estadíaie clínico

El estadio clínico del paciente se estableció siguiendo el sistema TNM (Owen, 1980) de la Organización Mundial de la Salud, mediante el cual se evalúa la gravedad del proceso en:

A) Estadio I: que corresponde a los casos que presenten tumores de tamaño T1, T2 o T3 sin afectación ganglionar verificada histológicamente y sin presencia de metastásis distales, denominado en el presente trabajo como estadio local.

B) Estadio II: todos los casos con tumores de tamaño T4 sin evidencia de afectación ganglionar verificado mediante histología ni presencia de metástasis distales, denominado estadio local avanzado.

C) Estadio III: Tumores de cualquier tamaño con afectación del ganglio axilar o inguinal superficial confirmada histológicamente, denominado estadio regional.

D) Estadio IV: Presencia de metástasis distales incluyendo la afectación de ganglios linfáticos distales, o estadio de enfermedad diseminada.

2.4. Evaluación prequirúrgica

En los animales que iban a ser intervenidos quirúrgicamente se realizó un perfil analítico, incluyendo un hemograma y perfil bioquímico y un electrocardiograma.

3. Tratamiento de los tumores mamarios

La decisión de realizar una resección quirúrgica de las neoplasias fue tomada en base a su localización, número de glándulas afectadas, tamaño y adherencia a planos profundos y a piel, afectación ganglionar y presencia de metástasis distales. También se consideró la condición general del animal y la opinión del propietario.

Siguiendo estos criterios fueron operadas 90 perras de las 102 incluidas en el estudio. Así, en 2 animales que presentaban un estadio local avanzado y en otro caso con metástasis distales, no se realizó la intervención quirúrgica. En otros 2 casos con metástasis distales se realizó una cirugía paliativa según la decisión del propietario.

Dos animales fueron eutanasiados debido a la presencia de otras enfermedades graves como leishmaniosis e insuficiencia renal crónica.

En 5 casos no se realizó la resección quirúrgica del tumor por decisión de los propietarios y el diagnóstico se estableció mediante citología.

En cuanto a la técnica operatoria empleada, y teniendo en cuenta que en ninguno de los animales (n=90) se presentaron metástasis distales, se practicaron nodulectomías en 12 casos y en 46 casos, mastectomías; resecciones en bloque se realizaron en 28 animales. En 2 casos se llevo a cabo la extirpación unilateral de la cadena mamaria completa y en otros 2 la extirpación de las dos cadenas mamarias.

Además, el ganglio inguinal superficial homolateral fue extirpado quirúrgicamente cuando se realizó la mastectomía de la quinta glándula o bien la resección en bloque de la tercera, cuarta y quinta glándula o la extirpación de la cadena mamaria completa (n = 52 casos).

El ganglio linfático axilar homolateral fue extirpado en 3 casos al estar clínicamente aumentado de tamaño y presentar evidencia de afectación mediante examen citológico.

4. Estudio histológico

4.1. Toma de muestras

Después de la intervención quirúrgica y/o necropsia, el tejido tumoral fue seccionado. Las muestras se obtuvieron de las zonas del tumor que no presentaban necrosis ni hemorragias, así como de otras zonas y se conservaron en una solución de formol tamponado al 10%.

4.2. Procesado de las muestras

Las muestras fijadas en formol tamponado fueron incluidas en parafina plastificada (Panreac) con punto de fusión 56°-58°C empleando un procesador de tejidos (Procemir 1000).

Se prepararon bloques de parafina según el sistema de cassettes para procesado de tejidos (Vosopath AG) mediante una consola dispensadora de parafina, consola térmica y crioconsola "Tissue Tek" (Miles Scientific).

Para la obtención de los cortes seriados de 4-5 μm de espesor se utilizó un microtomo con motor incorporado "Minot Leitz 1516".

Posteriormente las secciones fueron desparafinadas, rehidratadas y teñidas con hematoxilina/eosina como técnica rutinaria para el diagnóstico histopatológico.

4.3. Diagnóstico histológico

El diagnóstico histológico se realizó de acuerdo con la Clasificación de Tumores en Animales Domésticos de la Organización Mundial de la Salud (Hampe y Misdorp, 1974), valorando el tipo histológico predominante en la preparación.

Asimismo, las neoplasias fueron además clasificadas como heterogéneas u homogéneas dependiendo de la presencia o no de áreas histológicamente diferentes.

En todos los tumores malignos analizados se determinaron el grado histológico de malignidad y el grado de malignidad nuclear según la descripción de Misdorp y Hart (1976), estableciéndose tres grados de malignidad histológica y nuclear.

4.4. Estudio citológico

En 5 casos el diagnóstico se realizó mediante examen citológico. Las muestras obtenidas mediante aspiración con aguja fina, fueron teñidas con diff-quick.

5. Análisis estadístico

La edad en la primera consulta entre los grupos de animales se comparó empleando la prueba no paramétrica de Wilcoxon. Las variables categóricas entre grupos se evaluaron mediante la prueba del χ^2 o la prueba de Fisher. El nivel de significación estadística se consideró a partir de valores de $P > 0,05$.

RESULTADOS

1. Número y tipo de tumores

Hemos obtenido 171 nódulos mamarios de las 102 perras de nuestro estudio. Dichos nódulos se han clasificado atendiendo a su histología en 2 grupos: Grupo I: displasias y tumores benignos y Grupo II: tumores malignos.

Grupo I: Displasias y tumores benignos. Este grupo está formado por 109 nódulos pertenecientes a 67 animales. Cuarenta y ocho perras presentaban displasias y/o tumores mamarios benignos exclusivamente, mientras que 19 casos tuvieron además tumores mamarios malignos. Dos tumores presentaban una malignidad "borderline" y han sido incluidos en este grupo.

De las perras con displasias y tumores benignos exclusivamente, 2 habían padecido anteriormente tumores mamarios malignos y 9 otras neoplasias: oral benigna (n = 1), ovárica maligna (n = 1), cutánea benigna (n = 2), mamaria benigna (n = 1) mamaria de histología desconocida (n = 1) y tumor venéreo transmisible (n = 1).

Grupo II: tumores malignos. Este grupo está formado por 62 tumores primarios pertenecientes a 54 perras, de las cuales 19 presentaban a su vez neoplasias benignas

como se ha señalado anteriormente. Asimismo, de estas 54 perras, 3 fueron operadas anteriormente de otros tumores malignos y 6 de otras neoplasias: ovárica maligna (n= 1), cutánea benigna (n= 1), mamaria benigna (n= 1) mamaria de histología desconocida (n= 2) y tumor venéreo transmisible (n= 1).

2. Influencia de la edad y del estado hormonal

La edad ha sido una variable que no presenta una distribución normal, por lo que los datos presentados son los valores mediana de cada grupo. En los animales con displasias y tumores benignos exclusivamente la mediana de edad al diagnóstico es 10 años (rango de 5 a 13, n= 48), mientras que en el grupo de animales con tumores malignos es 10,5 años (rango de 6 a 13, n= 54), siendo la diferencia entre las dos medianas de edad estadísticamente significativa ($P < 0,05$).

En los animales ovariectomizados la mediana de edad es 12 años (rango de 7 a 13, n= 11), mientras que la mediana es de 10 años en las perras no ovariectomizadas (rango de 5 a 13 años, n= 91). La diferencia de la mediana de edad entre los dos grupos es estadísticamente significativa ($P < 0,05$).

No existen diferencias significativas entre la proporción de tumores benignos y malignos en las perras ovariectomizadas y las no ovariectomizadas.

En 100 casos se pudo estimar el ritmo de crecimiento. Para la comparación de esta variable con otras características clínicas en animales que presentaban múltiples **nódulos** (n=39), hemos tenido en cuenta el ritmo de crecimiento del tumor que resultó histológicamente más maligno. Se comprueba que, a mayor edad, el ritmo de crecimiento aumenta ya que la mediana de edad de los animales que presentaban tumores con crecimiento estacionario es 10 años (rango de 5 a 12, n= 11), siendo significativamente inferior a la mediana de edad de aquellos con crecimiento rápido (11 años, rango de 6 a 13, n= 28) ($P < 0,05$).

Existen diferencias no significativas si comparamos la edad de los animales con tumores malignos y su estadio clínico. La mediana de edad de las perras que presentan un estadio local es 10 años (rango de 6 a 13, n= 39), mientras que en

aqueellos con metástasis regionales es 10 años (n= 10) y 11 años en animales con metástasis distales (rango de 10 a 13, n= 3).

3. Resultados clínicos

3.1. Localización de los tumores

Cincuenta y nueve perras presentaban más de una glándula mamaria afectada por TMC. De estos 59 animales, 39 tuvieron al menos 2 tumores que se consideraron diferentes al estar claramente separados y circunscritos macroscópicamente (de la misma o de diferente histología). De los 39 casos con múltiples tumores, 16 presentaban diferentes displasias y/o tumores benignos, 4 diferentes tumores malignos y 19 casos eran tumores benignos y malignos conjuntamente.

Las glándulas mamarias más frecuentemente afectadas han sido los pares 4^o y 5^o pues 96 tumores del total (n= 171) tenían esta localización, lo que supone un 56% de incidencia en estas mamas. Treinta tumores se situaban en el 3^{er} par (17%) y 29 (17%) correspondieron al 1^{er} y/o 2^o pares. Por otro lado, 17 neoplasias afectaban a más de dos glándulas mamarias o bien al 3^{er} par y a una de las glándulas adyacentes.

3.2. Tamaño y crecimiento tumoral

El ritmo de crecimiento se evaluó en 168 tumores y se relaciona de forma estadísticamente significativa al tamaño del tumor ($P < 0,001$) y a la adherencia a planos profundos ($P < 0,01$) (Tabla 1).

3.2.1. Grupo I: Displasias y tumores benignos

Del total de 109 displasias y tumores benignos, 63% pertenecen a la categoría T1, 24% a la T2 y 13% a la T3.

En 107 displasias y tumores benignos el ritmo de crecimiento se relaciona de forma directa y estadísticamente significativa con el tamaño tumoral, siendo el valor de P obtenido con la prueba del Chi₂ < 0,05 (Tabla 3).

Cuarenta y dos displasias y tumores benignos de 109 estaban adheridos a tejidos adyacentes. No hemos encontrado una relación significativa entre la adherencia a planos profundos y el ritmo de crecimiento ni el tamaño tumoral.

Asimismo, de 109 displasias y tumores benignos solamente 4 estaban ulcerados. No se ha podido establecer una relación significativa entre la ulceración de la piel y el ritmo de crecimiento, la adherencia a planos profundos ó el tamaño tumoral.

Tipo de tumor	Grupo I	Grupo II
Tamaño		
T1	69	24
T2	26	19
T3	14	17
T4	-	2
Total	109	62
Ritmo de crecimiento		
Estacionario	17	3
Lento	32	20
Medio	32	21
Rápido	26	17
Total	107	61
Adherencia		
Si	42	37
No	67	25
Total	109	62

Tabla 2. Tamaño, ritmo de crecimiento tumoral y adherencia a planos profundos en relación al tipo de tumor. Grupo I: displasias y tumores benignos. Grupo II: tumores malignos.

TAMAÑO	TOTAL	RITMO DE CRECIMIENTO			
		Estacionario	Lento	Medio	Rápido
T1	67	15	23	18	11
T2	26	2	6	9	9
T3	14	0	3	5	6

Tabla 3. Relación entre el ritmo de crecimiento y el tamaño tumorales en displasias y tumores benignos.

3.2.2. Grupo II: Tumores malignos

Del total de 62 tumores malignos, 39% pertenecen a la categoría de tamaño tumoral T1, 31% a la T2, 27% a la T3 y 3% a la T4.

De las 54 perras pertenecientes al grupo de animales con tumores malignos, 39 presentaban un estadio clínico local, 2 un estadio local avanzado, 10 un estadio regional y 3 un estadio de enfermedad diseminada.

El ritmo de crecimiento fue una variable conocida en 61 tumores. Hemos observado que el ritmo de crecimiento se relaciona de forma significativa con el tamaño del tumor, con un valor de $P < 0,05$ (tabla 4); sin embargo, no se relaciona de forma significativa con la adherencia a planos profundos ni con la ulceración de la piel.

La ulceración de la piel sí se relaciona de forma significativa con otras variables clínicas adversas como la adherencia a planos profundos ($P < 0,05$), el tamaño del tumor ($P < 0,05$) y la afectación ganglionar ($P < 0,01$).

	TAMAÑO TOTAL	RITMO DE CRECIMIENTO			
		Estacionario	Lento	Medio	Rápido
T1	24	3	11	9	1
T2	18	0	4	6	8
T3	17	0	5	6	6
T4	2	0	0	0	2

Tabla 4. Relación entre el ritmo de crecimiento y el tamaño tumoral en tumores malignos.

En los 62 tumores malignos incluidos en este grupo, la afectación ganglionar no se relaciona de manera estadísticamente significativa con el ritmo de crecimiento ni con la adherencia a planos profundos; sin embargo sí lo hace con el tamaño y con la ulceración de la piel, siendo los valores de $P < 0,01$ respectivamente (Tabla 5).

TAMAÑO	TOTAL	ULCERACION	
		NO	SI
T1	24	23	1
T2	19	15	4
T3	17	9	8
T4	2	1	1
AFECCION GANGLIONAR	TOTAL	NO	SI
N0	52	44	8
N1	10	4	6

Tabla 5. Relación entre la ulceración de la piel y el tamaño tumoral y la afectación ganglionar.

Los tumores T2, T3 y T4 conjuntamente, al ser comparados con los T1, se relacionan de forma **significativa** con la afectación ganglionar, siendo el valor de $P < 0,05$.

De 32 **casos** en los que los ganglios axilares y/o inguinales superficiales estaban infartados y que fueron examinados histológicamente, se confirmó en 10 la presencia de metástasis ganglionar. La consistencia ganglionar a la palpación estaba aumentada en estos 8 casos, sin embargo no hemos podido establecer la significación estadística de este resultado.

4. Resultados histológicos

A continuación se describen los datos histológicos y su comparación con las variables clínicas. Para ello, se han excluido los datos de 5 perras en las que el diagnóstico se realizó mediante citología. La **tabla 6** muestra la distribución de los tipos histológicos en los grupos I y II.

4.1. Grupo I: Displasias y tumores benignos

Veintiséis nódulos fueron displasias: 2 epiteliosis, 1 ectasia ductal, 3 papilomatosis y 20 hiperplasias lobulares. Ochenta tumores fueron neoplasias benignas: 47 adenomas complejos, 5 fibroadenomas, 24 tumores mixtos benignos, 2 tumores mixtos benignos de malignidad "borderline" y 2 angiomas.

Las diferencias encontradas en las características clínicas como el ritmo de crecimiento, la adherencia a planos profundos, la ulceración de la piel y el tamaño del tumor de los diferentes tipos histológicos benignos no han sido significativas.

4.2. Grupo II: Tumores malignos

4.2.1. Tipo histológico

Hemos encontrado 30 carcinomas de tipo simple y 17 de tipo complejo. Nueve tumores han sido tumores mixtos. No hemos observado diferencias significativas entre los carcinomas de tipo simple, los complejos y los tumores mixtos con respecto al ritmo de crecimiento, la adherencia a planos profundos, la ulceración de la piel, el tamaño del tumor, ni la afectación ganglionar.

En 18 tumores benignos y en 13 malignos hemos observado heterogeneidad histológica, incluyendo los 11 tumores en los que se observaron áreas de malignidad y benignas conjuntamente.

4.2.2. Grado de malignidad

El grado histológico de malignidad fue determinado en 60 tumores. Doce tumores presentaban grado I, 27 grado II y 21 grado III. El grado histológico de malignidad no se ha relacionado de manera estadísticamente significativa con el tamaño tumoral, el ritmo de crecimiento, la adherencia a planos profundos, ni la ulceración de la piel. El valor de P en de todas las comparaciones fue $> 0,05$. Asimismo no se observaron diferencias significativas en los grados histológicos de malignidad entre los tipos histológicos simples, complejos y mixtos.

El grado nuclear de malignidad fue determinado en 60 tumores. Seis tumores presentaban grado I, 30 grado II y 24 grado III. No se observan diferencias significativas en esta característica histológica en relación al tamaño tumoral, el ritmo de crecimiento, la adherencia a planos profundos, ni la ulceración de la piel. Tampoco se observan diferencias entre los tumores simples, complejos y mixtos.

		Tipo histológico	Nº de tumores
GRUPO I	DISPLASIAS	Epiteliosis	2
		Ectasia ductal	1
		Papilomatosis	3
		Hiperplasia lobular	20
	TUMORES BENIGNOS	Adenoma complejo	47
		Fibroadenoma	5
		Tumor mixto benigno	24
		Tumor mixto benigno "borderline"	2
		Angioma	2
		TOTAL	106
GRUPO II	TUMORES MALIGNOS	Carcinoma "in situ"	6
		Adenocarcinoma tubular	19
		Adenocarcinoma papilar	9
		Carcinoma sólido	4
		Carcinoma de células fusiformes	3
		Carcinoma de células escamosas	4
		Carcinoma	2
		Sarcoma	4
	Mixto maligno	9	
TOTAL	60		

Tabla 6. Tipos histológicos de displasias y tumores benignos y malignos. No se han incluido 5 tumores diagnosticados mediante examen citológico.

DISCUSION

En este capítulo presentamos los datos clínicos e histopatológicos de 102 perras que presentaban nódulos mamarios. Se han incluido en el estudio displasias mamarias, que se han encuadrado en el grupo I de displasias y tumores benignos, por lo que en ocasiones mencionamos nódulos mamarios cuando hacemos referencia también a displasias.

La incidencia de los TMC aumenta con la edad (Brodey & Goldschmidt, 1983; Theilen & Madewell, VCM). Asimismo con la edad, aumenta el riesgo de desarrollo de neoplasias malignas con respecto a las benignas (Misdorp, 1988). En nuestro estudio, el comportamiento clínico así como las características histológicas de los tumores mamarios en las perras de mayor edad, son significativamente de mayor adversidad que en las perras más jóvenes. Este resultado está en contra de lo observado por otros autores (Else & Hannant, 1979; Priester, 1979). Sin embargo, en otras investigaciones realizadas con perras beagles se señala que los tumores benignos aparecen a una edad más temprana que los tumores malignos (Tailor, 1976; Moulton, 1986). Además nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Heilmén y col. (1993) que indican que la edad se relaciona con un pronóstico adverso en los TMC. Una posible explicación a este fenómeno podría ser que a mayor edad existe mayor exposición a los factores carcinogénicos pues tiene lugar a lo largo de los años, ya que en la perra la actividad ovárica continúa durante toda la vida (Schneider y col., 1969). Además, las alteraciones del ADN pueden llegar a acumularse (Kitchell, 1993). Por otro lado, la capacidad de reparación del ADN (Oppenheimer, 1985) y la respuesta del sistema inmune disminuyen con la edad (Kitchell, 1993).

Según algunos estudios, existe predisposición racial al desarrollo de TMC. Sin embargo, los diversos autores no se ponen de acuerdo en señalar cuales son las razas más susceptibles. Así, se indica frecuentemente que las razas de caza son más susceptibles que otras (MacEwen & Withrow, 1989). En nuestro trabajo no hemos realizado un estudio de este tipo con respecto a la raza, ya que creemos que la población incluida no es representativa de la población canina española.

Según Misdorp (1988) la ovariectomía reduce el riesgo de aparición de TMC si se realiza antes de los 2,5 años de edad, pero si se realiza posteriormente, reduce el riesgo de tumores benignos, no el de malignos. En las perras de nuestro estudio, y teniendo en cuenta que la ovariectomía fue realizada posteriormente a los 2,5 años, comprobamos que ésta retrasa la edad de presentación clínica de los TMC, pero no se relaciona con la presentación de tumores malignos o benignos. En nuestra opinión, la reducción de los niveles hormonales tras la ovariectomía realizada después de los 2,5 años puede disminuir la proliferación de células transformadas o en estadios intermedios de transformación. Además, el hecho de que la ovariectomía tras los 2,5 años no previene el desarrollo de tumores mamarios malignos indica que el momento decisivo en la carcinogénesis es antes de los 2,5 años de edad, independientemente de que la transformación maligna se haya completado o no.

Por otro lado y con respecto al papel de las hormonas ováricas en los TMC, puesto que en la gran mayoría de las metástasis no se detectan receptores de hormonas ováricas (Rutteman, et al. 1988), es probable que el tratamiento anti-hormonal no impida el desarrollo de metástasis en la mayoría de las perras operadas de tumores mamarios malignos.

La presentación clínica de los TMC es muy variable, ya que pueden ser lesiones simples o múltiples. En nuestro estudio, un 58% de los casos presentaba más de una glándula mamaria afectada y en un 66% de estos animales, eran tumores diferentes, mientras que en un 33% se trataba de un único tumor que invadía varias glándulas. La multiplicidad de los TMC señalada tradicionalmente por otros autores (MacEwen & Withrow, 1989), normalmente representa lesiones diferentes de naturaleza benigna, maligna o ambas, por lo que en estos casos, todas las lesiones deben ser remitidas y analizadas histológicamente.

Las características clínicas tumorales que indican malignidad tales como el crecimiento rápido, el presentar gran tamaño y la adherencia a planos profundos aparecían conjuntamente en los tumores de nuestro estudio, de forma estadísticamente significativa. De todos estos factores, la adherencia a planos profundos influye en el tratamiento, puesto que es resultado de un crecimiento infiltrativo y puede por tanto, dificultar una excisión radical del tumor. Sin embargo, todos los factores mencionados, también aparecen en algunos tumores benignos, lo que nos muestra la dificultad que supone el predecir el comportamiento tumoral mediante

las características clínicas exclusivamente. Es necesario realizar un estudio histopatológico pues aunque mediante citología no se observen características de malignidad tumoral, esto no excluye la presencia de un tumor maligno en muchos TMC (Allen y col., 1986). Por tanto, el clínico debe tratar todos los TMC como potencialmente malignos; o bien obtener datos convincentes de su naturaleza histológica. El tratamiento quirúrgico no debe retrasarse en ningún caso y el grado de escisión quirúrgica, tan controvertido (Allen y Mahaffey, 1989) debe ser extenso dejando siempre un amplio margen.

En nuestro estudio no hemos incluido ningún tumor anaplásico, ni tampoco la entidad clínica denominada "mastitis carcinomatosa", que presenta unas características clínicas diferentes a las de los tumores incluidos en el presente trabajo.

La hipertrofia ganglionar observada mediante palpación, es un dato clínico de interés que puede ser el resultado de un estroma inflamatorio tumoral o bien consecuencia de la metastatización del tumor vía linfática. En el último caso, no sólo se manifiesta el aumento de tamaño ya que en nuestro estudio, el aumento de la consistencia ganglionar es un dato constante en la mayoría de los casos con afectación tumoral metastásica confirmada histológicamente.

En los tumores malignos, la ulceración de la piel se ha relacionado con todas aquellas características asociadas a un mal pronóstico como crecimiento rápido, gran tamaño, adherencia a planos profundos y afectación ganglionar. En nuestro estudio, la ulceración, también asociada a un mal pronóstico (Theilen y Madewell, 1987), ha sido la característica clínica con mayor significación maligna.

Ninguna de las características clínicas e histológicas estudiadas ha sido significativamente diferente en los distintos tipos histológicos encontrados.

Para finalizar este capítulo nos gustaría destacar la ulceración de la piel, el tamaño tumoral y la adherencia a planos profundos como indicadores clínicos de malignidad estadísticamente significativos, siendo además datos clínicos fácilmente detectables en la exploración del animal.

Capítulo III
**Análisis del contenido de ADN de los tumores
mamarios caninos mediante citometría de flujo**

INTRODUCCION

Las alteraciones cromosómicas que tienen lugar durante la carcinogénesis, con frecuencia modifican el contenido del ADN de las células tumorales. Estos cambios pueden detectarse mediante citometría de flujo (FCM) (Barlogie y col., 1983), ya que con esta técnica podemos conocer el contenido de ADN nuclear de las células que se encuentran en la fase $G_{0,1}$ del ciclo celular mediante el denominado Índice de ADN (IA). Por otro lado, es posible establecer la proporción de células en fase S del ciclo celular mediante la denominada Fracción de Fase S (SPF) (Merkel y MacGuire, 1990; Vielh y col., 1991).

En este estudio hemos determinado la ploidía del ADN y la fracción de células en fase S mediante citometría de flujo en displasias, tumores mamarios benignos y malignos en la especie canina.

MATERIAL Y METODOS

1. Animales y examen clínico

Hemos empleado 54 perras con edades comprendidas entre 5 y 13 años, con una media de edad de 10 años, que acudieron a las Consultas de la Facultad de Veterinaria de Madrid. En el momento del examen clínico seis perras estaban ovariectomizadas. Respecto a la raza, un 44% eran perras mestizas, mientras que un 56% eran razas puras. La mayor frecuencia de presentación en las razas puras correspondió al pastor alemán (17% del total).

En todos los animales objeto de nuestro estudio realizamos una anamnesis y exploración clínica descritas en el capítulo anterior. El estadio clínico del paciente se estableció utilizando el clásico sistema TNM (Owen, 1980) considerando la afectación ganglionar cuando fue confirmada histológicamente. Este sistema clasifica los animales enfermos en estadio I (local); estadio II (local avanzado); estadio III

(regional); estadio IV (de enfermedad diseminada).

Posteriormente al tratamiento quirúrgico, llevamos a cabo un seguimiento clínico de los animales que consistió en el examen clínico completo, exploración de las glándulas mamarias y ganglios de drenaje y radiografías torácicas, cada 3 meses.

Los animales fueron reseñados mediante el sistema descrito en el apartado anterior.

2. Tratamiento quirúrgico y toma de muestras

Tratamiento quirúrgico

Basándonos en el estadio clínico del tumor, el estado general del animal y la opinión del propietario, se llevó a cabo la resección quirúrgica de las neoplasias en 51 animales, todos ellos libres de metástasis distales desde el punto de vista clínico y radiológico. Las muestras se obtuvieron rápidamente tras la cirugía y fueron procesadas para citometría de flujo e histopatología según se refiere en los próximos párrafos.

Los tumores fueron reseñados mediante el sistema descrito en el apartado anterior.

Obtención de material metastático

Tres animales presentaban un estadio clínico IV (evidencia de metástasis pulmonares), en los que el tumor primario había sido intervenido anteriormente. En 2 de ellos se practicó una cirugía paliativa por lo que solamente analizamos lesiones locales (1 benigna y 1 maligna respectivamente), en el otro caso el tumor se obtuvo después de la necropsia.

En el seguimiento clínico, uno de los animales con un estadio clínico local presentó metástasis pulmonares que fueron posteriormente obtenidas durante la necropsia para su análisis. En otro caso, con estadio local (recidiva local) en el momento de la presentación en nuestras consultas, las muestras obtenidas para citometría de flujo fueron el tumor primario en parafina, operado anteriormente, así

como muestras pulmonares y hepáticas de las metástasis detectadas durante el seguimiento clínico.

Durante la intervención quirúrgica y/o necropsia, en su caso, el tejido tumoral, y en algunos casos tejido mamario sano extirpado, se recogió en hielo picado hasta su posterior seccionado.

Posteriormente, y en un tiempo no superior a media hora, realizamos la partición de los tumores. Las muestras se obtuvieron de zonas del tumor que no presentaban necrosis ni hemorragias y fueron seccionadas en partes de 0,5 cm de diámetro aproximadamente. Una vez cortadas, las muestras se sometieron a congelación rápida en nitrógeno líquido y fueron conservadas a -70° C. De cada tumor se conservaron por término medio 4 piezas.

De la zona adyacente a la toma de muestras anteriormente citada, así como de otras zonas del tumor, se tomaron muestras para el estudio histológico, que se conservaron en una solución de formol tamponado al 10%.

3. Estudio histológico

Las muestras fijadas en formol tamponado se procesaron según técnicas rutinarias del laboratorio de Anatomía Patológica y se incluyeron en parafina.

El diagnóstico histológico se realizó en cortes de 3-4 μm teñidas con hematoxilina-eosina, de acuerdo con la Clasificación de Tumores en Animales Domésticos de la Organización Mundial de la Salud (Hampe y Misdorp, 1974).

Los tumores se clasificaron de acuerdo al tipo histológico predominante en la preparación y, con el fin de relacionar los resultados de la citometría de flujo, fueron denominados heterogéneos u homogéneos dependiendo de la presencia o no de áreas histológicamente diferentes. Asimismo, se determinó la proporción relativa de componentes epitelial, mioepitelial y conjuntivo mediante el cálculo aproximado del porcentaje de tejido ocupado en cada preparación por estos componentes respectivamente.

En todos los tumores malignos analizados se determinó el grado histológico de

malignidad y el grado de malignidad nuclear según la descripción de Misdorp y Hart (1976), estableciéndose tres grados de malignidad histológica y nuclear.

En los casos de afectación mamaria múltiple, hemos considerado como tumores diferentes a aquellos que estaban separados macroscópicamente, aunque fueran del mismo tipo histológico.

Treinta y cuatro perras presentaban displasias y/o tumores benignos; 28 perras presentaban al menos un tumor maligno y 8 de estas 28 perras presentaban a su vez displasias y/o tumores benignos.

4. Citometría de flujo

4.1. Procesado de las muestras

Ochenta y cinco muestras de tumores benignos y malignos primarios así como cinco de metástasis regionales y dos distales fueron descongeladas a 20°C y se trituraron con la ayuda de una cuchilla. Posteriormente, se prepararon suspensiones nucleares en una solución de citrato tamponado, como se describe a continuación:

En 800 ml de agua destilada se disolvieron 85,5 g de sacarosa (250 mM) y 11,76 g de citrato trisódico (40mM) (Merk), posteriormente se añadieron 50 ml de dimetilsulfóxido (Merk) y se añadió agua destilada hasta un volumen total de 1.000 ml ajustándose el pH a 7,6.

Las suspensiones se dispersaron mediante digestión con tripsina, según el método descrito por Vindelov y col. (1983), tratando las muestras con tripsina (T0134, Sigma), inhibidor de tripsina (T9253, Sigma) y ribonucleasa A (R4875, Sigma). Después de la digestión, fueron teñidas con Ioduro de Propidio (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

Con el material tumoral conservado en parafina, se realizaron secciones de la muestra de 50 μm y a partir del tejido desparafinado preparamos la suspensión mediante un tratamiento con pepsina al 0,5% (Sigma No. P7000; Sigma) en solución salina durante 30 minutos y posterior rehidratación en una serie de soluciones de alcohol etílico siguiendo el procedimiento descrito por Hedley y col. (1983).

4.2. Análisis mediante citometría de flujo

El contenido de ADN de las muestras tumorales fue analizado en un citómetro de flujo FACScan (Becton & Dickinson, Mountain View, CA, USA), en el Department of Pathology of the University Medical Centre, Leiden. Para las mediciones se emplearon los filtros estandarizados para la emisión y medición de la fluorescencia del yoduro de propidio. Como líquido de lavado empleamos agua filtrada y desmineralizada.

4.2.1. Estandares

Las suspensiones fueron analizadas con y sin la adición de estandares. Las suspensiones estándar empleadas fueron las siguientes:

Como *estándar externo* se emplearon eritrocitos de pollo en todas las muestras analizadas, que sirvieron de referencia para definir la población diploide de la muestra tumoral, en base a la relación que debe existir entre el pico $G_{0,1}$ de los eritrocitos de pollo, con un contenido de ADN conocido, y el pico $G_{0,1}$ de la población celular considerada como diploide con un Índice de ADN (IA) entre 2.10 y 2.35.

Como *estándar interno* se emplearon células de riñón de perro preparadas a partir de muestras de riñones caninos histológicamente normales, mantenidas en congelación, y cuyas suspensiones se obtuvieron mediante el método de Vindelov (1983). El empleo del estándar interno no fue necesario en todas las muestras, solamente en aquellas en las que aparecían dos picos $G_{0,1}$ en el histograma cuyos Índices de ADN se encontraban en el rango establecido como normal para células diploides de perro (IA: 2.10- 2.35). Si después de la adición del estándar interno uno de los picos incrementa su altura, indica que corresponde a células diploides mientras que el otro es considerado como aneuploide.

4.2.2. Mediciones

Cada suspensión se analizó una media de 2,5 veces (entre una y cuatro veces) y cada análisis incluyó un promedio de 10.000 células.

2 Ante la presencia de resultados diferentes entre dos determinaciones ($n=9$), realizamos una nueva suspensión a partir de la muestra congelada y repetimos los análisis un promedio de 2 veces, para poder establecer la posible heterogenicidad de las muestras tumorales.

4.2.3. Definición de ploidía del ADN

La representación de las suspensiones nucleares mediante citometría de flujo se obtiene en forma de histogramas uni-dimensionales. En un histograma, el número de células teñidas está situado en el eje vertical. La intensidad de fluorescencia es recogida en los diferentes canales del citómetro, que en el histograma están representados en el eje horizontal.

La ploidía del ADN de las células tumorales se determina mediante el *Índice de ADN*, que se define como la relación o el cociente entre el número del canal donde se registra la fluorescencia de la muestra (pico $G_{0,1}$) y el número del canal correspondiente a las células diploides (pico $G_{0,1}$ de los eritrocitos de pollo o estándar externo).

En los análisis realizados con material desparafinado, la presencia de dos picos $G_{0,1}$ en el histograma se considera por definición (Rutteman y col, 1988) como **hiperploidía**, considerando el pico situado en la izquierda del histograma como el correspondiente a la población celular diploide.

Los tumores en cuyos histogramas aparece un solo pico $G_{0,1}$ y cuyos Índices de ADN resultaron, por tanto, iguales a 1.00 se consideran diploides. Los tumores en los que aparecen poblaciones celulares cuyos IA son distintos de 1.00 se consideran aneuploides.

A su vez, las poblaciones aneuploides y por tanto los tumores aneuploides, se han clasificado en función de su IA en:

a) Población hipoploide, cuando presenta un IA inferior a 0.96. Si la población era significativa con respecto al número total de células analizadas, el tumor fue considerado como hipoploide.

b) Población hiperploide, cuando presenta un IA superior a 1.04. Si era significativa, el tumor fue considerado como hiperploide.

c) Población tetraploide, cuando presenta un IA en el rango de 1.90- 2.10, clasificándose el tumor como tetraploide si la población era significativa.

Cuando en un histograma se identificaron más de una población celular significativa aneuploide el tumor fue considerado como multiplóide.

4.2.4. Determinación de la fracción de células en fase S (SPF)

Hemos determinado la fracción de células en fase S en 72 tumores benignos y malignos.

Para ello empleamos el programa MODFIT, que estima la SPF en el histograma como la raíz cuadrada del área del rectángulo entre el pico $G_{0,1}$ y el pico G_2 (Bagwell, 1989). En los tumores diploides cabe esperar que la presencia de células normales interfiera en el cálculo de la SPF. En los tumores aneuploides de la especie canina, los picos aneuploides suelen localizarse cercanos al pico diploide, por lo que también en ocasiones pueden contener células normales. Con el fin de poder comparar conjuntamente tumores diploides y aneuploides de una forma lo más homogénea posible, en los tumores aneuploides, hemos calculado la SPF total, es decir la correspondiente a la población aneuploide y a la diploide, excepto en dos tumores en los que empleamos la SPF correspondiente a la población celular predominante (> 80%) ya que la población celular restante era muy pequeña y el valor de SPF era difícil de estimar.

La fracción de fase S fue determinada manualmente en 5 casos, debido a la presencia de escotaduras a nivel de la transición de $G_{0,1}$ y la fase S, detritos o

dobletes de los estándares que alteraba el cálculo del programa.

Para la comparación de los resultados de la fase S y las variables clínicas e histológicas los tumores fueron clasificados en dos grupos, diploides versus aneuploides. Esta clasificación se realizó debido a que en los tumores aneuploides, el cálculo de SPF lógicamente es más difícil que en los diploides y menos preciso.

4.3. Análisis estadístico

Para conocer si las diferencias encontradas entre los grupos eran estadísticamente significativas se emplearon las pruebas del Chi² y de Fisher. Las diferencias entre las medianas de las variables cuantitativas fueron estudiadas estadísticamente mediante la prueba de Wilcoxon. Consideramos que las diferencias eran significativas cuando los valores obtenidos de P eran menores o iguales a 0,05.

RESULTADOS

1. Distribución de la ploidía del ADN en los tumores mamarios caninos

1.1. Generalidades

De las 85 muestras tumorales analizadas hemos obtenido resultados óptimos en 83, ya que en dos tumores benignos los histogramas fueron desechados. Por otro lado, un tumor mixto benigno y una metástasis ganglionar de un carcinoma de células fusiformes fueron eliminados del estudio debido a que la proporción de células tumorales presentes en el corte histológico era reducida (<10%) .

Por tanto, en un total de 82 tumores obtenidos de 53 casos los resultados fueron incluidos en el estudio. Estos tumores fueron clasificados en dos grupos:

A) Displasias y tumores benignos. En este grupo se incluyeron 49 displasias y tumores benignos, así como tumores de malignidad celular "borderline" obtenidos de 33 perras.

B) Tumores malignos. Formado por 33 tumores primarios obtenidos de 28 casos, incluyendo el tumor primario cuya muestra fue conservada en parafina (caso C019). En este caso, así como en el C021 (**figuras 2 y 3**) se analizaron las metástasis distales hepáticas y pulmonares. En el C019, el IA fue 1.49 en el tumor primario y 1.42 en hígado y pulmón respectivamente. En el C021, el IA en el tumor primario fue 1.0, mientras que en las metástasis pulmonares aparecidas durante el seguimiento fue 1.5.

Como indicativo de la validez del análisis citométrico hemos obtenido unos coeficientes de variación de los picos $G_{0,1}$ de las células diploides en 200 análisis de $2,5 \pm 0,08$ (valor de la media \pm error estandard) y de $3,4 \pm 0,18$ en las células aneuploides obtenido en 53 análisis.

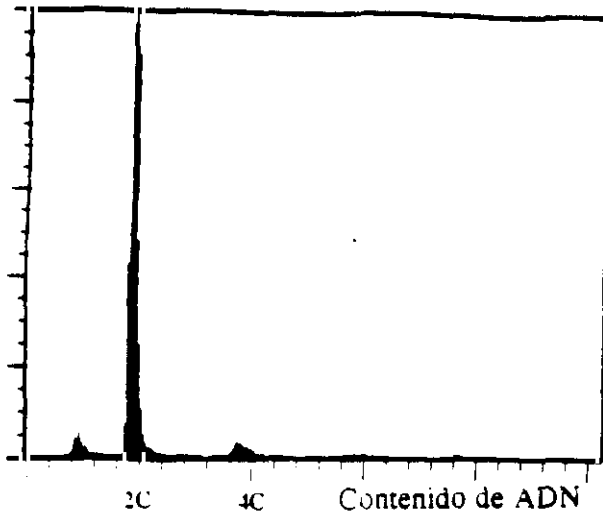


Fig. 1. Histograma de un tumor mixto benigno e hiperplasia lobular. Diploide. Caso n°: CO8 L1

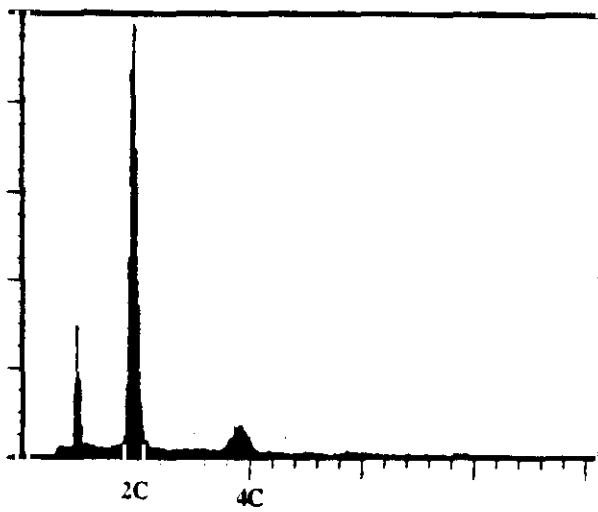


Fig. 2. Histograma de un carcinoma de células fusiformes. Diploide. Caso n°: CO21 L5

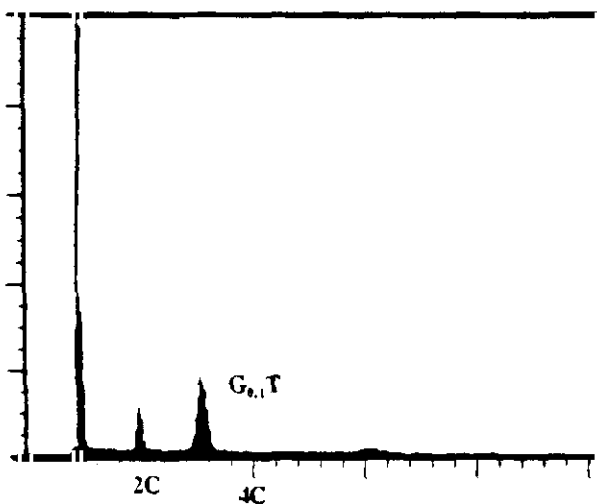


Fig. 3. Histograma de la metástasis pulmonar del tumor anterior. Aneuploide: hiperploide (IA:1.5).

1.2. Distribución de la ploidía del ADN

A) Displasias y tumores benignos

En cuarenta y nueve lesiones analizadas 7 presentaron poblaciones celulares aneuploides, lo que supone una frecuencia de aneuploidía del 14,3 %. En la **tabla 1** se muestra la distribución de los Indices de ADN (IA) en las 7 lesiones benignas aneuploides.

Nº de Caso/Lesión	TIPO HISTOLOGICO	IA
CO8 R4	Hiperplasia lobular	1.08
CO11 L5	Adenoma complejo	0.94
CO15 L4	Mixto benigno	1.08
CO31 L3	Adenoma complejo	1.21
CO50 R2	Adenoma complejo	1.65
CO60 R3	Mixto benigno	1.26
CO61 R4	Hiperplasia lobular	1.12

Tabla 1. Grado de aneuploidía en los tumores benignos aneuploides.

B) Tumores malignos

Del total de 33 tumores malignos primarios, 16 han sido aneuploides, siendo la frecuencia de aneuploidía del 48,5%

La incidencia de aneuploidía ha sido significativamente superior en los tumores malignos con respecto a los benignos ($P < 0,001$).

Tres neoplasias malignas se consideraron multiploides debido a la presencia de dos o más picos aneuploides en el histograma. En uno de estos 3 tumores (C059) (**figura 9**) el pico hiperploide presentaba el doble contenido de ADN que el pico hipoploide (0.74 y 1.44).

Cinco tumores malignos presentan picos hipoploides, con los siguientes Indices de ADN: C01 R5 (**figura 4**), IA: 0.83; C03 L5, IA: 0.79; C034 R3, IA: 0.93; C059 L2 (**figura 9**), IA: 0.74 y C066 L2-4 (**figura 5**), IA: 0.8.

Seis tumores aneuploides presentan Indices de ADN próximos a la diploidía, entre 1.09 y 1.2: C02 R2-3, IA: 1.14; C04 L5, IA: 1.10; C08 R2, IA: 1.05, 1.14; C09 R3, IA: 1.10; C024 L5 (**figura 7**), IA: 1.26 y C057 L3, IA: 1.12.

Cuatro tumores tuvieron picos hiperploides: C019 R4, IA: 1.49; C028 L4 (**figura 8**), IA: 1.40, 1.85; C050 R5 (**figura 6**), IA: 1.57; C059 L2, IA: 1.44.

Dos tumores fueron tetraploides al presentar picos aneuploides con IA próximos a 2, C052 R5, IA: 1.99 y C015 R5, IA: 2.23.

En la **figura 10** se representa la distribución de los Indices de ADN en 33 tumores malignos analizados.

C) Ploidía del ADN en neoplasias múltiples

En 20 casos se presentaron tumores múltiples, considerados como lesiones primarias diferentes en base a las características clínicas e histopatológicas.

Hemos observado que en nueve de estos casos, los IA de los distintos tumores diferían entre sí. Tres de estos nueve casos presentaban sólo tumores benignos, otros tres animales tenían benignos y malignos conjuntamente y tres perras tenían malignos solamente. En otros dos casos, los IA de una lesión proliferativa benigna y de un tumor maligno concurrente fueron muy parecidos (1.65 y 1.57 y 1.08 y 1.05 + 1.14, respectivamente).

Los nueve casos restantes con tumores múltiples, fueron diploides, cinco animales tuvieron tumores benignos, tres casos presentaban benignos y malignos y un caso malignos exclusivamente.

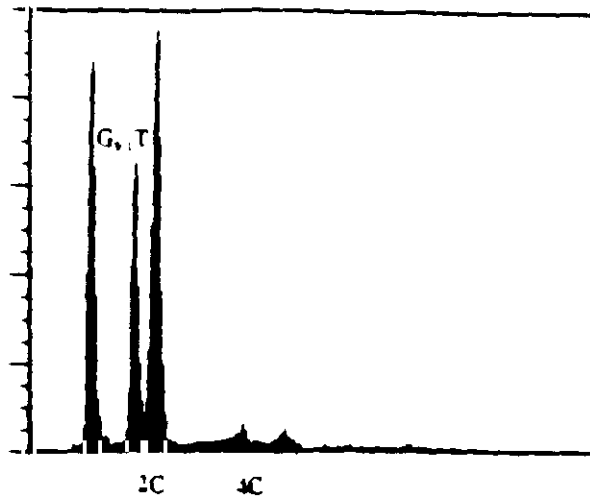


Fig 4. Histograma de un adenocarcinoma tubular simple.
Aneuploide: hipoploide (IA: 0.83). Caso n°: CO1 R5

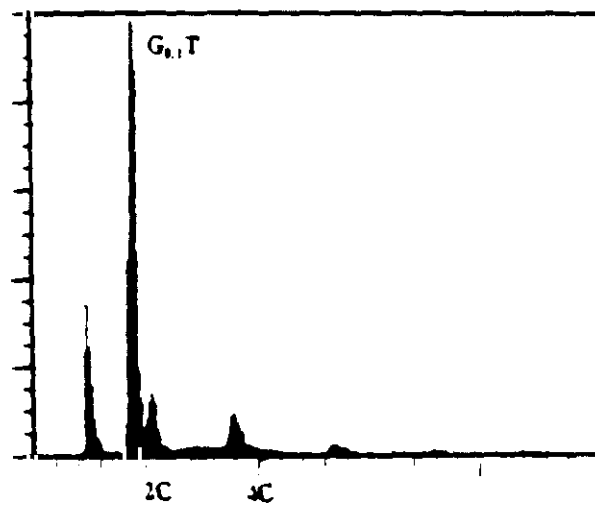


Fig 5. Histograma de un adenocarcinoma tubular simple.
Aneuploide: hipoploide (IA: 0.8). Caso n°: CO66 L2.

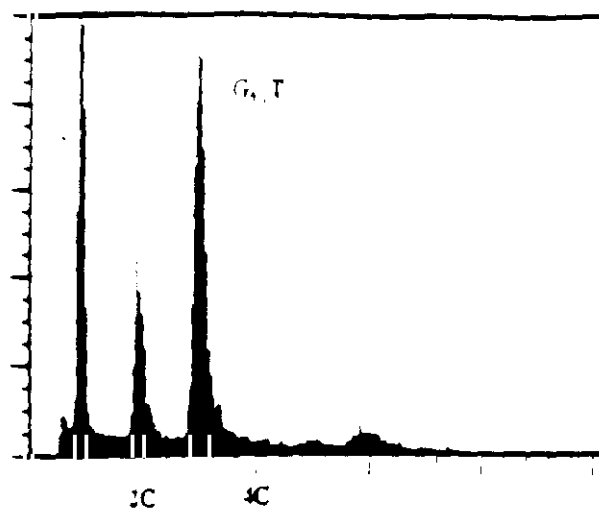


Fig 6. Histograma de un adenocarcinoma tubular simple.
Aneuploide: hiperploide (IA: 1.57). Caso n°: CO50 R5.

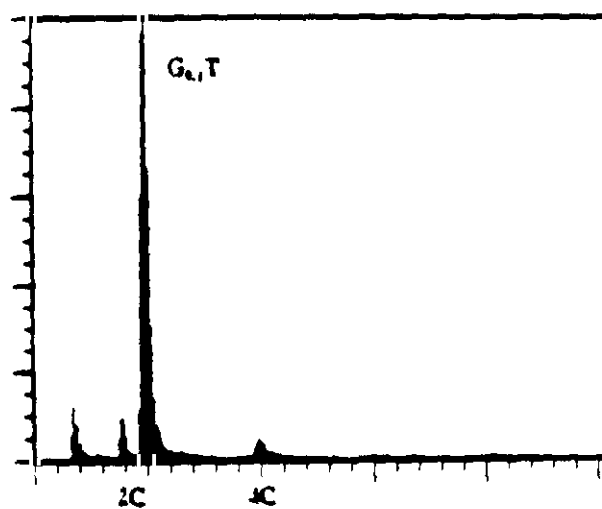


Fig 7. Histograma de un carcinoma sólido simple.
Aneuploide: hiperploide (IA: 1.26). Caso n°: CO24 L5.

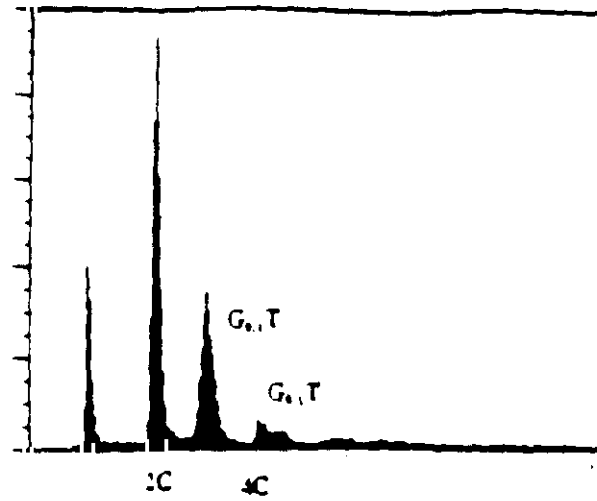


Fig 8. Histograma de un adenocarcinoma tubular complejo.
Aneuploide: multiploide (IA₁: 1.40; IA₂: 1.85). Caso n°: CO28 L4.

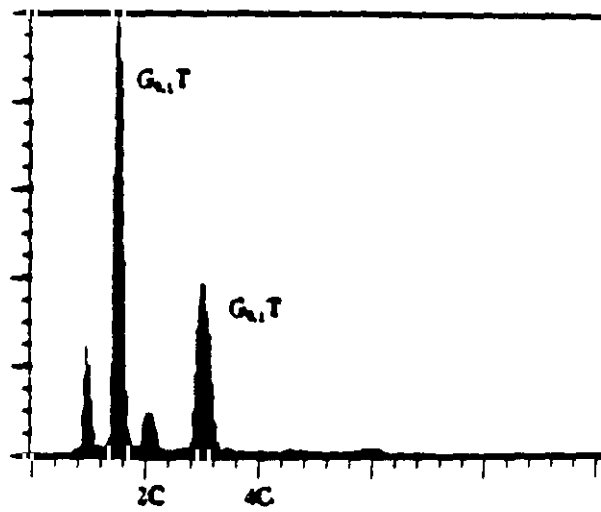


Fig 9. Histograma de un carcinoma sólido simple.
Aneuploide: tetraploide (IA₁: 0.74; IA₂: 1.44). Caso n°: CO59 L2.

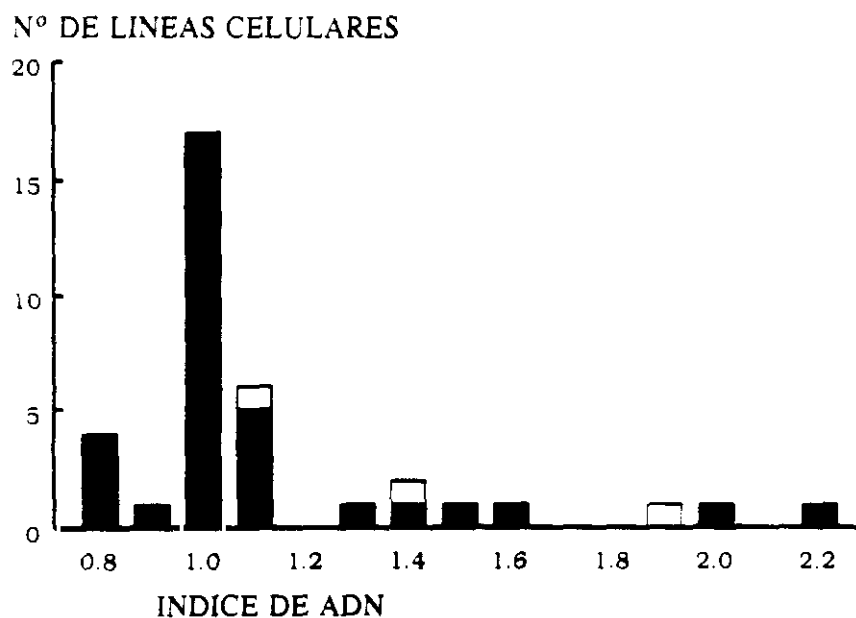


Figura 10. Distribución de los IA en 33 tumores malignos analizados

1.3. Relación de la ploidía del ADN con el estadiaje clínico

A) Displasias y tumores benignos

No hemos encontrado una relación estadísticamente significativa entre el contenido de ADN celular y el tamaño del tumor.

Cinco de los 7 casos que presentaban tumores benignos aneuploides, presentaban a su vez otros tumores malignos mamarios y no mamarios, un carcinoma ovárico, un tumor venéreo transmisible y carcinomas en otras glándulas mamarias.

En la **tabla 2** se muestra la distribución de la ploidía del ADN en displasias y tumores benignos en relación al tamaño tumoral.

	Tamaño	Nº de tumores	Diploides	Aneuploide
B E N I G N O S	T1	25	21	4
	T2	10	8	2
	T3	14	13	1
	TOTAL	49	42	7
M A L I G N O S	T1	14	10	4
	T2	7	2	5
	T3	12	5	7
	TOTAL	33	17	16

Tabla 2. Distribución de la ploidía del ADN en relación al tamaño tumoral en 49 displasias y tumores benignos y en 33 tumores malignos primarios.

B) Tumores malignos

B.1. Ploidía en relación con el estadio clínico

De un total de 28 casos en los que se analizaron tumores malignos, la distribución de la ploidía en relación al estadio clínico en el momento del diagnóstico ha sido la siguiente:

1. Estadio local: 22 casos presentaban un estadio clínico local. De los 27 tumores analizados de estos casos, 13 fueron aneuploides y 14 diploides.

2. Estadio local avanzado: Ningún caso presentaba un estadio local avanzado.

3. Estadio regional: Cinco casos tuvieron un estadio clínico regional. Se analizaron 5 tumores y 3 de ellos resultaron aneuploides.

4. Estadio de enfermedad diseminada: En los casos que presentaban enfermedad diseminada en la primera consulta, no se obtuvo material metastásico. Solamente en un caso en el que mediante cirugía paliativa del tumor mamario existente en el momento de presentación en la consulta, se analizó dicha neoplasia maligna que fue aneuploide con un Índice de ADN de 1.26.

B.2. Ploidía en relación al tamaño tumoral

De los 33 tumores malignos primarios analizados 14 presentaban un tamaño T1, de ellos 10 resultaron diploides y 4 aneuploides. Siete tumores fueron T2 y de ellos 2 eran diploides y 5 aneuploides. El número total de tumores T3 fue 12, 5 diploides y 7 aneuploides. En la **tabla 2** se muestra la distribución de la ploidía del ADN en los tumores malignos en relación al tamaño tumoral.

No hemos encontrado una relación estadísticamente significativa entre el Índice de ADN y el tamaño tumoral. Mediante la pruebas de Chi² y de Fisher se obtuvo una $P > 0,05$.

1.4. Relación de la ploidía del ADN con las características histológicas

A) Displasias y tumores benignos

Hemos observado poblaciones celulares aneuploides en 7 displasias y tumores benignos.

Ocho tumores de este grupo fueron heterogéneos histológicamente, mientras que sus contenidos de ADN fueron homogéneos al no presentar poblaciones celulares con diferente ploidía del ADN.

Dos tumores presentaron diferentes patrones de ploidía en las diversas mediciones realizadas con cada muestra y fueron considerados heterogéneos en su contenido de ADN. Sin embargo, estos 2 tumores eran histológicamente homogéneos. Por otro lado, otro tumor presentaba una población celular diploide y una aneuploide, mientras que histológicamente era homogéneo.

La **tabla 3** muestra la distribución de la ploidía del ADN en las displasias, tumores benignos y tumores "borderline".

Señalamos finalmente que en el grupo de displasias y tumores benignos no se observaron diferencias significativas en la ploidía del ADN según el tipo histológico.

	Tipo histológico	Nº de tumores	Diploide	Aneuploide
Displasias	Papilomatosis ductal	1	1	
	Hiperplasia lobular	5	3	2
Tumores mamarios benignos	Adenoma complejo	21	18	3
	Fibroadenoma	2	2	
	Tumor mixto benigno	16	14	2
	Angioma	2	2	
Tumores "borderline"	Tumor mixto benigno	2	2	
	Total	49	42	7

Tabla 3. Distribución de la ploidía del ADN en relación al tipo histológico en 49 displasias y tumores benignos.

B) Tumores malignos

B.1. Ploidía del ADN en relación al tipo histológico

Dieciséis de 33 tumores malignos primarios analizados presentaban poblaciones celulares aneuploides.

Seis de 11 adenocarcinomas tubulares estudiados fueron aneuploides. Los dos carcinomas sólidos incluidos en el estudio fueron aneuploides, uno de ellos tuvo un pico con un IA de 1.26 y el otro fue considerado multiploide pues presentó dos picos con Indices de ADN respectivamente de 0.74 y 1.44.

Los carcinomas de células fusiformes analizados ($n = 2$) han sido diploides. Uno de estos tumores (C021) metastató a nivel pulmonar 3 meses después de la intervención quirúrgica, presentando las metástasis un Índice de ADN de 1.58. Histológicamente las metástasis fueron heterogéneas, observándose áreas de carcinoma de células fusiformes y fibrosarcomatosas.

Siete tumores malignos presentaban heterogeneidad en el contenido de ADN. En seis de estos casos, al realizar varias mediciones de diferentes suspensiones, se identificaron picos aneuploides $G_{0,1}$ de pequeño tamaño pero significativos además de un pico diploide. De estos 6 tumores, 3 fueron heterogéneos histológicamente. El caso restante, un tumor primario que afectaba a varias glándulas mamarias, presentó diferente ploidía en las mediciones realizadas en las diversas áreas del tumor, con Índices de ADN de 1.0 y 2.23 respectivamente.

En la **tabla 4** se muestra la distribución de la ploidía en los diferentes tumores malignos estudiados.

No hemos encontrado diferencias significativas en la ploidía del ADN entre los diferentes tipos histológicos.

Tipo histológico	Nº de tumores	Diploides	Aneuploides
Carcinoma "in situ"	5	3	2
Adenocarcinoma tubular	11	5	6
Adenocarcinoma papilar	4	2	2
Carcinoma sólido	2		2
Carcinoma de células fusiformes	2	2	
Sarcoma	4	2	2
Tumor mixto maligno	5	3	2
Total	33	17	16

Tabla 4. Incidencia de aneuploidía en 33 tumores malignos primarios.

B.2. Ploidía del ADN en relación al grado histológico y grado nuclear de malignidad

En los tumores malignos hemos observado que a medida que el grado histológico de malignidad y el grado nuclear aumentan, se incrementa la proporción de aneuploidía del ADN, aunque esta relación no es estadísticamente significativa. La **tabla 5** muestra la distribución de la ploidía en los tumores malignos en relación al grado histológico de malignidad y al grado nuclear.

Grado histológico de malignidad	Nº de tumores	Diploide	Aneuploide
I	9	6	3
II	12	6	6
III	12	7	5
Grado nuclear	Nº de tumores	Diploide	Aneuploide
I	4	3	1
II	16	10	6
III	13	6	7

Tabla 5. Distribución de la ploidía del ADN en relación al grado histológico de malignidad y al grado nuclear.

1.5. Análisis de la ploidía del ADN en las metástasis

En un caso (C021) el contenido de ADN del tumor primario y de las metástasis aparecidas durante el seguimiento fue diferente; mientras el tumor primario era diploide, las metástasis pulmonares presentan un IA de 1.5. Por el contrario, en el caso C02, la ploidía de las metástasis ganglionares fue similar a la del tumor primario al ser los IA 1.14 y 1.10 respectivamente. En el C015 la ploidía del tumor primario era heterogénea, siendo los Indices de ADN de 1.0 y 2.23 y las metástasis ganglionares tuvieron un IA de 2.28.

Una de las metástasis analizadas (C021) era heterogénea histológicamente aunque la ploidía del ADN, valorada en diferentes mediciones, fue siempre la misma. En el resto de metástasis analizadas el contenido de ADN fue homogéneo (C02, C015, C019).

2. Determinación de la fracción de células en fase S (SPF)

2.1. Generalidades

Hemos calculado la fracción de células en fase S en 72 tumores. Los valores de esta serie de neoplasias tienen una distribución no normal por lo que los datos presentados son las medianas y los rangos de valores.

Por término medio, el valor de SPF es mayor en 27 tumores malignos (mediana: 7,3%, rango: 2,1-18,5%) que en 45 tumores benignos (mediana: 4,7%, rango: 1,6-14,7%), siendo esta diferencia significativa cuando incluimos los valores de los tumores diploides y aneuploides conjuntamente ($P < 0,05$). Al comparar solamente neoplasias diploides la diferencia entre malignos y benignos no fue estadísticamente significativa.

A) Displasias y tumores benignos

Hemos calculado el valor de SPF en 45 displasias y tumores benignos, ya que en 4 neoplasias no pudo determinarse debido a que en el histograma aparecían picos $G_{0,1}$ asimétricos o dobletes de los estándares.

De este grupo 41 tumores fueron diploides, siendo el valor medio de SPF 4,7% con un rango de 1,6% a 14,7%. Cuatro fueron aneuploides, con un valor medio de SPF total de 5,8% y con un rango de 3,5% a 8,1%. Este valor medio fue mayor que el correspondiente a los diploides, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

B) Tumores malignos

La proporción de células en fase S ha sido determinada en 27 tumores malignos, ya que en 6 neoplasias no pudo calcularse debido a la presencia en el histograma de picos $G_{0,1}$ asimétricos, dobletes, o a la presencia de multiploidía, así como una elevada población G_2 solapándose en la zona correspondiente a la fase S.

Quince tumores fueron diploides, con un valor de SPF de 4,1% y un rango de 2,1% a 11,7%

Doce tumores fueron aneuploides, siendo el valor de SPF de 8,2% con un rango de 3,8% a 18,5%.

El valor medio de SPF en los tumores malignos aneuploides fue superior al correspondiente a los diploides, siendo el número de diploides benignos muy pequeño para poder establecer la importancia estadística de dicha diferencia.

2.2. Relación de la SPF con el estadiaje clínico

A) Displasias y tumores benignos

En este grupo de neoplasias hemos observado que a medida que el tamaño tumoral aumenta, se incrementa el valor de SPF del tumor. Sin embargo; esta tendencia no resultó significativa estadísticamente.

B) Tumores malignos

B.1. SPF en relación al estadio clínico

Estadio clínico local Al tener en cuenta todos los tumores malignos, aneuploides y diploides, hemos observado que en un total de 22 tumores malignos obtenidos de 19 casos que presentaban un estadio clínico local, la mediana de SPF es de 4,8% con un rango de 2,1% a 13,6%

Estadio clínico regional De cinco casos que presentaban un estadio regional, se analizaron cinco tumores, cuya mediana de SPF es 9,6% con un rango de 8,2% a 18,5%. La diferencia entre los valores de SPF de los tumores con estadio local y estadio regional es estadísticamente significativa ($P < 0,05$).

B.2. SPF en relación al tamaño tumoral

En 25 tumores malignos primarios el valor de SPF se incrementa al aumentar el tamaño del tumor, aunque esta relación no alcanza el nivel de significación estadística.

En la **tabla 6** se muestra la distribución de los valores de SPF en relación al tamaño tumoral en los tumores benignos y malignos.

	Tamaño	Nº tumores	SPF (%)	Rango
Displasias y tumores benignos	T1	23	4,6	1,6-8,1
	T2	10	3,5	2,6-12,1
	T3	12	5,7	1,8-14,7
Tumores malignos	T1	11	4,8	2,1-11,7
	T2	6	4,1	3,1-18,5
	T3	10	9	3,3-13,6

Tabla 6. Distribución de los valores de la fase S en relación al tamaño tumoral en 45 displasias y tumores benignos y en 27 malignos.

2.3. Relación de la SPF con las características histológicas

A) Displasias y tumores benignos

El adenoma complejo y la hiperplasia lobular son los tipos histológicos que con mayor frecuencia presentaron valores bajos de fracción de fase S, mientras que las dos papilomatosis analizadas tuvieron valores elevados de fase S. Sin embargo, la relación entre el tipo histológico y el valor de SPF no es estadísticamente significativa.

En los casos en los que la fracción de fase S fue calculada en diferentes zonas del mismo tumor, los valores de dichas mediciones fueron similares. Así, en un tumor mixto benigno los valores de SPF fueron 1,5%, 1,5% y 3,6% y en un adenoma complejo de 8,2% y 6,1%, respectivamente.

B) Tumores malignos

Aunque se obtuvieron valores elevados de SPF en determinados tipos histológicos, por ejemplo en los carcinomas sólidos, la relación entre el valor de SPF y determinados tipos tumorales no ha sido significativa.

Asimismo, el grado de malignidad nuclear no se correlacionó de manera estadísticamente significativa con el valor de SPF; sin embargo, el grado histológico de malignidad se correlacionó significativamente con dicho valor ($P < 0,05$). La **tabla 7** muestra la distribución de SPF en relación al grado histológico de malignidad y al grado de malignidad nuclear.

Grado histológico de malignidad	Nº de tumores	SPF (%)	Rango
I	7	3,8	2,7-8,2
II	10	7,8	2,1-18,5
III	10	8,2	2,5-13,6
Grado nuclear	Nº de tumores	SPF (%)	Rango
I	4	4,4	3,0-5,8
II	11	8,2	2,1-18,5
III	12	7,8	2,5-13,6

Tabla 7. Distribución de los valores de SPF total en relación al grado histológico de malignidad y al grado nuclear en 27 tumores malignos.

En tres tumores malignos metastáticos hemos calculado la fracción de fase S en el tumor primario y en la metástasis. En el caso C02, el valor de SPF ha sido **similar** en el tumor primario y en la metástasis ganglionar; en el caso C021, en el **tumor primario** fue 8,2% mientras que en la metástasis pulmonar 17,2%. En el otro caso (C015), el valor de SPF en la metástasis ganglionar y en el tumor mamario adyacente fue 9% mientras que en las masas tumorales que afectaban a las otras glándulas distales al ganglio, el valor fue diferente (7,4% y 2,8%).

DISCUSION

Como mencionamos anteriormente, durante los procesos de transformación y progresión tumorales se producen con frecuencia cambios cuantitativos en el genoma celular. Una pérdida o ganancia de ADN del 5% puede ser detectada mediante citometría de flujo empleando material congelado, mientras que si el material empleado está incluido en parafina la sensibilidad de esta técnica es menor (Merkel y MacGuire, 1990; Rutteman y Cornelisse, 1991).

Como primera conclusión de este estudio, señalamos que hemos encontrado una mayor incidencia de aneuploidía en tumores malignos que en benignos. La incidencia de aneuploidía en tumores malignos observada en nuestro estudio es del 48,5%, que coincide con lo señalado en otros trabajos realizados con tumores mamarios caninos conservados en congelación: 52% (Hellmén y col., 1988) y 62% (Rutteman y col., 1988). Por el contrario, nuestros resultados no coinciden con los obtenidos en un trabajo realizado con tumores conservados en parafina, en el que la incidencia de aneuploidía en tumores malignos fue de un 31% (18/58) y además los 14 tumores benignos analizados fueron diploides (Scanziani y col., 1991). La diferencia entre los resultados de Hellmén y col. (1988), Rutteman y col. (1988) y los nuestros frente a los obtenidos por Scanziani y col. (1991) puede deberse a que la citometría de flujo con material en parafina ofrece resultados menos fiables que con material congelado (Rutteman y Cornelisse, 1991). Por otro lado, el grado de desviación de los Índices de ADN observado en los tumores mamarios caninos es relativamente pequeño en comparación al observado en el cáncer de mama de la mujer (Hellmén y col., 1988; Rutteman y col., 1991), lo que aumenta la posibilidad de error en la clasificación de los tumores al emplear la técnica con material conservado en parafina, siendo ésta no demasiado precisa.

En tumores benignos, displasias y tumores "borderline" hemos encontrado una incidencia de aneuploidía de 14,3%, que coincide con el 17,4% (Rutteman y col., 1988) y 27% (Hellmén y col., 1988) obtenidos anteriormente con citometría de flujo

en tumores mamarios caninos. Esta incidencia es mayor al 1% observado en el cáncer de mama en la mujer (Beerman, 1991). Esta diferencia se podría explicar si tenemos en cuenta que mediante citometría de flujo pueden detectarse determinados cambios en el ADN, cambios potencialmente malignos, en tumores mamarios de la especie humana que no poseen todavía características histológicas de malignidad (Cardiff y col., 1977). En el caso de los TMC, este potencial maligno podría manifestarse si dichas lesiones permanecen sin ser extirpadas quirúrgicamente (Gilbertson y Kurtzman., 1983). Sin embargo, no se ha encuadrado ningún tipo tumoral en concreto como lesión premaligna ni en la especie humana (van den Vijver, 1993) ni en la canina (Misdorp, 1987), con la excepción de los carcinomas no invasivos en la especie humana.

Hemos encontrado poblaciones celulares hipoploides en 5 de 33 tumores malignos primarios y en 1 de 49 displasias y tumores benignos. Nuestros resultados son similares a los obtenidos en otros estudios realizados en tumores mamarios caninos (Hellmén y col., 1988; Rutteman y col., 1988). Por el contrario, la presencia de hipoploidía en el cáncer de mama en la mujer es muy infrecuente, siendo el valor promedio observado en 12 estudios del 2% (Frierson, 1991). Esta diferencia puede indicar que la evolución de la ploidía tumoral de los tumores mamarios es diferente en la mujer que en la especie canina. En la mujer la pérdida de material cromosómico no suele dar lugar a hipoploidía detectada mediante citometría de flujo, aunque sí puede ser detectada mediante análisis citogenético incluso en tumores aparentemente diploides; asimismo, la mayoría de los tumores aneuploides cuando son clínicamente evidentes ya han pasado los procesos de poliploidización y pérdida de cromosomas (Dutrillaux y col., 1991).

Es posible, y de acuerdo con Rutteman y col. (1988), que el cariotipo canino constituido por 78 cromosomas, durante los procesos de carcinogénesis y progresión tumorales pueda sufrir pérdidas de material cromosómico sin que la célula sea inviable. La menor repercusión de las pérdidas cromosómicas en la especie canina se podría explicar si se considerase válida la hipótesis de que los genes que codifican

algunas funciones vitales celulares estan distribuidos de forma más dispersa en el perro que en el hombre (Rutteman y col., 1988). Asimismo, los oncogenes supresores, que son inactivados en el proceso de carcinogénesis en dos etapas (Férno y col., 1992), podrían tolerar en el perro más lesiones cromosómicas sin llegar a ser inactivados (Rutteman y col., 1988).

Además, la distribución de los Indices de ADN de las poblaciones tumorales en el cáncer de mama en la mujer es de tipo bimodal, con un agrupamiento de poblaciones celulares en la región diploide y un segundo agrupamiento en la región hipotetraploide (Merkel y McGuire, 1988; Beerman y col., 1990; Fernö y col., 1992). Por el contrario, en nuestro estudio y de acuerdo con Rutteman y col. (1988) y Hellmén y col. (1988) la desviación de los Indices de ADN aneuploides de la región diploide es muy limitada y no se observa el agrupamiento de poblaciones celulares en la región hipotetraploide.

En nuestro estudio tres tumores malignos presentaban multiploidía y sólo en uno de estos tumores el valor del segundo pico aneuploide fue el doble del primero, lo que indica que la segunda línea celular puede haberse generado mediante poliploidización (Hiddeman y col., 1986).

Por tanto, podemos establecer que la evolución de la ploidía en los tumores mamarios caninos difiere de la del cáncer de mama en la mujer, donde se ha demostrado que un mecanismo frecuente en la transformación maligna es la poliploidización seguida de la pérdida de cromosomas (Shackney y col, 1989).

Al igual que otros autores (Hellmén y col., 1988; Rutteman y col., 1988) en tumores mamarios caninos, no hemos encontrado diferencias significativas en la ploidía del ADN en tumores de diferente tamaño, ni tampoco entre tumores que habían metastatizado a nivel regional y tumores que presentaban un estadio local. En la mujer, los resultados obtenidos a este respecto son contradictorios (Frierson, 1991).

Asimismo, no aparecieron diferencias significativas en la ploidía entre tumores de diferente tipo histológico o diferentes grados de malignidad nuclear, lo que

coincide con lo descrito anteriormente por Rutteman y col. (1988). Por el contrario, en la mayoría de los estudios realizados en el cáncer de mama en la mujer se señala que los tumores con un elevado grado de malignidad histológica, medida en base al grado de polimorfismo nuclear (Frierson, 1993), presentan mayor incidencia de aneuploidía y alejamiento de la zona diploide (Frierson, 1991). En los tumores aneuploides caninos el grado de desviación de la zona diploide es mínimo quizá debido a que el polimorfismo nuclear es mucho menor que en el cáncer de mama en la mujer.

En 3 de 49 displasias y tumores benignos y en 13 de 33 tumores malignos primarios hemos encontrado una heterogeneidad en el contenido de ADN entre diferentes poblaciones celulares de un mismo tumor. Dentro de estas lesiones consideradas como heterogéneas hemos incluido los 3 tumores multiploides mencionados anteriormente. En otros 9 tumores, aparecieron diferencias entre las ploidías registradas en diferentes bloques de tejido de la misma lesión. Asimismo fueron considerados heterogéneos en el contenido de ADN 4 tumores en los que no había concordancia entre la proporción de células tumorales en el corte histológico y la proporción de células aneuploides detectadas mediante citometría de flujo, por lo que la presencia de ambas poblaciones, aneuploide y diploide en el mismo tumor se consideró muy probable.

Este último tipo de heterogeneidad del ADN es muy importante puesto que si de cada tumor se analiza solamente una muestra, existe el riesgo de no detectar todas las poblaciones celulares presentes en el tumor. En el cáncer de mama de la mujer este tipo de heterogeneidad ha sido observada en 14 de 44 tumores (Beerman y col, 1991).

En nuestro trabajo la heterogeneidad en el contenido de ADN no está relacionada con la presencia de diferentes tipos histológicos o heterogeneidad histológica, ya que sólo en tres tumores malignos se ha observado que coincidan estos dos hechos. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en tumores mamarios de la mujer y de la perra (Erhardt y Auer, 1986; Rutteman y col, 1988;

Hellmén y col, 1988).

Por otro lado, cabe destacar que en los casos con neoplasias múltiples, el encontrar IA similares, es decir con una desviación menor de un 10% de diferencia, en distintos tumores de un mismo animal puede indicar, aunque no probar, que los tumores tienen un origen común.

Cabe señalar que la determinación de la fracción de células en fase S (SPF) es difícil en ocasiones, debido a que la presencia de detritos nucleares, dobletes procedentes de las células estándar empleadas, picos $G_{0,1}$ asimétricos o múltiples picos próximos unos a otros, complican y dificultan el cálculo.

En los tumores aneuploides en los que el valor de SPF corresponde a la fracción diploide y a la aneuploide, hemos empleado la SPF total para no introducir el error que produciría el incluir a las células normales en los tumores diploides y no en los aneuploides. Siguiendo este criterio hemos encontrado que los valores de SPF son diferentes estadísticamente en los tumores diploides con respecto a los aneuploides. Sin embargo, hay que señalar que si nuestro propósito fuese estudiar exclusivamente tumores aneuploides y compararlos con otras características como por el ejemplo el pronóstico sería preferible emplear la SPF aneuploide exclusivamente.

En los tumores malignos, el valor de SPF es significativamente mayor en los aneuploides que en los diploides, coincidiendo con lo observado en otros estudios en tumores mamarios de la especie canina (Hellmén y col., 1993) y en el hombre (Frierson, 1991). El elevado valor de SPF de los tumores malignos aneuploides es la causa de la diferencia en el valor de SPF entre tumores malignos y benignos, ya que al tener en cuenta sólo los tumores diploides, la diferencia entre los tumores malignos y los benignos no fue significativa.

En los tumores malignos del presente trabajo, el valor de SPF se relaciona con la afectación ganglionar y el tamaño tumoral, aunque con este último no de una forma estadísticamente significativa. Los valores más elevados de SPF corresponden a tumores de elevado grado de malignidad de forma estadísticamente significativa. Sin embargo no encontramos una relación estadística entre SPF y el tipo histológico.

En un trabajo recientemente publicado con tumores mamarios caninos se señala que, valores elevados de SPF se relacionan de manera independiente con un pronóstico adverso (Hellmén y col., 1993). Hemos de señalar que en el cáncer de mama en la mujer la aneuploidía del ADN se relaciona con un mal pronóstico y varios autores señalan que ello es debido en realidad a la correlación que existe entre la aneuploidía tumoral y el elevado valor de SPF (Fisher y col., 1991, Frierson y col., 1991). Según Férno y col. (1992), los tumores hipoploides tienen un comportamiento más agresivo. En tumores mamarios caninos (Hellmén y col., 1993), la presencia de hipoploidía así como de hiperploidía se asocia con un menor período de supervivencia al realizar un análisis univariado, sin embargo al realizar un análisis multivariado dicha asociación no se encontró.

Por otro lado, en un estudio en tumores mamarios humanos en el que se empleó el conteo cromosómico, se señala que la SPF aumenta en los tumores hipoploides con respecto a los diploides y que después del proceso de endorreduplicación, la SPF es superior en los tetraploides que en los triploides (Remvikos y col., 1992). Es posible que la actividad proliferativa de los tumores mamarios suceda de forma paralela a la evolución genética dando lugar a una pérdida progresiva de genes supresores (del proceso de metastatización) y a una activación de oncogenes (van den Vijver, 1993).

En conclusión podemos decir que como consideraciones finales a este capítulo, la incidencia de aneuploidía observada es similar a la observada en otros estudios en la especie canina y ligeramente inferior a la descrita en el cáncer de mama en la mujer. La incidencia de aneuploidía en displasias y tumores benignos es superior a la observada en el cáncer de mama de la mujer.

La presencia de poblaciones celulares hipoploides es más frecuente y el grado de desviación de los Índices de ADN de los tumores aneuploides es más estrecho en la especie canina que en el hombre, lo que podría indicar que la evolución de la ploidía en ambas especies es diferente.

La fracción de fase S es superior en los tumores mamarios malignos que en los benignos y en los tumores malignos es superior en los aneuploides que en los diploides.

La fracción de fase S se relaciona directamente con características clínicas e histopatológicas de malignidad como la afectación ganglionar y el grado histológico de malignidad.

Capítulo IV
Influencia de la nutrición en la carcinogénesis
mamaria en la especie canina.
Estudio epidemiológico caso-control

INTRODUCCION

La elevada incidencia de los tumores mamarios caninos (TMC), ya comentada en otros capítulos de este trabajo, impulsa a la búsqueda de nuevos factores de riesgo, entre ellos los nutricionales. En la revisión bibliográfica queda reflejada la importante y controvertida influencia de diversos factores nutricionales en el cáncer mamario en la especie humana, donde ésta ha sido objeto de estudio durante varias décadas. En la especie canina, Sonnenschein y col. (1991) observaron que la obesidad en los primeros años de vida se asocia a un aumento del riesgo de TMC en perras ovariectomizadas. Asimismo se encontró que el porcentaje de energía procedente de la grasa en la dieta habitual de los casos era inferior que en los controles, lo que no coincide con lo observado en la población humana donde, generalmente, el consumo de grasa se asocia directamente al riesgo de cáncer de mama (Goodwin y Boyd, 1987; Toniolo y col., 1989; Howe y col., 1990; van't Veer y col., 1990; Sasaki y col., 1993).

En el presente estudio caso-control investigamos la relación entre la dieta y los TMC. Los animales incluidos proceden del área de Madrid y difieren de los estudiados por Sonnenschein y col. (1991) en que el porcentaje de perras no ovariectomizadas supone un 86,4% del total de animales en lugar de el 43,5% del estudio americano; además, el porcentaje de energía procedente de comida casera en las dietas de nuestro trabajo es del 53%, superior al 34,8% del mencionado estudio.

Asimismo, para conocer el consumo de nutrientes, no sólo empleamos un cuestionario dietético sino que además determinamos la proporción de ácidos grasos de la grasa subcutánea y las concentraciones plasmáticas de retinol y selenio de los animales de nuestro estudio. La elección de estos métodos se debe a que empleando exclusivamente cuestionarios dietéticos no es posible determinar el consumo de los ácidos grasos (van Staveren y col., 1986) y, sin embargo, el perfil de los ácidos grasos de la grasa subcutánea puede reflejar la composición de éstos en la dieta

(Beynen y col., 1980).

La asociación observada en diversos estudios epidemiológicos entre la grasa y el cáncer de mama de la mujer, se ha confirmado en numerosos estudios con animales de experimentación (capítulo I, pag. 47), los cuales señalan además que son los ácidos grasos poliinsaturados los que principalmente actúan en la promoción tumoral (Ip y col., 1985; Carroll y Noble, 1987; Lasekan y col., 1990).

Con respecto a los micronutrientes, tanto el retinol (Garland y col., 1993) como el selenio (Willett y col., 1983) se asocian inversamente a varios tipos de tumores en el hombre. El consumo de estos micronutrientes puede estimarse mediante la determinación de los niveles de retinol y selenio plasmáticos respectivamente (Comstock y col., 1992), por lo que hemos considerado relevante la determinación del perfil de ácidos grasos de la grasa subcutánea y los niveles plasmáticos de retinol y selenio.

MATERIAL Y METODOS

1. Grupos de animales

En este estudio se han empleado 191 perras con edades comprendidas entre 5 y 13 años de edad, ambos inclusive. Los animales fueron seleccionados y clasificados en **grupos** como se refiere a continuación.

A. GRUPOS CONTROLES

a. Grupo control de animales sanos

Este grupo se formó con 44 perras que acudieron a consulta veterinaria para revisión o vacunación anual y que no presentaban ninguna enfermedad clínica aparente. Se obtuvieron de las Consultas del Departamento de Patología Animal II de la Facultad de Veterinaria de Madrid, así como de 4 Clínicas Veterinarias localizadas en el área de Madrid.

b. Grupo control de animales enfermos

Este grupo se formó con 45 perras que acudieron a las Consultas de la Facultad que presentaban problemas oftalmológicos, cardíacos, traumatológicos, urinarios, respiratorios o gastrointestinales agudos. Ninguno de estos animales presentaba enfermedades endocrinas, metabólicas o tumorales, con el fin de evitar interferencias en la obtención de resultados del estudio caso-control.

B. GRUPO CASOS

Este grupo se formó con 102 perras diagnosticadas de enfermedad neoplásica en nuestro Departamento durante los años 1992 y 1993. Para poder valorar su representatividad hemos de señalar que anualmente, se procesan aproximadamente 900 biopsias y necropsias de pequeños animales en el servicio de diagnóstico anatomopatológico de este Departamento, que proceden de las consultas de nuestra Facultad así como de clínicas veterinarias. Asimismo son diagnosticados anualmente por este servicio aproximadamente 210 tumores mamarios caninos y felinos.

Los casos fueron clasificados en dos grupos según el tumor que presentaban:

I. Animales con tumores benignos

Grupo formado por 48 perras que presentaban tumores mamarios benignos y/o displasias mamarias.

II. Animales con tumores malignos

Formado por 54 perras que presentaban al menos un tumor maligno confirmado histológicamente. Por tanto, aquellos animales que presentaban tumores diferentes, benignos y malignos, en diferentes glándulas, fueron incluidos en este grupo.

2. Cuestionario dietético

En primer lugar, solicitamos la participación voluntaria de los propietarios en el estudio. Nuestros objetivos no se dieron a conocer durante la entrevista mantenida con los mismos, para evitar la manipulación de las respuestas referentes a las dietas de sus animales.

Los dueños de los animales que aceptaron colaborar, contestaron a una serie de preguntas referentes a la dieta habitual de su animal y a su historial reproductivo.

Toda la información obtenida se recogía en un cuestionario que consistía en:

I. La edad, el peso y la altura de la perra.

II. La raza y tamaño de la misma. Para esto último los animales fueron clasificados según su peso en las siguientes categorías: raza enana (≤ 5 kg), miniatura (5,1 - 11,3 kg), mediana (11,4 - 23 kg), grande (23,1 - 39,9 kg) y gigante (≥ 40 kg).

La conformación corporal (clasificada en delgada, normal y obesa) se estableció en 3 momentos de la vida del animal: en la presentación clínica, un año antes de esta fecha y cuando el animal tenía un año de edad.

III. Historial reproductivo, que incluye la existencia de ovariectomía así como la fecha de la misma, la edad al primer celo, la frecuencia, regularidad y duración de los celos, el número de partos y la edad al primer parto, el número de pseudogestaciones y pseudolactaciones así como los tratamientos empleados frente a estos problemas y los tratamientos hormonales para prevención del celo y cubriciones no deseadas.

Toda esta información se empleó para establecer grupos de animales así como para determinar si alguna de estas características era estadísticamente diferente entre los casos y controles pudiendo alterar los resultados.

IV. Cuestionario dietético. Basado en un cuestionario de frecuencia de alimentación cuantitativo, que incluía la frecuencia diaria de alimentación (de una a 3 veces al día) y las proporciones relativas de comida comercial y preparada en casa en la dieta diaria.

Con respecto al consumo de comida comercial, se registró la frecuencia y la cantidad diarias, el nombre comercial del producto, así como la clase de comida: pienso, comida semi-húmeda, comida enlatada o aperitivo.

El consumo de comida preparada en casa se determinó registrando la frecuencia de consumo a la semana, la cantidad al día y el modo de preparación (crudo, cocido o frito) de 64 alimentos clasificados en grupos (carnes y pescados; embutidos; productos lácteos y huevos; frutas y verduras; pan y cereales y dulces).

Por otro lado, también se registró el consumo de grasas (mantequilla, margarina y diversos tipos de aceite) y de suplementos vitamínicos y/o minerales. Asimismo, se hace una indagación especial sobre el consumo frecuente de sobras de comida de los propietarios.

Las entrevistas fueron realizadas al comienzo del examen clínico en la consulta por la misma persona. Posteriormente, todos los cuestionarios sufrieron una 1ª revisión. Durante esta revisión, observamos importantes carencias de información en 20 cuestionarios, especialmente en los datos referentes a la dieta, por lo que contactamos telefónicamente con el fin de completar el cuestionario.

Las preguntas relacionadas con la dieta fueron enfocadas hacia la alimentación que recibía el animal un mes antes de la recogida de datos, aunque la fecha de inicio de esta dieta fue determinante ya que solamente se incluyeron en el análisis de nutrición aquellos animales que consumían dicha dieta desde hacía más de un año. Por ello, los datos dietéticos de 13 perras (5 casos, 5 controles sanos y 3 controles enfermos) fueron excluidos.

3. Perfil dietético

Los datos sobre la dieta obtenidos mediante el cuestionario fueron introducidos en el programa de nutrición de pequeños animales "Small Animal Nutritionist" (Durango Software, 1987) para calcular un perfil nutricional de cada animal.

El contenido calórico y de macronutrientes de los alimentos comerciales se obtuvo de los fabricantes o bien de la etiqueta de los productos. En los alimentos caseros, la composición cualitativa se obtuvo de las tablas de composición de alimentos españoles (Vivanco y col., 1982).

El perfil dietético calculado estaba formado por los siguientes apartados:

- **El consumo energético diario** expresado en kilocalorías (Kcal).
- **El porcentaje de energía diaria que procede de comida comercial y de comida casera**, calculado como la proporción de Kcal que cada tipo de comida aporta al consumo energético diario.
- **El porcentaje de energía diaria que procede de los macronutrientes:** hidratos de carbono, proteínas y grasas de la dieta, que fueron calculados como la proporción de kcal que cada nutriente aporta con respecto al consumo energético diario.
- **El porcentaje de energía procedente de determinados alimentos.** Para ello, establecimos 5 grupos de alimentos tras el análisis global de los cuestionarios, como se señala a continuación:

I. Carnes rojas, que incluyen carne y derivados de vaca, cerdo, cordero y caballo, excepto el hígado y los embutidos.

II. Carnes blancas, que incluye principalmente carne y derivados del pollo y gallina a excepción del hígado.

III. Hígados de varias especies, los más consumidos son los de pollo y vaca y en menor cantidad de cerdo.

IV. Productos lácteos, grupo formado por leche (entera, semidesnatada y

desnatada), quesos de diferentes tipos, yogures, y otros productos lácteos consumidos menos frecuentemente (ej. cuajada).

V. Frutas y verduras

El motivo de clasificar los alimentos en grupos con propiedades nutritivas similares y características, fue el poder comparar sus consumos entre casos y controles y conocer la posible influencia de los nutrientes de estos grupos de alimentos. Cada uno de estos grupos se caracteriza por un contenido relativamente elevado de uno o más nutrientes.

4. Datos clínicos

4.1. Examen clínico

En los grupos controles, los datos clínicos se obtuvieron de las historias clínicas de la Facultad o bien del veterinario a cargo del animal. En todos los animales controles comprobamos que no presentaban ninguna lesión compatible con una neoplasia mamaria mediante una exploración clínica de las glándulas mamarias. Dos perras que al principio del estudio fueron incluidas en el grupo control de animales enfermos fueron eliminados ya que posteriormente, desarrollaron tumores de mama.

El examen clínico de todos los animales incluidos en el grupo de casos **realizado** cuando acudieron a las consultas, ha sido descrito en el apartado de **material** y métodos del capítulo II.

Asimismo, mediante el empleo del cuestionario citado anteriormente y de igual forma que en los animales controles, es decir, mediante entrevista directa con el propietario, se obtuvo la información referente al estado reproductor del animal.

4.2. Estadiaje

El estadio clínico del tumor se estableció mediante el sistema TNM (Owen, 1980).

5. Toma de muestras

5.1. Sangre

Se extrajo sangre a un total de 47 casos y 68 controles, y se conservaron muestras de 1 ml suero a -20° C.

5.2. Grasa subcutánea

Obtuvimos una muestra de grasa subcutánea de un total de 42 casos y 39 controles.

El material empleado consistió en una palomilla de 20 G y una jeringa de 20 ml para realizar el vacío. La muestra se recogió mediante aspiración en la región dorso-lumbar. En primer lugar, se levanta ligeramente un pliegue de piel, se coloca la palomilla subcutáneamente formando un ángulo aproximadamente de 60° con la piel. Posteriormente, se conecta la jeringa y se aplica el vacío para, por último, manteniendo el vacío en la jeringa desplazar ligeramente la palomilla en varias direcciones con el fin de obtener una muestra adecuada. La cantidad obtenida por término medio fue 50 a 100 mg, lo que supone unas 2 o 3 gotas de grasa. Las muestras se guardaron en plástico y se conservaron a -20° C, evitando el contacto con el aire y la luz. Se excluyeron las muestras contaminadas con sangre ya que ello interfiere la valoración de los ácidos grasos. Beynen y Katan (1985) aplicaron una metodología semejante para el estudio de la grasa corporal en la especie humana.

6. Análisis de indicadores nutricionales

Los niveles de selenio, retinol y ácidos grasos fueron determinados en el Department of Laboratory Animal Science of the Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht.

6.1. Selenio sérico

En 115 muestras de suero se determinó el nivel de selenio de acuerdo con el método fluorométrico descrito por Koh y Benson (1983) en un espectrofotómetro de fluorescencia Perkin-Elmer (Mod 1000, Perkin-Elmer Ltd., England).

6.2. Retinol sérico

En 50 muestras de plasma se determinó el nivel de retinol mediante cromatografía líquida de alta resolución según el método descrito por Roodenburg y col. (1994).

6.3. Ácidos grasos subcutáneos

En 81 muestras de tejido graso subcutáneo se determinó el perfil de ácidos grasos mediante el método descrito por Beynen y Katan (1985). Se sintetizaron metil-ésteres de los ácidos grasos de acuerdo con el método descrito por Metcalfe y col. (1966) y se separaron por cromatografía líquido-gas en un modelo Packard 433. El perfil se describe en la **tabla 1**.

Símbolo	Nº de dobles enlaces	Nombre común	Nombre sistemático
Saturados			
C10	0	Caprico	n-Decanoico
C12	0	Laurato	n-Dodecanoato
C14	0	Miristato	n-Tetradecanoato
C15	0	-	n-Pentadecanoato
C16	0	Palmitato	n-Hexadecanoato
C18	0	Estearato	n-Octadecanoato
C20	0	Araquidato	n-Eicosanoato
Monoinsaturados			
C16:1	1	Palmitoleato	Hexadecenoato
C18:1	1	Oleato	Octadecenoato
C20:1	1	-	Eicosadecenoato
Poliinsaturados			
C18:2n-6	2	Linoleato	Octadecadienoato
C18:3n-6	3	Linolenato	Octadecatrienoato
C18:3n-3	3	Linolenato	Octadecano
C20:2	2	Linolenato	Eicosadienoato
C20:3	3	Linolenato	Eicosatrienoato
No identificables			

Tabla 1. Perfil de ácidos grasos analizados en la grasa subcutánea.

7. Análisis estadístico

La influencia de las variables reproductivas sobre la incidencia de los tumores mamarios fue evaluada con el test de Student, comparando los valores medios de los casos con respecto a los controles. Para la comparación de las variables cualitativas empleamos la prueba del Chi². Las variables dietéticas cuyas distribuciones fueron normales se compararon con el test de Student. Aquellas cuyas distribuciones no eran normales, se compararon con la prueba no paramétrica del test de rangos de Wilcoxon. Un valor de $P \geq 0,05$ fue considerado significativo.

RESULTADOS

1. Edad, raza y estado reproductor

Los resultados correspondientes a este apartado han sido resumidos en la tabla 2. Estos resultados se expresan en términos de valor medio \pm error standard del valor medio.

La media de edad de los casos fue 9,8 años \pm 0,22. La media de edad de los controles fue 8,17 \pm 0,24. La diferencia entre la media de edad de los casos y de los controles fue estadísticamente significativa ($P < 0,05$).

Los perros mestizos y de razas cruzadas fueron los más numerosos en este estudio, siendo el 42,1% y 40% del total de los casos y controles respectivamente. A continuación, la raza de mayor incidencia fue el pastor alemán (15,6%) y las razas caniche y cocker spaniel, que representaron el 6,8% y 6,8% del total respectivamente. En la tabla 2 se muestra la distribución de los casos y controles según el tamaño de la raza, que no fue significativamente diferente entre ambos grupos ($P > 0,05$).

El porcentaje de perras castradas fue de un 11% en el grupo de casos y 17% en el de los controles. La diferencia entre los valores medios de los animales ovariectomizados de los casos y los controles no fue estadísticamente significativa ($P > 0,05$).

Con respecto a las variables reproductivas, las diferencias entre la frecuencia, regularidad y duración de los celos entre los casos y los controles no fueron significativas. Asimismo, las diferencias entre casos y controles encontradas respecto a la edad al primer parto, el número de partos, el número de pseudogestaciones y pseudolactaciones, los tratamientos hormonales para prevención del celo, pseudogestaciones y/o abortivos, no fueron significativas ($P > 0,05$).

La única variable reproductiva significativamente diferente entre casos y controles fue la edad al primer celo, variable que resultó menor en casos, con una media de $8,39 \pm 0,6$ que en los controles, con una media de $9,7 \pm 0,49$, siendo el valor de $P \leq 0,001$.

	Casos		Controles	
	n	Edad	n	Edad
N° de perras	102	9,84 ± 0,22	89	8,17 ± 0,24
Raza				
Razas puras	59	9,57 ± 0,29	53	8,56 ± 0,30
Mestizos	43	10,23 ± 0,34	36	7,58 ± 0,40
Tamaño de la raza				
Enana	7	9,14 ± 1,18	10	7,75 ± 0,77
Miniatura	29	10,00 ± 0,49	18	7,94 ± 0,53
Mediana	30	10,46 ± 0,36	17	8,29 ± 0,62
Grande	28	9,60 ± 0,33	41	8,27 ± 0,36
Gigante	8	8,30 ± 0,73	3	9,00 ± 1,53
Ovariectomía				
No	91	9,70 ± 0,23	74	8,00 ± 0,26
Si	11	11,00 ± 0,66	15	8,93 ± 0,70

Tabla 2. Resultados de edad, raza y estado reproductor en 102 casos y 89 controles. La edad es el valor medio ± el error standard del valor medio en años.

2. Conformación corporal

La distribución de los casos y controles con respecto a la conformación corporal cuando tenían aproximadamente un año de edad (entre 9 y 12 meses), un año anterior a la recogida de los datos y en el momento de la misma, se describe en la **tabla 3**.

En un 40% de los casos, los propietarios respondieron que sus animales habían sido obesos cuando tenían un año de edad, en comparación con el 11% registrado en el grupo de controles sanos y con el 14% en el de enfermos. Esta diferencia fue significativa estadísticamente, teniendo en cuenta los dos grupos controles por separado o conjuntamente ($P < 0,001$).

Con respecto a la conformación corporal un año anterior a la recogida de los datos, los casos resultaron significativamente obesos en comparación con los controles ($P < 0,02$).

Por el contrario, en el momento de la recogida de los datos la diferencia entre las conformaciones corporales de los casos y de los controles no resultaron significativas ($P > 0,05$).

Conformación corporal	Casos		Controles sanos		Controles enfermos	
	n	%	n	%	n	%
Un año de edad						
Delgado	20	19,8	6	13,6	6	13,6
Normal	41	40,6	33	75,0	32	72,7
Obeso	40	39,6	5	11,3	6	13,6
Total	101	100	44	100	44	100
Un año antes del estudio						
Delgado	9	8,8	2	4,5	2	4,4
Normal	36	35,3	29	65,9	23	51,1
Obeso	57	55,8	13	29,5	20	44,4
Total	102	100	44	100	45	100
Actual						
Delgado	3	2,9	1	2,3	0	0,0
Normal	42	41,2	29	65,9	22	48,9
Obeso	57	55,9	14	31,8	23	51,1
Total	102	100	44	100	45	100

Tabla 3. Conformación corporal al año de edad, un año antes y en el momento de la presentación. No se han incluido los animales con datos desconocidos.

3. Factores dietéticos

- I. Tipo de alimentación: casera o comercial
- II. Contenido en macronutrientes: hidratos de carbono, grasas y proteínas.
- III. Consumo de determinados alimentos.
- IV. Indicadores nutricionales: selenio, retinol y perfil de ácidos grasos.

I. Tipo de alimentación: casera o comercial

Las proporciones de comida comercial y casera en el consumo diario se calcularon en términos de energía (Kcal) proporcionadas por estos dos tipos de alimentación.

En los tres grupos de animales, la contribución del alimento comercial al consumo calórico diario individual, era muy variada pues se encontraba en un rango de 0 a 100%. En el grupo de casos, la media de la proporción de comida comercial fue $33,19 \pm 3,78$, mientras que en los controles sanos fue $67,02 \pm 6,79$ y en las controles enfermos fue $41,23 \pm 5,97$. Las diferencias entre la media del grupo de casos y la correspondiente al grupo de controles sanos fue muy significativa ($P < 0,001$), así como la existente entre la media del grupo de casos y la media de los 2 grupos controles combinados ($P < 0,001$). Figura 1.

Hay que señalar que, además, muchas de las dietas cuya base principal estaba constituida por dietas caseras contenían proporciones inadecuadas de macronutrientes, a diferencia de las dietas comerciales, más equilibradas.

las proteínas en las dietas de los casos con respecto a las de los controles, sanos, enfermos o los dos combinados, no fueron significativas ($P > 0,05$).

El porcentaje de calorías aportado por las grasas fue superior en los casos que en los controles, siendo la diferencia significativa entre los casos y los controles sanos ($P < 0,02$), sin embargo, no resultó significativa entre los casos y los controles enfermos, así como entre los casos y los 2 grupos controles combinados, al ser los valores de $P > 0,05$.

	Casos n= 93	Controles sanos n= 39	Controles enfermos n= 42
Energía de carbohidratos	42,97 ± 1,38	45,07 ± 2,31	42,73 ± 1,99
Energía de grasas	31,03 ± 1,27	26,56 ± 1,57	30,38 ± 1,50
Energía de proteínas	26,10 ± 0,81	28,33 ± 1,25	26,85 ± 1,08

Tabla 4. Valor medio de los porcentajes de energía (Kcal) procedentes de los carbohidratos, grasas y proteínas de la dieta en 174 perras.

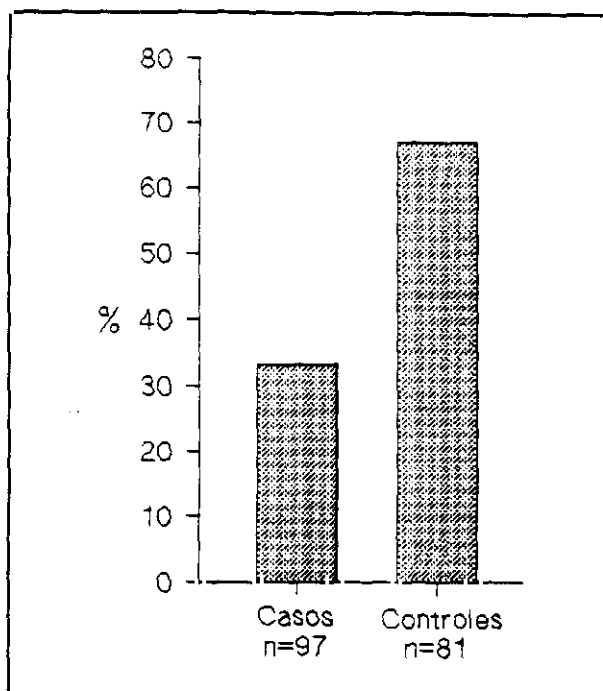


Figura 1. Porcentaje de energía diaria procedente de comida comercial en los casos y controles. El valor representado es la media de cada grupo.

II. Contenido en macronutrientes: hidratos de carbono, grasas y proteínas

La proporción en la dieta de cada macronutriente fue calculada como la proporción de energía (Kcal) que ese nutriente aporta con respecto al consumo calórico diario total. Los resultados de los valores medios de estos porcentajes en los 3 grupos de animales se encuentran en la **tabla 4**. Los resultados corresponden a las dietas de 174 animales, ya que fueron excluidos 13 animales que llevaban tomando esta dieta durante menos de un año y otros 4 casos cuyas dietas eran exclusivamente caseras y no conseguimos una información adecuada en cuanto a la composición y cantidades de las mismas.

Las diferencias entre los porcentajes de calorías de los hidratos de carbono y de

III. Consumo de determinados alimentos

Los resultados de las proporciones de calorías procedentes de los 5 grupos de alimentos establecidos se resumen en la **tabla 5**. Para comparar las posibles diferencias entre casos y controles con respecto a estos alimentos, hemos tenido en cuenta solamente aquellas dietas cuya proporción de comida casera (en términos de energía) era superior al 25% del total para evitar el error debido a la proporción del alimento comercial. Por ello, en este apartado se han empleado las dietas de 117 perras: 72 casos, 15 controles sanos y 30 controles enfermos.

La proporción de calorías procedentes del primer grupo de alimentos, denominado carnes rojas, fue superior en los casos, con una media de $16,83 \pm 2,26$, que en los controles enfermos, en los que la media fue $8,63 \pm 2,95$ y superior también a la media de los 2 grupos controles combinados, $10,71 \pm 2,56$, siendo los valores de $P < 0,02$ y $< 0,05$ respectivamente. Sin embargo, las diferencias entre los casos y los controles sanos, con una media de $14,86 \pm 4,88$ no fueron significativas, siendo el valor de $P > 0,05$.

Con respecto al segundo grupo de alimentos, carnes blancas, el porcentaje de calorías procedentes de este grupo fue $11,36 \pm 1,83$ en los casos, $17,13 \pm 5,79$ en los controles sanos y $18 \pm 3,47$ en los controles enfermos. Las diferencias entre los casos y los controles enfermos, así como las encontradas entre los casos y los 2 grupos controles combinados fueron significativas, siendo los valores de $P < 0,05$.

Las diferencias encontradas con respecto a las calorías derivadas del consumo de hígado no fueron significativas al comparar los sanos, los enfermos o los dos grupos controles combinados con respecto a los casos, siendo los valores de $P > 0,10$, $> 0,20$ y $> 0,20$ respectivamente.

Las diferencias entre la proporción de calorías procedentes del consumo de productos lácteos en los casos y en los controles sanos, los enfermos o los 2 grupos conjuntamente no resultaron significativas, siendo los valores de $P > 0,05$ respectivamente.

El valor medio de la proporción de calorías procedentes de frutas y verduras en los casos fue $3,2 \pm 0,69$ y en los controles sanos $5,93 \pm 1,47$. Esta diferencia resultó estadísticamente significativa con un valor de $P < 0,05$. Sin embargo en los controles enfermos el valor medio fue $3,5 \pm 0,9$ y la diferencia con los casos no resultó significativa ($P > 0,20$), al igual que la diferencia entre los casos y los 2 grupos controles combinados ($3,5 \pm 0,9$), al ser el valor de $P > 0,05$.

Grupo de alimentos	Casos n= 72	Controles n= 45
Carnes rojas	$16,83 \pm 2,26$	$10,71 \pm 2,56$
Carnes blancas	$11,36 \pm 1,83$	$17,70 \pm 2,97$
Hígado	$3,00 \pm 1,20$	$2,95 \pm 1,34$
Productos lácteos	$4,12 \pm 0,83$	$5,80 \pm 1,08$
Frutas y verduras	$3,20 \pm 0,69$	$4,30 \pm 0,78$

Tabla 5. Valor medio de los porcentajes de energía (en Kcal) procedentes de los diversos tipos de alimentos. Se han excluido las dietas que contienen menos de un 25% de energía procedente de comida preparada en casa.

IV. Indicadores nutricionales

A.-SELENIO SERICO

El valor medio de los niveles de selenio en 47 casos fue $0,2996 \pm 0,0071$ con un rango de valores entre 0,2130 y 0,4340 $\mu\text{g/ml}$.

El valor medio de los niveles de selenio en 68 controles (sanos y enfermos) fue

de $0,2990 \pm 0,0060$ con un rango de valores entre 0,1390 y 0,4050. La diferencia entre ambos valores medios no fue estadísticamente significativa ($P > 0,05$).

B.-RETINOL SERICO

El valor medio de los niveles de retinol en 24 casos fue $60,075 \pm 4,350$ con un rango de valores entre 24,100 y 101,800 $\mu\text{g/dl}$.

El valor medio de los niveles de retinol en 26 controles (sanos y enfermos) fue de $85,315 \pm 10,101$ con un rango de valores entre 25,900 y 222,300. La diferencia entre ambas medias resultó estadísticamente significativa, siendo el valor de $P < 0,05$.

C.-PERFIL DE ACIDOS GRASOS SUBCUTANEOS

En la **tabla 6** se muestra el valor medio \pm el error estándar del valor medio de los ácidos grasos analizados en 42 casos y 39 controles.

Las diferencias encontradas entre los casos y los controles no resultaron significativas a excepción del ácido graso saturado C10, siendo el valor medio significativamente superior en los controles que en los casos ($P < 0,05$).

Por otro lado, las diferencias encontradas respecto a la conformación corporal en las tres etapas estudiadas (al año de edad, un año antes del diagnóstico y en el momento del diagnóstico) y a las variables dietéticas estudiadas entre las perras con tumores benignos y malignos no fueron estadísticamente significativas. Solamente la media de energía procedente de frutas y verduras en el grupo de animales con tumores malignos ($n=48$) fue $2,5 \pm 0,94$ fue significativamente inferior a la del grupo con neoplasias benignas ($n=44$) $3,02 \pm 0,59$ ($P < 0,05$). No resultaron significativas las diferencias de conformación corporal y variables dietéticas estudiadas entre perras con tumores malignos de diferente estadio clínico.

ACIDOS GRASOS	CASOS	CONTROLES
C10	2,733 ± 0,275	3,692 ± 0,340
C12	0,142 ± 0,013	0,121 ± 0,009
C14	1,836 ± 0,078	1,774 ± 0,061
C15	0,200 ± 0,011	0,197 ± 0,009
C16	11,955 ± 0,431	12,492 ± 0,350
C16:1	9,247 ± 0,370	8,4923 ± 0,312
C18	4,131 ± 0,250	4,345 ± 0,253
C18:1	51,736 ± 0,675	49,949 ± 0,700
C18:2n-6	12,269 ± 0,504	12,808 ± 0,445
C18:3n-3	0,340 ± 0,024	0,336 ± 0,015
C18:3n-6	0,492 ± 0,031	0,538 ± 0,041
C20	0,119 ± 0,015	0,094 ± 0,013
C20:1	0,526 ± 0,036	0,608 ± 0,038
C20:2	0,119 ± 0,009	0,150 ± 0,139
C20:3	0,136 ± 0,014	0,166 ± 0,013
NO IDENTIFICABLES	4,138 ± 0,151	4,215 ± 0,207

Tabla 6. Perfil de ácidos grasos subcutáneos (en g/100g de metil-ésteres totales).

DISCUSION

Las variables reproductivas estudiadas tales como la ovariectomía, las características de los celos, el número de partos, la edad al primer parto, las pseudogestaciones y los tratamientos hormonales empleados en la práctica clínica para prevención del celo, para tratamiento de pseudogestaciones o como abortivos, no han sido significativamente diferentes en los animales con tumores de mama de los controles. Sin embargo, hemos observado que la edad de aparición del primer celo se asocia a la incidencia ya que el valor medio de edad en los casos es significativamente menor que el correspondiente a los controles. Estos resultados coinciden con los de otros autores en la perra (Theilen y Madewell, 1987) y en la mujer, donde se ha indicado que la aparición tardía de la menarquia así como la presentación temprana de la menopausia son factores protectores frente al cáncer de mama (Mansfield, 1993).

Un resultado interesante de nuestro estudio se refiere a la obesidad juvenil. Cuando existe obesidad en esta etapa de la vida, aproximadamente al año de edad, aumenta de manera significativa el riesgo de tumores mamarios en la edad adulta. Igual ocurre con la obesidad un año anterior al diagnóstico de los tumores. Sin embargo, la influencia de la conformación corporal en el momento del diagnóstico no ha resultado estadísticamente significativa. Estos resultados son similares a los obtenidos por Sonneschein y col. (1991) también en la especie canina.

Algunos investigadores han obtenido resultados similares en el cáncer de mama en la mujer y han propuesto que la hipernutrición, y por tanto la obesidad durante la adolescencia, es un determinante importante del desarrollo de cáncer de mama en la edad adulta (de Waard, 1975; Sherman y col, 1981). Además, se ha propuesto que la menor incidencia de obesidad en las poblaciones vegetarianas, secundaria a un menor consumo calórico, puede retrasar la aparición de la menarquia (Frisch y McArthur, 1974) e influir sobre el estado hormonal durante el resto de la vida de

los individuos (de Waard, 1975).

Aunque hay que tener en cuenta que la conformación corporal juvenil se ha obtenido con datos de los propietarios, lo que podría introducir cierto error, la obesidad indicada por los propietarios de los casos ha sido significativamente superior a la correspondiente a los controles, lo que nos permite plantear que la obesidad en la edad juvenil puede adelantar el comienzo de la madurez sexual así como el estado hormonal posterior, favoreciendo la carcinogénesis de los tumores mamarios caninos.

Por otro lado, la obesidad un año antes del diagnóstico ha sido significativamente superior en los casos que en los controles. Algunos autores en medicina humana han observado que la obesidad en las mujeres adultas modifica los niveles y el metabolismo de las hormonas sexuales femeninas, lo que puede inducir la carcinogénesis mamaria (Bennett e Ingram, 1990). Tal vez, estos mecanismos puedan operar de igual forma en la carcinogénesis de los tumores mamarios en la perra.

La obesidad fue más frecuente en los casos que en los controles en el momento del diagnóstico, aunque no hemos encontrado una relación estadísticamente significativa, atribuible, en parte, a la pérdida de peso observada por los propietarios de algunos de los animales con un proceso tumoral avanzado.

En nuestro estudio, las perras con tumores mamarios consumen significativamente más comida casera que comercial en comparación a las perras controles sanas y a los dos grupos de animales controles de este estudio. Sin embargo, las diferencias entre los casos y los controles enfermos no han sido significativas.

Estos resultados deben tomarse con precaución, ya que existen ciertos factores que pueden haber influido de una u otra forma. El factor más importante a tener en cuenta es que en la mayoría de las perras, tanto casos como controles, cuyas dietas eran fundamentalmente caseras, éstas eran desequilibradas en su composición

nutritiva. Principalmente dichos desequilibrios nutricionales son secundarios a la proporción elevada en estas dietas de sobras de comida y otros alimentos caseros. La presencia de hábitos nutricionales inadecuados se ha observado en algunos casos y también en controles enfermos, debido muchas veces a la anorexia secundaria a procesos crónicos que los propietarios intentan solventar proporcionando a las perras alimentos de su gusto.

Asimismo, hemos tratado de investigar si las proporciones de macronutrientes de las dietas caseras de nuestro estudio eran diferentes que las proporciones comerciales. El contenido en grasa de las dietas comerciales se sitúa en el rango adecuado para la especie canina, mientras que el correspondiente a las dietas caseras, en bastantes casos, sobrepasaba el límite superior de este rango normal ($>40\%$).

Puesto que el contenido en grasa de las dietas comerciales es inferior al de las dietas caseras, en animales con alimentación mixta (dietas casera/comercial), la cantidad de energía (calorías) procedentes de la grasa se incrementa a medida que se aumenta la proporción de comida casera ingerida.

Con respecto a la proporción de carbohidratos y proteínas, las dietas caseras y comerciales no difieren significativamente.

La elevada proporción de grasa de las dietas caseras encontrada en nuestro trabajo puede ser responsable de la relación de este tipo de dietas con la mayor incidencia de tumores, aunque otros factores nutricionales presentes en las dietas caseras, puedan a su vez influir.

Nuestros resultados con respecto a las proteínas y a los carbohidratos son similares a los obtenidos anteriormente en el único estudio realizado en la perra (Sonneschein, 1991).

En la mujer, la influencia de los hidratos de carbono en la carcinogénesis y progresión del cáncer de mama es todavía una incógnita. Además, el efecto preventivo observado en algunos estudios (Carroll y Khor, 1975) está bajo la influencia de factores que introducen error, ya que los consumos elevados de

hidratos de carbono se asocian a bajos consumos de grasa y viceversa (Ursin y col., 1993).

La grasa es el macronutriente que mayor controversia ha creado con respecto a su influencia en la carcinogénesis mamaria (capítulo I). En un estudio de revisión se describen y discuten los resultados de diversos estudios epidemiológicos en los que se ha observado una influencia de la grasa (Howe, 1992). Además en un estudio ecológico reciente en el que se han empleado datos de varios países, se ha confirmado la citada relación (Sasaki, 1993). Sin embargo, en dos importantes estudios cohortes, no se ha encontrado una asociación significativa entre el consumo de grasa y la incidencia de cáncer de mama (Willett, 1992; Graham y col., 1992).

En nuestro estudio, y en contra de lo señalado por Sonnenschein y col. (1991), el porcentaje de calorías de la dieta procedentes de la grasa ha sido significativamente superior en los casos que en los controles sanos. Sin embargo, al comparar los porcentajes de grasa de las dietas de los casos con los de los controles enfermos o con los de los dos grupos controles conjuntamente, las diferencias no fueron significativas. Ello puede ser debido a que muchas de las dietas de los controles enfermos eran desequilibradas en cuanto al contenido en nutrientes, al igual que muchas de las dietas de los casos, como ya hemos comentado anteriormente, mientras que las dietas de los animales sanos, en general eran equilibradas. Nuestros resultados con respecto a la grasa, deberán confirmarse en futuros estudios epidemiológicos, para establecer una relación definitiva entre la grasa de la dieta y el riesgo de TMC.

En cuanto a los grupos de alimentos, hemos observado que el consumo de carnes del grupo denominado " carnes rojas", constituido fundamentalmente por vacuno, porcino, y en menor medida ovino y caballar, es mayor y el de carne de aves (pollo) es menor en los casos que en los controles. El consumo de frutas y verduras es mayor en los controles sanos que en los casos, aunque la diferencia no resultó significativa al comparar los casos con los dos grupos controles conjuntamente.

Asimismo este consumo fue significativamente inferior en los casos con tumores malignos que en los casos con displasias y tumores benignos. La ausencia de trabajos similares en la especie canina nos conduce a discutir estos resultados con las investigaciones en medicina humana. En estudios epidemiológicos, el consumo de determinados alimentos como carne de vaca y de cerdo (Lubin y col., 1981; Hislop y col., 1986), carne en general (Hirayama, 1978; Vatten y Foss, 1990) así como salchichas, huevos y carne (Goodman y col., 1992) se ha relacionado de forma directa con un mayor riesgo de cáncer de mama.

Asimismo, en la mayoría de estos estudios epidemiológicos el consumo elevado de frutas y verduras se ha visto asociado a una disminución del riesgo de cáncer, fundamentalmente de tumores epiteliales del tracto digestivo y respiratorio (Steinmetz y Potter, 1991).

Conviene tener en cuenta que, según un reciente estudio epidemiológico las dietas con bajo contenido en grasa van asociadas a un patrón dietético caracterizado por un elevado contenido en vitamina C, hidratos de carbono, fibra, productos avícolas, frutas y verduras, entre otros. Este hecho puede ser una fuente de error en estudios en los que se investiga la asociación de la grasa y el riesgo de cáncer (Ursin, 1993).

Nuestros resultados indican que el consumo de vitamina A, reflejado en los niveles de retinol plasmático se asocia a un menor riesgo de cáncer mamario, lo que coincide con los resultados de Basu y Sasmal (1988), Knekt y col. (1990), Potischman y col. (1990) y Rigby y col (1992) en mujeres con cáncer de mama. Sin embargo, no existen diferencias significativas en los niveles de selenio sérico entre los casos y los controles, al igual que señalan Meyer y Verreault (1987) y Overbad y col (1991) y en contra de lo observado por Comstock y col. (1992).

En lo relativo al perfil de ácidos grasos de la grasa subcutánea, no parece que el consumo de un determinado tipo de grasa influya de forma significativa en el riesgo de tumores de mama, de forma similar a lo observado por London y col. (1993) en medicina humana. No se observan diferencias significativas en el consumo

de ácidos grasos esenciales (n:3 y n:6). Asimismo no se observan diferencias en los ácidos grasos sintetizados por el organismo (C 16:0 y C18:1). Únicamente el consumo del ácido graso saturado C10 parece asociarse a una disminución en el riesgo, aunque es posible el mayor consumo de productos lácteos por parte de los animales controles sea el responsable de esta diferencia significativa.

En definitiva, nuestros resultados indican que la obesidad en la etapa juvenil y en la etapa adulta (un año anterior al diagnóstico) se asocia a un mayor riesgo de presentación de tumores mamarios en la perra. Por otro lado, el consumo de dietas preparadas en casa se asocia de manera significativa a la incidencia de TMC en comparación con el de dietas comerciales. Además, el consumo elevado de alimentos ricos en grasa y proteína animal como carnes de vacuno y porcino (ovino y caballar, muy infrecuentemente) en comparación con el consumo de carne de aves se asocia a una mayor incidencia de estas neoplasias. El consumo escaso de alimentos ricos en carotenoides, vitamina E y C, fibra y otros agentes potencialmente carcinógenos como las frutas y verduras parece estar asociado a una mayor incidencia de tumores de mama en la perra. Asimismo, los niveles de retinol en animales con TMC son significativamente inferiores a los de animales controles. Los niveles séricos de selenio y los diferentes tipos de ácidos grasos del tejido adiposo no se asocian de manera significativa al riesgo de TMC. Todavía queda por comprobar si la relación entre la incidencia de tumores mamarios en la perra y los nutrientes estudiados, así como el consumo de determinados alimentos como carnes, frutas y verduras es una relación causal o no y si estos efectos son independientes o están relacionados entre sí.

V. Conclusiones

- 1.- La ulceración de la piel, el tamaño tumoral y la adherencia a planos profundos son indicadores clínicos de malignidad en los tumores mamarios caninos.
- 2.- El análisis del ADN con citometría de flujo ha revelado que: La incidencia de aneuploidía es significativamente superior en los tumores malignos (48,5%) que en las displasias y tumores benignos (14,3%). La heterogeneidad en la ploidía del ADN es del 19,5% y es independiente de la heterogeneidad histológica.
- 3.- La pérdida de material genético (hipoploidía) se ha producido en un 7,3% de las neoplasias: En 5 de 33 tumores malignos (15,1%) y en 1 de de 49 displasias y tumores benignos (2,0%).
- 4.- El valor de la fracción de fase S es mayor en tumores malignos (7,3%) que en benignos (4,7%), siendo esta diferencia significativa. En los tumores malignos, la fracción de fase S es mayor en aneuploides (8,2%) que en diploides (4,1%).
- 5.- Los valores más elevados de fracción de fase S corresponden a tumores de alto grado de malignidad histológica. El valor de fracción de fase S es significativamente inferior en animales con estadio clínico local que en animales con afectación ganglionar.
- 6.- La existencia de obesidad en la etapa juvenil y durante un periodo de un año anterior al diagnóstico se relaciona con una mayor incidencia de neoplasias mamarias en la especie canina.

- 7.- El consumo de dietas caseras se asocia a un aumento en la presentación de tumores mamarios caninos en comparación con el consumo de dietas comerciales. La ingestión de carnes de vacuno y porcino y el consumo escaso de carne de aves está en relación con un incremento en la incidencia. La ingestión elevada de grasa y reducida de frutas y verduras parece aumentar el riesgo.
- 8.- El análisis del perfil de ácidos grasos del tejido adiposo subcutáneo así como el valor del selenio sérico, no revelan diferencias significativas entre los animales control y los animales portadores de tumores mamarios.
- 9.- Los animales con tumores mamarios presentan un nivel medio de retinol sérico de 60 $\mu\text{g}/\text{dl}$, valor significativamente inferior a la media de retinol sérico de los animales control (85 $\mu\text{g}/\text{dl}$).

VI. Resumen

En el presente trabajo se ha realizado un estudio sobre aspectos clínicos, genéticos y nutricionales en 102 perras con tumores mamarios y 89 animales control.

El estudio clínico efectuado indica que la ulceración, el tamaño tumoral y la adherencia a planos profundos son indicadores de malignidad.

El análisis del ADN tumoral mediante citometría de flujo en 82 tumores, ha revelado que la incidencia de aneuploidía es significativamente superior en los tumores malignos (48,5%) que en las displasias y tumores benignos (14,3%). La heterogeneidad en la ploidía del ADN es del 19,5% y es independiente de la heterogeneidad histológica. Se ha observado hipoploidía en un 7,3% de las neoplasias: En 5 de 33 tumores malignos (15,1%) y en 1 de de 49 displasias y tumores benignos (2,0%). El valor de la fracción de fase S (SPF) determinado en 72 tumores es mayor en tumores malignos (7,3%) que en benignos (4,7%), siendo esta diferencia significativa en el grupo de tumores diploides y aneuploides conjuntamente, aunque no en el grupo de diploides exclusivamente. En los tumores malignos, la fracción de fase S es significativamente mayor en aneuploides (8,2%) que en diploides (4,1%). Los valores más elevados de fracción de fase S corresponden a tumores de alto grado de malignidad histológica de forma estadísticamente significativa. El valor de fracción de fase S es inferior en animales con estadio clínico local (n=5) que en animales con afectación ganglionar (n=19).

En este trabajo también se han investigado diversos aspectos relacionados con la nutrición señalándose que, en 191 perras, la existencia de obesidad durante la etapa juvenil y durante un periodo de un año anterior al diagnóstico se relaciona con una mayor incidencia de neoplasias mamarias. El consumo de dietas caseras se asocia a un aumento en la presentación de tumores mamarios caninos en comparación con el consumo de dietas comerciales. La ingestión de carnes de vacuno y porcino y el consumo escaso de carne de aves está en relación con un incremento en la incidencia; asimismo, el consumo elevado de grasa y reducido de frutas y verduras parece aumentar el riesgo de estas neoplasias.

El análisis del perfil de ácidos grasos del tejido adiposo subcutáneo en 81 perras, así como el valor de selenio sérico determinado en 115 animales no revelan diferencias significativas entre los animales control y los animales portadores de tumores mamarios.

Los animales con tumores mamarios (n=24) presentan un nivel medio de retinol de 60 $\mu\text{g}/\text{dl}$, valor significativamente inferior a la media de retinol sérico de los 26 animales control estudiados (85 $\mu\text{g}/\text{dl}$).

VII. Summary

In the present study clinical aspects and the role of genetic and nutritional factors on incidence of canine mammary tumours are investigated.

In the 102 dogs with spontaneous mammary tumours included in the study, ulceration, size of tumor and adherence to underlying tissue were clinical indicators of malignancy.

Flow cytometric analysis revealed that 7 of 49 dysplasias and benign tumours (14.3%) and 16 of 33 primary malignant tumours (MT) (48.5%) had aneuploid $G_{0,1}$ peaks, being the difference statistically significant. In several tumours (19,5%) there was intra-tumoral heterogeneity in ploidy status that was independent of histological heterogeneity. Hypoploid stemlines were found in 1 benign tumour and in 5 MT.

The SPF was significantly higher in 27 (7.3%) MT than in 45 (4.7%) dysplasias and benign tumours when diploid and aneuploid cases were combined, but not when only diploid cases were compared. Among primary MT the SPF was higher in aneuploid than in diploid tumours ($P < 0.05$) and it was higher in 5 MT from 5 dogs with regional disease than in 22 MT from 19 dogs with local disease. The SPF was positively correlated with histological malignancy grade.

Several dietary and nutritional factors have been investigated in 191 female dogs. Obesity at one year of age and one year before diagnosis is significantly related to a higher incidence of canine mammary tumours. The intake of home-made meals compared to the intake of commercial foods, is significantly related to a higher incidence of CMT.

The intake of meat, especially beef and pork and the low intake of chicken is associated to the incidence of canine mammary tumours. A high fat intake and a low proportion of vegetables in the diet seems to be related to the risk of canine mammary tumours.

The subcutaneous fatty acid profile in 81 dogs have not showed any significant difference between cases and controls. Serum selenium levels in 115 dogs were not significantly different between cases and controls. Serum retinol levels were significantly lower in cases ($n=24$, 60 $\mu\text{g}/\text{dl}$) than in controls ($n=26$, 85 $\mu\text{g}/\text{dl}$).

VIII. Bibliografía

- Abou-El-Ela SH, et al. (1988). Eicosaenoic synthesis in 7,12-dimethylbenzanthracene-induced mammary carcinomas in Sprague-Dawley rats fed primrose, menhaden or corn oil diets. *Lipids* 23: 948-954.
- Abou-El-Ela SH, et al. (1989). Effect of DL-2-difluoromethylornithine and indomethacin on mammary tumor promotion in rats fed high n-3 and/or n-6 fat diets. *Cancer Res.* 49: 1434-1440.
- Aksoy M, et al. (1987). The influence of different levels of dietary fat on the incidence and growth of MNU-induced mammary carcinoma in rats. *Nutr. Cancer* 9: 227-235.
- Albanes D. (1987). Total calories, body weight, and tumor incidence in mice. *Cancer Res.* 47: 1987-1992.
- Alderkreutz H, et al. (1989). Diet and plasma androgens in postmenopausal and omnivorous women and postmenopausal women with breast cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* 49: 433-442.
- Alderkreutz H. (1990). Diet, breast cancer and sex hormone metabolism. Steroid formation, degradation, and action in peripheral tissues. *Ann. NY. Acad. Sci.* 595: 281-290.
- Alderkreutz H, et al. (1992). Diet and breast cancer. *Acta Oncol.* 31: 175-181.
- Alexopoulos CG, et al. (1987). Serum lipids and lipoprotein disorders in cancer patients. *Cancer* 60: 3065-3070.
- Alfin-Slater RB and Kritchevsky D. (1991). *Human Nutrition a comprehensive treatise. Cancer and Nutrition.* Ed: Plenum Press, New York and London.
- Allen SW and Mahaffey EA. (1989). Canine mammary gland neoplasia: prognostic indicators and response to surgical therapy. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 25: 540-546.
- Allen SW, et al. (1986). Cytologic differentiation of benign from malignant canine mammary tumours. *Vet. Pathol.* 23: 649-655.
- Alysworth CF, et al. (1984). Failure of high dietary fat to influence serum prolactin levels during the estrous cycle in female Sprague-Dawley rats. *Proc. Soc. Experimental Biol. and Med.* 175: 25-29.
- Alysworth CF, et al. (1986). Influence of dietary retinyl acetate on normal rat mammary gland development and on the enhancement of 7,12-dimethylbenzanthracene-induced rat mammary tumorigenesis by high levels of dietary fat. *J. Natl. Cancer Inst.* 76: 339-345.
- Armstrong B and Doll R. (1975). Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *Int. J. Cancer* 15: 617-631.
- Arts CJM, et al. (1991). Influence of wheat bran on MNU-induced mammary tumour development, plasma estrogen levels and estrogen excretion in female rats. *J. Steroid. Biochem.* 39: 193-202.
- Arts CJM, et al. (1992). Effects of wheat bran and energy restriction on onset of puberty, cell proliferation and development of mammary tissue in female rats. En: *Dietary fiber and hormonal processes related to mammary carcinogenesis.* Arts CJM. Utrecht. Thesis.
- Bagwell CM. (1989). Modfit program. Topsham, Maine, Verity Software House Inc.

- Balldam AD, et al. (1987).** DNA analysis by flow cytometry, response to endocrine treatment and prognosis in advanced carcinoma of the breast. *Br. J. Cancer* 55: 553-559.
- Baisch H, et al. (1975).** Analysis of PCP-data to determine the fraction of cells in the various phases of the cell cycle. *Radiat. Environ. Biophys.* 12: 31-39.
- Baisch H, et al. (1982).** A comparison of mathematical models for the analysis of DNA histograms by flow cytometry. *Cell. Tissue Kinet.* 15: 235-249.
- Ballard-Barbash R, et al. (1990).** Body fat distribution and breast cancer in the Framingham study. *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 286-290.
- Bang HO and Dyerberg J. (1980).** Lipid metabolism and ischemic heart disease in Greenland Eskimos. En: HH Draper. *Advances in nutritional research.* Ed: Plenum, New York. Vol 3: 1-22.
- Bani IA, et al. (1986).** Plasma lipids and prolactin in patients with breast cancer. *Br. J. Cancer* 54: 439-446.
- Barbosa JC, et al. (1990).** The relationship among adiposity, diet, and hormone concentrations in vegetarian and nonvegetarian postmenopausal women. *J. Am. Clin. Nutr.* 51: 798-803.
- Barlogie B, et al. (1976).** DNA-histogram analysis of human hematopoietic cells. *Blood* 48: 245-258.
- Barlogie B, et al. (1983).** Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res.* 43: 3982-3997.
- Basu TK and Sasmal P. (1988).** Plasma vitamin A, retinol-binding protein, and prealbumin in postoperative breast cancer patients. *Int. J. Vitam. Res.* 58: 281-283.
- Beaton GH, et al. (1979).** Sources of variance in 24-hour dietary recall data: implications for nutrition study design and interpretation. *Am. J. Clin. Nutr.* 32: 2456-2459.
- Beerman H. (1991).** Analytical cytology of breast cancer. Thesis, Leiden. The Netherlands.
- Beerman H, et al. (1990).** Prognostic significance of DNA ploidy in a series of 690 primary breast cancer patients. *Int. J. Cancer* 45: 34-39.
- Beerman H, et al. (1991).** Flow-cytometric analysis of DNA stemline heterogeneity in primary and metastatic breast cancer. *Cytometry* 12: 147-154.
- Bennett FC and Ingram DM. (1990).** Diet and female sex hormone concentrations: An intervention study for the type of fat consumed. *Am. J. Clin. Nutr.* 52: 808-812.
- Beth M, et al. (1987).** Comparison between the effects of dietary fat level and of caloric intake on methylnitrosourea-induced mammary carcinogenesis in female SD rats. *Int. J. Cancer* 39: 737-744.
- Beynen AC, et al. (1980).** A mathematical relationship between the fatty acid composition of the diet and that of the adipose tissue in man. *Am. J. Clin. Nutr.* 33: 81-85.
- Beynen AC and Katan MB. (1985).** Rapid sampling and long-term storage of subcutaneous adipose-tissue biopsies for determination of fatty acid composition. *Am. J. Clin. Nutr.* 42: 317-322.

- Birt DF. (1986).** Update on the effects of vitamins A, C and E and selenium on carcinogenesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 183: 311-320.
- Boeryd B and Hallgren B. (1986).** The incidence of spontaneous mammary adenocarcinoma in C3H mice is influenced by dietary fat given from weaning and given to the mothers during gestation and lactation. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scan. Section A* 94: 237-241.
- Boissonneault GA, et al. (1986).** Net energy effects of dietary fat on chemically induced mammary carcinogenesis in F344 rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 76: 335-338.
- Bollag W and Hartmann HR. (1987).** Inhibition of rat mammary carcinogenesis by an arotinoid without a polar end group. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 23: 131-135.
- Bostock DE. (1975).** The prognosis following the surgical excision of canine mammary neoplasms. *Eur. J. Cancer* 11: 389-396.
- Boyd NF, et al. (1992).** Dietary fat and breast cancer risk: the feasibility of a clinical trial of breast cancer prevention. *Lipids* 27: 821-826.
- Boyd NF, et al. (1993).** A meta-analysis of studies of dietary fat and breast cancer risk. *Br. J. Cancer* 68: 627-636.
- Braden LM and Carroll KK. (1986).** Dietary polyunsaturated fat in relation to mammary carcinogenesis in rats. *Lipids* 21: 285-288.
- Brandes D, et al. (1966).** Role of lysosomal labilizers in treatment of mammary gland carcinomas with cyclophosphamide. *Cancer Chemother. Rep.* 50: 47-53.
- Brisson J, et al. (1989).** Diet, mammographic features of breast tissue and breast cancer risk. *Am. J. Epidemiol* 130: 14-24.
- Brodey RS, et al. (1983).** Canine mammary gland neoplasm. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 19: 61-90.
- Broghamer WL, et al. (1976).** Relationship between serum selenium levels and patients with carcinoma. *Cancer* 37: 1384-1388.
- Brown RR. (1981).** Effects of dietary fat on incidence of spontaneous and induced cancer in mice. *Cancer Res.* 41: 3741-3742.
- Bruning PF. (1987).** Endogenous estrogens and breast cancer: a possible relationship between body fat distribution and estrogen availability. *J. Steroid. Biochem.* 27: 487-492.
- Burke BS. (1947).** The dietary history as a tool in research. *J. Am. Diet. Assoc.* 23: 1041-1046.
- Byers T, et al. (1983).** A case-control study of dietary and non dietary factors in ovarian cancer. *J. Natl. Cancer. Inst.* 71: 681-686.
- Byers T and Perry G. (1992).** Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Annu. Rev. Nutr.* 12: 139-159.

- Cairns J. (1981). The origin of human cancers. *Nature*, 289: 353-357.
- Calafat J, et al. (1977). Feline malignant mammary tumours. III. Presence of C particles and intracisternal A-particles and their relationship with feline leukemia virus2 antigens and RD-144 virus antigens. *Int. J. Cancer* 20: 759-767.
- Cameron E, et al. (1989). Divergent effects of w6 and w3 fatty acids on mammary tumor development in C3H/Heston mice treated with DMBA. *Nutr. Res.* 9: 383-393.
- Cardiff RD, et al. (1977). Biology of breast neoplasia. *Cancer* 39: 2734-2746.
- Carroll KK and Khor HT. (1970). Effects of dietary fat and dose level of 7,12-dimethylbenz(a)-anthracene on mammary tumour incidence in rats. *Cancer Res.* 30: 2260-2264.
- Carroll KK and Khor HT. (1971). Effects of level and type of dietary fat on incidence of mammary tumours induced in female Sprague-Dawley rats by 7,12-dimethylbenz(a)-anthracene. *Lipids* 6: 415-420.
- Carroll KK and Khor HT. (1975). Dietary fat in relation to tumorigenesis. *Prog. Biochem. Pharmacol.* 10: 308-353.
- Carroll KK. (1977). Dietary factors in hormone-dependent cancers. En: Winick M. Current concepts in nutrition. *Nutrition and cancer*. Vol 6. Ed: John Wiley and Sons, New York. 25-40.
- Carroll KK and Hopkins GJ. (1979). Dietary polyunsaturated fat versus saturated fat in relation to mammary carcinogenesis. *Lipids* 14: 155-158.
- Carroll KK. (1985). Diet and breast cancer: experimental approaches. *Int. Congr. Ser.* 685: 265-273.
- Carroll KK. (1986). Dietary fat and cancer: specific action or caloric effect?. *J. Nutr.* 116: 1130-1132.
- Carroll KK and Noble RL. (1987). Dietary fat in relation to hormonal induction of mammary and prostatic carcinoma in Nb rats. *Carcinogenesis* 8(6): 851-853.
- Carroll KK. (1992). Dietary fat and breast cancer. *Lipids* 27: 793-797.
- Carter CA, et al. (1983). Effect of the prostaglandin synthetase inhibitor indomethacin on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene- induced mammary tumorigenesis in rats fed different levels of fats. *Cancer Res.* 43: 3559-3562.
- Casey HW, et al. (1979). Mammary neoplasia in animals. Pathologic aspects and the effect of contraceptive steroids. *Rec. Res. Cancer. Res.* 66: 129-160.
- Chrisp CE and Spangler WL. (1980). The malignant canine tumor as a model for the study of human breast cancer. En: Shifrine M and Wilson FD. *The canine as a Biomedical Research Model*. Ed: DOE Technical Information Center, Oak Ridge, TN. 331-349.
- Clark GM, et al. (1989). Prediction of relapse or survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry. *N. Engl. J. Med.* 320: 627-633.
- Clinton SK, et al. (1979). Dietary protein, aryl hydrocarbon hydroxylase and chemical carcinogenesis in rats. *J. Nutr.* 109: 55-62.

- Clinton SK, et al. (1980). Dietary protein and mixed function oxidase activity: En: Clinton SK. Microsomes, drug oxidations, and carcinogenesis. Ed: Academic Press, New York. 1129-1132.
- Clinton SK, et al. (1986). Effects of dietary protein, fat and energy intake during an initiation phase study of 7,12-dimethylbenzanthracene-induced breast cancer in rats. *J. Nutr.* 116: 2290-2302.
- Clinton SK, et al. (1988). The combined effects of dietary protein and fat intake during the promotion phase 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced breast cancer in rats. *J. Nutr.* 118: 1577-1585.
- Coates JR, et al. (1988). Serum levels of selenium and retinol and the subsequent risk of cancer. *Am. J. Epidemiol.* 128: 515-523.
- Cohen LA, et al. (1981). The role of a high-fat diet in enhancing the development of mammary tumours of ovariectomized rats. *Cancer* 47: 66-71.
- Cohen LA and Chan PC. (1982). Dietary cholesterol and experimental mammary cancer development. *Nutr. Cancer* 4: 99-106.
- Cohen LA, et al. (1984). Influence of dietary medium-chain triglycerides on the development of N-methylnitrosourea-induced rat mammary tumors. *Cancer Res.* 44: 5023-5028.
- Cohen LA, et al. (1986). Dietary fat and mammary cancer. I. Promoting effects of different dietary fats on N-nitrosomethylurea-induced rat mammary tumorigenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 77: 33-42.
- Cohen LA and Thompson DO. (1987). The influence of dietary medium chain triglycerides on rat mammary tumour development. *Lipids* 22: 455-461.
- Cohen LA, et al. (1988). Influence of dietary fat, caloric restriction and voluntary exercise on N-nitrosomethylurea-induced mammary tumorigenesis in rats. *Cancer Res.* 48: 4276-4283.
- Cohen LA, et al. (1991). Modulation of MNU-induced mammary tumour promotion by dietary fiber and fat. *J. Natl. Cancer Inst.* 83: 496-501.
- Cohen LA, et al. (1993). A rationale for dietary intervention in postmenopausal breast cancer patients: an update. *Nutr. Cancer* 19: 1-10.
- Comstock GW, et al. (1992). Serum retinol, beta-carotene, vitamin E, and selenium as related to subsequent cancer of specific sites. *Am. J. Epidemiol.* 135: 115-121.
- Connannon PW, et al. (1981). Gross and histopathologic effects of medroxyprogesterone acetate and progesterone on the mammary glands of adult female beagle bitches. *Fert. Steril.* 36: 373-387.
- Cornelisse CJ, et al. (1983). DNA ploidy analysis and cytological examination of sorted cell populations from human breast tumors. *Anal. Quant. Cytol.* 5: 173-183.
- Cornelisse CJ, et al. (1984). Image and flow cytometric analysis of DNA content in breast cancer. Relation to estrogen receptor content and lymph node involvement. *Anal. Quant. Cytol.* 6: 9-18.
- Cotran, et al. (1990). Neoplasias. En: Cotran, Kumar and Robbins. *Patología estructural y funcional* (4ª Ed). Ed: Interamericana McGraw-Hills, Madrid. 247-315.

- Coulson PB, et al. (1984). Prognostic indicators including DNA histogram type, receptor content, and staging related to human breast cancer patient survival. *Cancer Res.* 44: 4187-4196.
- Cowan LD, et al. (1990). Cancer mortality and lipid and lipoprotein levels: the Lipid Research Clinics Program Mortality Follow-up Study. *Am. J. Epidemiol.* 131: 468-482.
- Cummings JH. (1986). Dietary carbohydrates and cancer. *Nutr. Cancer* 8: 10-14.
- Chevallier B, et al. (1988). Prognostic value of estrogen and progesterone receptors in operable breast cancer. *Cancer* 62: 2517-2524.
- Chan P, et al. (1977). Influence of dietary fat on the induction of mammary tumours by N-nitrosomethylurea: Associated hormone changes and differences between Sprague-Dawley and F344 rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 59: 1279-1283.
- Chan P, et al. (1983). Effects of different dietary fats on mammary carcinogenesis. *Cancer Res.* 43: 1079-1083.
- Christov K, et al. (1989). DNA aneuploidy and cell proliferation in breast tumours. *Cancer* 64: 673-679.
- D'Arville CN and Pierrepoint CG. (1979). The demonstration of oestrogen, androgen and progesterone receptors in the cytosol fraction of canine mammary tumours. *Eur. J. Cancer* 15: 875-883.
- Davidson MB and Carroll KK. (1982). Inhibitory effect of a fat-free diet on mammary carcinogenesis in rats. *Nutr. Cancer* 3: 207-215.
- de Moor P and Joosens JV. (1970). An inverse relation between body weight and the activity of the steroid binding β globulin in human plasma. *Steroidologia* 1: 129-136.
- de Ridder CM, et al. (1991). Dietary habits, sexual maturation, and plasma hormones in pubertal girls: a longitudinal study. *Am. J. Clin. Nutr.* 54: 805-814.
- de Waard F, et al. (1964). The bimodal age distribution of patients with mammary carcinoma. *Cancer* 17: 141-151.
- de Waard F. (1975). Breast cancer incidence and nutrition status with particular reference to body weight and height. *Cancer Res.* 35: 3351-3356.
- de Waard F, et al. (1977). Breast cancer incidence according to weight and height in two cities of the Netherlands and in Aichi prefecture, Japan. *Cancer* 40: 1269-1275.
- de Waard F. (1982). Nutritional etiology of breast cancer: where are we now, where are we going?. *Nutrition and cancer* 4: 85-89.
- de Waard F. (1991). Endocrine aspects of cancer: an epidemiological approach. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 40: 15-19.
- del Bino G, et al (1987). DNA ploidy of human breast cancer. *Anal. Cell. Pathol.* 1: 215-223.
- Devilee P and Cornelisse CJ. (1990). Genetics of human breast cancer. *Cancer Surveys* 9: 605-630.

- Dorn CR, et al. (1968).** Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *J. Natl. Cancer Inst.* 40: 307-18.
- Dowle CS, et al. (1987).** Prognostic significance of the DNA content of human breast cancer. *Br. J. Surg.* 74: 133-136.
- Dressler LG, et al. (1988).** DNA flow cytometry and prognostic factors in 1331 frozen breast cancer specimens. *Cancer* 61: 420-427.
- Dutrillaux B, et al. (1991).** Breast cancer genetic evolution I. Data from cytogenetics and DNA content. *Breast Cancer Res. and Treat.* 19: 245-255.
- Dyer AR, et al. (1981).** Serum cholesterol and risk of death from cancer and other causes in three Chicago epidemiological studies. *J. Chronic Dis.* 34: 249-260.
- El Etreby MF, et al. (1980).** The role of the pituitary gland in spontaneous canine mammary tumorigenesis. *Vet. Pathol.* 17: 2-16.
- Else RW and Hannant D. (1979).** Some epidemiological aspects of mammary neoplasia in the bitch. *Vet. Rec.* 104: 296-304.
- Erhardt K and Auer G. (1986).** Mammary carcinoma: DNA analysis in areas showing different histological features in the same tumor. *Acta. Path. Microbiol. Immunol. Scand. Section A* 94: 21-28
- Erickson KL and Thomas IK. (1985).** The role of dietary fat in mammary tumorigenesis. *Food Technol.* 39: 69-73.
- Eskelinen MJ, et al. (1989).** Relationship between DNA ploidy and survival in patients with primary breast cancer. *Br. J. Surg.* 76: 830-834.
- Ewers SB, et al. (1984).** Flow -cytometric DNA analysis in primary breast carcinomas and clinicopathological correlations. *Cytometry* 5: 408-419.
- Fécher GE, et al. (1988).** Correlation of DNA flow cytometric results and other prognostic factors in primary breast cancer. *Int. J. Cancer* 41: 823-828.
- Fernandes G and Venkatraman JT (1993).** Role of omega-3 fatty acids in health and disease. *Nutr. Res.* 13: 19-45.
- Fërno M, et al. (1992).** Flow cytometric DNA index and S-phase fraction in breast cancer in relation to other prognostic variables and to clinical outcome. *Acta oncol.* 31: 157-165.
- Fico ME, et al. (1986).** Differential effects of selenium on normal and neoplastic canine mammary cells. *Cancer Res.* 46: 3384-3388.
- Fico M and Milner JA. (1991).** In vitro effects of selenodiglutathione on canine mammary cells. *J. Nutr. Biochem.* 2: 560-564.
- Fisher B, et al. (1991).** DNA flow cytometric analysis of primary operable breast cancer. *Cancer (Phila)* 68: 1465-1475.

- Fisher ER and Paulson JD (1992).** Karyotypic abnormalities in precursor lesions of human cancer of the breast. *Am. J. Clin. Pathol.* 69: 284-288.
- Fisher ER, et al. (1980).** Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (Protocol n° 4). VI. Invasive papillary cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* 73: 313-322.
- Fisher SM, et al. (1992).** Differential effects of dietary linoleic acid on mouse skin-tumor promotion and mammary carcinogenesis. *Cancer Res.* 52: 2049-2054.
- Foulds, L. (1975).** Neoplastic Development. Foulds L. Ed: Academic Press, New York.
- Fowler EH, et al. (1974).** Biologic behaviour of canine mammary neoplasms based on a histogenetic classification. *Vet. Pathol.* 11: 212-229.
- Freedman LS, et al (1990).** Analysis of dietary fat, calories, body weight and the development of mammary tumours in rats and mice: a review. *Cancer Res.* 50: 5710-5719.
- Fried J. (1976).** Method for the quantitative evaluation of data from flow microfluorometry. *Com. Biomed. Res.* 9: 263-276.
- Frierson HF. (1991).** Ploidy analysis and S-phase fraction determination by flow cytometry of invasive adenocarcinomas of the breast. *Am. J. Surg. Pathol.* 15: 358-367.
- Frierson HF. (1993).** Grade and flow cytometric analysis of ploidy for infiltrating ductal carcinomas. *Hum. Pathol.* 24: 24-29.
- Frisch RE and McArthur WJ. (1974).** Menstrual cycles: fatness as a determinant of minimum weight for height necessary for their maintenance or onset. *Science (Washington DC)* 185: 949-951.
- Gammal EB, et al. (1967).** Effects of dietary fat on mammary carcinogenesis by 7,12-dimethylbenzanthracene. *Cancer Res.* 27: 1734-1742.
- Garland M, et al. (1993).** Antioxidant micronutrients and breast cancer. *J. Am. Coll. Nutr.* 12: 400-411.
- Gaskill SP, et al. (1979).** Breast cancer mortality and diet in the United States. *Cancer Res.* 39: 3628-3637.
- Gilbertson SR, et al. (1983).** Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Vet. Pathol.* 20: 127-142.
- Giovarelli M, et al. (1980).** Strain-and sex-linked effects of dietary polyunsaturated fatty acids on tumor growth and immune functions in mice. *Cancer Res.* 40: 3745-3749.
- Goldin BR, et al. (1981).** Effect of diet on excretion of estrogens in pre-and postmenopausal women. *Cancer Res.* 41: 3771-3773.
- Goldin BR, et al. (1986).** The relation between estrogen levels and diets of Caucasian American and Oriental immigrant women. *Am. J. Clin. Nutr.* 44: 945-953.
- Goldin BR and Gorbach SL. (1988).** Effect of diet on the plasma levels, metabolism and excretion of estrogens. *Am. J. Clin. Nutr.* 48: 787-790.

- Goodman MT, et al. (1992).** The association of diet, obesity, and breast cancer in Hawaii. *Cancer Epidemiol. biomark. and prev.* 1: 269-275.
- Goodwin PJ and Boyd NF. (1987).** Critical appraisal of the evidence that dietary fat intake is related to breast cancer risk in humans. *J. Natl. Cancer Inst.* 79: 473-485.
- Graham S, et al. (1972).** Alimentary factors in the epidemiology of gastric cancer. *Cancer* 30: 927-938.
- Graham S, et al. (1982).** Diet in the epidemiology of breast cancer. *Am. J. Epidemiol.* 116: 68-75.
- Graham S, et al. (1991).** Nutritional epidemiology of postmenopausal breast cancer in western New York. *Am. J. Epidemiol.* 134: 552-566.
- Graham S, et al. (1992).** Diet in the epidemiology of postmenopausal breast cancer in the New York State cohort. *Am. J. Epidemiol.* 136: 1327-1337.
- Gray GE, et al. (1979).** Breast cancer incidence and mortality rates in different countries in relation to known risk factors and dietary practices. *Br. J. Cancer* 39: 1-7.
- Gridley DS, et al. (1983).** Modification of spontaneous mammary tumors in mice fed different sources of protein, fat and carbohydrate. *Cancer Lett.* 19: 133-146.
- Gulliver WP, et al. (1983).** In vitro interaction of 7,12-dimethylbenzanthracene and its biliary metabolites with dietary fibers. *J. Natl. Cancer. Inst.* 71: 207-210.
- Grubbs CJ, et al. (1990).** Effect of retinyl acetate 4-hydroxyphenilretinamide on initiation of chemically induced mammary tumors. *Anticancer Res.* 10: 661-666.
- Halter SA, et al. (1990).** Selective Isolation of human breast carcinoma cells resistant to the growth-inhibitory effects of retinol. *Nutr. Cancer* 14: 43-56.
- Hamilton JH. (1974).** A review of recent advances in the study of the aetiology of canine mammary tumours. *Vet. Annu.* 15: 276-283.
- Hampe JF and Misdorp W. (1974).** IX. Tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 50: 111-133.
- Harris H. (1988).** The analysis of malignancy by cell fusion: The position in 1988. *Cancer Res.* 48: 3302-3306.
- Hatschek T, et al. (1989).** Cytometric characterization and clinical course of breast cancer diagnosed in a population -based screening program. *Cancer* 64: 1074-1081.
- Hawrylewicz EJ, et al. (1982).** Enhancement of 7, 12-dimethylbenzanthracene (DMBA) mammary tumorigenesis by high dietary protein in rats. *Nutr. Rept. Int.* 26: 793-806.
- Hawrylewicz EJ. (1986).** Fat protein interaction, defined 2-generation studies. En: Ip C, Birt A, Rogers A and Mettlin C. *Dietary fat and cancer.* Ed: Alan R Liss, New York. 403-433.
- Heady JA. (1961).** Diet of bank clerks: Development of a method of classifying the diets of individuals for use in the epidemiological studies. *J. R. Stat. Soc. (A)* 124: 361-366.

- Hedley DW, et al. (1983).** Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathologic material using flow cytometry. *J. Histochem. Cytochem.* 31: 1333-1335.
- Hedley DW, et al. (1987).** Association of DNA index and S-phase fraction with prognosis of nodes positive early breast cancer. *Cancer Res.* 47: 4729-4735.
- Hellmén E, et al. (1988).** Comparison of histology and Clinical Variables to DNA Ploidy in Canine Mammary Tumours. *Vet. Pathol.* 25: 219-226.
- Hellmén E and Lindgren A. (1989).** The accuracy of cytology in diagnosis and DNA analysis of canine mammary tumors. *J. Comp. Pathol.* 101: 443-450.
- Helmrich SP, et al. (1983).** Risk factors for breast cancer. *Am. J. Epidemiol.* 117: 35-45.
- Hems G. (1978).** The contributions of diet and childbearing to breast cancer rates. *Br. J. Cancer* 37: 974-982.
- Hems G. (1980).** Associations between breast cancer mortality rates, child bearing and diet in the United Kingdom. *Br. J. Cancer* 41: 429-437.
- Hems G and Stuart. (1975).** Breast cancer rates in populations of single women. *Br. J. Cancer* 31: 118-123.
- Hiatt RA, et al. (1982).** Breast cancer and serum cholesterol. *J. Natl. Cancer Inst.* 68: 885-889.
- Hiddemann W, et al. (1984).** Convention on nomenclature for DNA cytometry. *Cytometry* 5: 445-446.
- Hiddeman W, et al. (1986).** DNA stemline heterogeneity in colorectal cancer. *Cancer* 58: 258-263.
- Hill P, et al. (1977).** Diet and endocrine-related cancer. *Cancer (Phila.)* 39: 11820-1826.
- Hill DL and Grubbs CJ. (1982).** Retinoids as chemopreventive and anticancer agents in intact animals. *Anticancer Res.* 2: 111-124.
- Hill DL and Sani BP. (1991).** Metabolic disposition and development of new chemopreventive retinoids. *Drug Metab. Rev.* 23: 313-318.
- Hirayama T. (1978).** Epidemiology of breast cancer with specific reference to the role of diet. *Prev. Med.* 7: 173-195.
- Hirohata T, et al. (1985).** Occurrence of breast cancer in relation to diet and reproductive history: A case-control study in Fukuoka, Japan. *Natl. Cancer Inst. Monograf* 69: 187-190.
- Hirohata T, et al (1987).** An epidemiologic study on the association between diet and breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 78: 595-600.
- Hislop TG, et al. (1986).** Childhood and recent eating patterns and risk of breast cancer. *Cancer Detect. Prev.* 9: 47-58.
- Hislop TG, et al. (1990).** Diet and histologic types of benign breast diseases defined by subsequent risk of breast cancer. *Am. J. Epidemiol.* 131: 263-270.

- Hopkins GJ and West CE. (1977). Effect of dietary polyunsaturated fat on the growth of transplantable adenocarcinoma in C3HA fB mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 58: 753-756.
- Hopkins GJ, et al. (1976). Effect of dietary fats on the incidence of 7,12-dimethylbenzanthracene induced tumors in rats. *Lipids* 11: 328-333.
- Hopkins GJ, et al. (1981). Polyunsaturated fatty acids as promoters of mammary carcinogenesis induced in Sprague-Dawley rats by 7,12-dimethylbenzanthracene. *J. Natl. Cancer Inst.* 66: 517-522.
- Howe GR, et al. (1986). Total energy intake: implications for epidemiologic analyses by Willett and Stampfer (letter). *Am. J. Epidemiol.* 124: 157-159.
- Howe GR, et al. (1990). Dietary factors and risk of breast cancer: combined analysis of 12 case-control studies. *J. Natl. Cancer Inst.* 7: 561-569.
- Howe GR, et al. (1991). A cohort study of fat intake and risk of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 83: 336-340.
- Howe GR. (1992). High fat diet and breast cancer risk. *J. Am. Med. Assoc.* 286: 2080-2081.
- Hubbard NE, et al. (1988). Inhibition of growth and linoleate-enhanced metastasis of a transplantable mouse mammary tumor by indomethacin. *Cancer Lett.* 43: 111-120.
- Hunter DJ and Willett. (1993). Diet and body built. *Epidemiol. reviews* 15: 110-132.
- Hursting SD, et al. (1990). Types of dietary fat and the incidence of cancer at five sites. *Prev. Med.* 19: 242-253.
- Ingram DM, et al. (1991). The role of diet in the development of breast cancer: a case-control study of patients with breast cancer, benign epithelial hyperplasia and fibrocystic disease of the breast. *Br. J. Cancer* 64: 187-191.
- Ip C and Ip MM (a). (1980). Inhibition of mammary tumorigenesis by a reduction of fat intake after carcinogen treatment in young versus adult rats. *Cancer Lett.* 11: 35-42.
- Ip C and Sinha D. (1981). Anticarcinogenic effect of selenium in rats treated with dimethylbenzanthracene and fed different levels and type of fat. *Carcinogenesis (Lond)* 2: 435-438.
- Ip C, et al. (1985). Requirement of essential fatty acid for mammary tumorigenesis in the rat. *Cancer Res.* 45: 1997-2001.
- Ip C and Hayes C. (1989). Tissue selenium levels in selenium-supplemented rats and their relevance in mammary cancer protection. *Carcinogenesis* 10: 921-925.
- Ip C. (1990). Quantitative assessment of fat and calories as risk factors in mammary carcinogenesis in an experimental model. *Prog. Clin. Biol. Res.* 346: 107-117.
- Ip C, et al. (1992). Mammary cancer prevention by regular garlic selenium-enriched garlic. *Nutr. Cancer.* 17: 279-286.

- Jakohsen A, et al. (1984). Ploidy level of human breast carcinoma. *Acta Radiol. Oncol.* 23: 103-107.
- Jacobson EA, et al. (1988). Effects of dietary fat on long-term growth and mammary tumorigenesis in female Sprague-Dawley rats given a low dose of DMBA. *Nutr. Cancer* 11: 221-227.
- Joensuu H, et al. (1990). Evidence for false aneuploid peaks in flow cytometry analysis of paraffin-embedded tissue. *Cytometry* 11: 431-437.
- Jones DY, et al. (1987). Dietary fat and breast cancer in the National Health and Nutrition Examination Survey I Epidemiologic Follow-up study. *J. Natl. Cancer Inst.* 79: 465-471.
- Kaizer L, et al. (1989). Fish consumption and breast cancer risk: an ecological study. *Nutr. and Cancer* 12: 61-68.
- Kallioniemi OP, et al. (1987). Tumour DNA ploidy as an independent prognostic factor in breast cancer. *Br. J. Cancer* 56: 637-642.
- Kallioniemi OP, et al. (1988). Improving the prognostic value of DNA flow cytometry in breast cancer by combining DNA index and S-phase fraction. A proposed classification of DNA histograms in breast cancer. *Cancer* 62: 2183-2190.
- Karmali RA, et al. (1984). Effect of omega-3 fatty acids on growth of a rat mammary tumor. *J. Natl. Cancer Inst.* 73: 457-461.
- Kato I, et al. (1992). A case-control study of breast cancer among Japanese women: with special reference to family history and reproductive and dietary factors. *Breast Cancer Res. and Treat.* 24: 51-59.
- Katsouyanni K, et al. (1988). Risk of breast cancer among Greek women in relation to nutrient intake. *Cancer (Phila.)* 61: 181-185.
- Kelsey JL, et al. (1981). Exogenous estrogens and other factors in the epidemiology of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 67: 327-333.
- Keyhani-Rofagha S, et al. (1990). Is DNA ploidy an independent indicator in infiltrative node-negative breast adenocarcinoma. *Cancer* 65: 1577-1582.
- Kitchell BA (1993). Cancer for geriatric dogs and cats. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 23: 41-48.
- Klurfeld DM, et al. (1987). Inhibition of chemically induced mammary and colon tumor promotion by caloric restriction in rats fed increased dietary fat. *Cancer Res.* 47: 2759-2762.
- Klurfeld DM, et al. (1989). Inhibition of DMBA -induced mammary tumorigenesis by caloric restriction in rats fed high fat diets. *Int. J. Cancer* 43: 922-925.
- Knekt P, et al. (1990). Serum selenium and subsequent risk of cancer among Finnish men and women. *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 864-868.
- Koh TS, Benson TH (1983). Critical re-appraisal of the fluorometric method for determination of selenium in biological materials. *J. Asso. Off. Anal. Chem.* 66: 918-926.

- Kolonel LN, et al. (1981). Nutrient intakes in relation to cancer incidence in Hawaii. *Br. J. Cancer* 44(3): 332-339.
- Kort WJ, et al. (1987). ω 3 fatty acids inhibiting the growth of a transplantable rat mammary adenocarcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 79: 593-599.
- Krinsky NI. (1991). Effects of carotenoids in cellular and animal systems. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 238-246.
- Kritchevsky D, et al. (1986). Calories, fat and cancer. *Lipids* 21: 272-274.
- Kritchevsky D, et al. (1984). Dietary fat versus calorie content in initiation and promotion of 7,12-dimethylbenzanthracene in mammary tumorigenesis in rats. *Cancer Res.* 44: 3174-3177.
- Kritchevsky D, et al. (1989). Response of mammary tumors to caloric restriction for different time periods during the promotion phase. *Nutr. Cancer* 12: 259-269.
- Kritchevsky SB. (1992). Dietary lipids and the low blood cholesterol-cancer association. *Am. J. Epidemiol* 135: 509-519.
- Kromman N and Green A. (1980). Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland: incidence of some chronic diseases 1950-1974. *Acta Med. Scan.* 208: 401-406.
- Kuchan MJ and Milner JA. (1992). Influence of intracellular glutathione on selenite-mediated growth inhibition of canine mammary tumour cells. *Cancer Res.* 52: 1091-1095.
- Kurzman ID and Gilberston SR. (1986). *Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)* 1: 25-32.
- Kushi LH, et al. (1992). Dietary fat and postmenopausal breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 84: 1092-1099.
- Lasekan JB, et al. (1990). Dietary olive and safflower oils in promotion of DMBA-induced mammary tumorigenesis in rats. *Nutr. Cancer* 13: 153-163.
- Lee HP, et al. (1991). Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. *The Lancet* 337: 1197-1200.
- Levack PA, et al. (1987). DNA analysis of breast tumour fine needle aspirates using flow cytometry. *Br. J. Cancer* 56: 643-646.
- Lew EA and Garfinkel L. (1979). Variations in mortality by weight among 750,000 men and women. *J. Chronic Dis.* 32: 563-576.
- Lewis WE. (1990). Prognostic significance of flow cytometric DNA analysis in node-negative breast cancer patients. *Cancer* 65: 2315-2320.
- Lin TM, et al. (1971). Epidemiologic characteristics of cancer of the breast in Taiwan. *Cancer* 27: 1497-1504.
- London SJ, et al. (1992). Carotenoids, retinol, and vitamin E and risk of proliferative benign breast disease and breast cancer. *Cancer Causes and Control* 3: 503-512.
- London SJ, et al. (1993). Fatty acid composition of the subcutaneous adipose tissue and risk of proliferative benign breast disease and breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 85: 785-793.

- Lubin JH, et al. (1981). Dietary factors and breast cancer risk. *Int. J. Cancer* 28: 685-689.
- Lubin F, et al. (1986). Role of fat, animal protein, and dietary fiber in breast cancer etiology: a case-control study. *J. Natl. Cancer Inst.* 77: 605-612.
- Lubin F, et al. (1985). Overweight and changes in weight throughout adult life in breast cancer etiology. *Am. J. Epidemiol.* 122: 579-588.
- Lykkesfeldt AE, et al. (1988). DNA ploidy and S-phase fraction in primary breast carcinomas in relation to prognostic factors and survival for premenopausal patients at high risk for recurrent disease. *Acta Oncol.* 27: 749-756.
- MacEwen EG and Withrow SJ. (1989). Tumours of the mammary gland. En: Withrow SJ and MacEwen EG. *Clinical Veterinary Oncology*. Ed: Lippincott Company, Philadelphia, Pennsylvania. 292-304.
- Magdelénat H. (1991). Needle Aspiration Biopsy and Flow Cytometry, 7-17. En: Vielh P. *Flow Cytometry*. Ed: Igaku-Shoin, New York. 7-19.
- Maiorana A, et al. (1980). Effect of retinyl acetate on the incidence of mammary carcinomas and hepatomas in mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 64: 655-661.
- Malarkey WB, et al. (1977). Twenty-four hour preoperative endocrine profiles in women with benign and malignant breast disease. *Cancer Res.* 37: 4655-4699.
- Mansfield CM. (1993). A review of the etiology of breast cancer. *J. Natl. Med. Assoc.* 85: 217-221.
- Manni A and Wright C. (1985). Polyamines as mediators of the effect of prolactin and growth hormone on the growth of N-nitroso-N-methylurea-induced rat mammary tumor cultured in vitro in soft agar. *J. Natl. Cancer Inst.* 74: 941-944.
- Marshall JR, et al. (1992). Additional ecological evidence: lipids and breast cancer mortality among women aged 55 and over in China. *Eur. J. Cancer* 28 A: 1720-1727.
- Marubini E, et al. (1988). The relationship of dietary intake and serum levels of retinol and beta carotene with breast cancer. Results of a case-control study. *Cancer* 61: 173-180.
- McConnell KP, et al. (1980). The relationship of dietary selenium and breast cancer. *J. Surg. Oncol.* 15: 67-70.
- McCormick D, et al. (1980). Inhibition of rat mammary carcinogenesis by short dietary exposure to retinyl acetate. *Cancer Res.* 40: 1140-1143.
- McCormick DL, et al. (1982). Inhibition of mammary and urinary bladder carcinogenesis by a retinoid and a maleic anhydride-divinyl ether copolymer (MVE-2). *Carcinogenesis* 3: 1473-1477.
- McDivitt RW, et al. (1986). A proposed classification of breast cancer based on kinetic information: derived from a comparison of risk factors in 168 primary operable breast cancers. *Cancer* 57: 269-276.
- MacEwen EG, et al. (1982). Estrogen receptors in canine mammary tumors. *Cancer Res.* 42: 2255.

MacEwen EG and Withrow SJ. (1989). Tumours of the mammary gland. En: Withrow SJ and MacEwen EG. *Clinical Veterinary Oncology*. Ed: JB Lippincott, Grand Rapids. 292-304.

Medina D and Shepherd F. (1980). Selenium-mediated inhibition of mouse mammary tumorigenesis. *Cancer Lett.* 8: 241-245.

Medina D, et al. (1983). Selenium and mouse mammary tumorigenesis: an investigation of possible mechanisms. *Cancer Res. (suppl)* 43: 2460-2464.

Medina D and Oborn CJ. (1984). Selenium inhibition of DNA synthesis in mouse mammary epithelial cell line YN-4. *Cancer Res.* 44: 4361-4365.

Medina D, et al. (1985). Selenium retention and inhibition of cell growth in mouse mammary epithelial cell lines in vitro. *Biol. Trace Element Res.* 8: 19-35.

Mehta RG, et al. (1988). Metabolism of the chemopreventive retinoid N-(4-hydroxyphenyl)retinamide by mammary gland in organ culture. *Biochem. J.* 256: 579-584.

Mendelsohn ML, et al. (1973). DNA content and DNA-based centromeric index of the 24 human chromosomes. *Science* 179: 1126-1129.

Merkel DE and McGuire WL. (1990). Ploidy, proliferative activity and prognosis. DNA flow cytometry of solid tumors. *Cancer (Phila.)* 65: 1194-1205.

Metalfe LD, et al. (1966). Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatography analysis. *Anal. Chem.* 18: 514-515.

Meyer JS, et al. (1986). Breast carcinoma cell kinetics, morphology, stage and host characteristics. *Lab. Invest.* 54: 41-51.

Meyer F and Verreault R. (1987). Erythrocyte selenium and breast cancer risk. *Am. J. Epidemiol.* 125: 917-919.

Mialot JP, et al. (1982). Étude de récepteurs des hormones stéroïdes dans les tumeurs mammaires de la chienne. I, II. *Rec. de Med. Vet.* 158: 215-513.

Micozzi MS, et al. (1990). Carotenoid analyses of selected raw and cooked foods associated with a lower risk for cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 282-285.

Miller AB, et al. (1978). A study of diet and breast cancer. *Am. J. Epidemiol.* 107: 499-509.

Mills PK, et al. (1989). Dietary habits and breast cancer incidence among seventh-day adventist. *Cancer* 64: 582-590.

Misdorp W, et al. (1973). Canine malignant mammary tumors. *Vet. Pathol.* 10: 241-256.

Misdorp W and Hart AAM. (1976). Prognostic factors in canine mammary cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 56: 779-786.

- Misdorp W. (1976).** Histological classification and further characterization of tumours in domestic animals. *Adv. in Vet. Sci. and Comp. Med.* 20: 191-221.
- Misdorp W. (1987).** The impact of pathology on the study and treatment of cancer. En: Theilen GH y Madewell BR. *Veterinary Cancer Medicine.* (2nd ed). Ed: Lea and Febiger, Philadelphia. 53-70.
- Misdorp W. (1988).** Canine mammary tumours: protective effect of late ovariectomy and stimulating effect of progestins. *Vet. Quart.* 210: 26-33.
- Moon R, et al. (1977).** Retinyl acetate inhibits mammary carcinogenesis induced by N- methyl- N- nitrosourea. *Nature* 267: 620-621.
- Moon RC, et al. (1983).** Inhibition of carcinogenesis by retinoids. *Cancer Res.* 43: 2469-2475.
- Moon RC. (1989).** Comparative aspects of carotenoids and retinoids as chemopreventive agents for cancer. *J. Nutr.* 119: 127-134.
- Moore JW, et al. (1982).** Serum concentration of total and non-protein-bound oestradiol in patients with breast cancer and in normal controls. *Int. J. Cancer* 29: 17-21.
- Moran RE, et al. (1984).** Correlation of cell-cycle kinetics, hormone receptors, histopathology, and nodal status in human breast cancer. *Cancer* 54: 1586-1590.
- Morrison DG, et al. (1988).** Selenium distribution in mammary epithelial cells reveals its possible mechanism of inhibition of cell growth. *Anticancer Res.* 8: 51-64.
- Moulton JE, et al. (1970).** Canine mammary tumours. *Vet. Pathol.* 7: 289-320.
- Moulton JE, et al. (1986).** Mammary tumours in a colony of beagle dogs. *Vet. Pathol.* 23: 741-749.
- Myc A. (1991).** Perspectives. En: Vielh P. *Flow cytometry.* Ed: Igaku-Shoin, New York. 119-138.
- National Research Council Committee on Diet and Health, Food and Nutrition Board, Commission on Life Sciences. (1989).** *Diet and Health.* Washington, DC: Natl Acad Press.
- National Academy of Sciences. (1980).** *Toward Healthful diets,* National Academy Press. Washington DC.
- National Academy of Sciences. (1982).** *Committee on Diet, Nutrition and Cancer.* National Research Council, Diet, Nutrition and Cancer, National Academy Press, Washington DC.
- Nomura A, et al. (1978).** Breast cancer and diet among the Japanese in Hawaii. *Am. J. Clin. Nutr.* 31: 2020-2025.
- Olson LM, et al. (1987).** Lymphocyte activation, cell-mediated cytotoxicity and their relationship to dietary fat-enhanced mammary tumorigenesis in C3H/OUJ mice. *J. Nutr.* 117: 955-963.
- Ong D and Clytil F. (1983).** Vitamin A and Cancer. *Vit. Horm.* 40: 105-144.
- O'Reilly SM, et al. (1990).** DNA index, S-phase fraction, histological grade and prognosis in breast cancer. *Br. J. Cancer* 61: 671-674.

- Oppenheimer SB (1985).** Theories of the cause of cancer. En: *Cancer a biological and clinical introduction*. 2nd ed. Ed: Jones and Barlett, Boston. 28-38.
- Overbad K, et al. (1991).** Selenium in human mammary carcinogenesis: a case-cohort study. *Eur. J. Cancer* 27: 900-902.
- Owen LN. (1979).** A comparative study of canine and human breast cancer. *Invest. Cell. Pathol.* 2: 257-75.
- Owen LN. (1980).** TNM classification of tumours in domestic animals. Ed 1ª. WHO, Geneva.
- Paffenbarger RS, et al. (1980).** Characteristics that predict risk of breast cancer before and after the menopause. *Am. J. Epidemiol.* 112: 258-268.
- Pariza MW. (1986).** Caloric restriction, ad libitum feeding and cancer. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 183: 293-298.
- Pariza MW. (1987).** Dietary fat, calorie restriction, ad libitum feeding, and cancer risk. *Nutr. Rev.* 45: 1-7.
- Paul AA and Southgate DAT. (1978).** McCance and Widdowson's the composition of foods. (4th ed) Ed: HMSO, London.
- Peyrat JP, et al. (1984).** Stimulation of DNA synthesis by prolactin in human breast tumor explants. Relation to prolactin receptor. *Anticancer Res.* 4: 257-262.
- Phillips RL. (1975).** Role of life-style and dietary habits in risk of cancer among Seventh-Day adventists. *Cancer Res.* 35: 3513-3522.
- Pitot, HC. (1986).** Fundamentals of Oncology. (3rd ed). Ed: Marcel Dekker, New York.
- Potischman N, et al. (1991).** Associations between breast cancer, plasma triglycerides, and cholesterol. *Nutr. Cancer* 15: 205-215.
- Potischman N, et al. (1990).** The association between breast cancer and plasma and dietary vitamin A and carotenoides. *Am. J. Clin. Nutr.* 52: 909-915.
- Prasad KN and Edwards-Prasad J (1990).** Expressions of some molecular cancer risk factors and their modification by vitamins. *J. Am. Coll. Nutr.* 9: 28-34.
- Prentice RL, et al. (1988).** Aspects of the rationale of the women's health trial. *J. Natl. Cancer Inst.* 80: 802-814.
- Prentice RL and Sheppard L (1990).** Dietary fat and cancer: consistency of the epidemiological data, and disease prevention that may follow from a practical reduction in fat consumption. *Cancer Causes and Control* 1: 81-97.
- Priester WA (1979).** Occurrence of mammary neoplasms in bitches in relation to breed, age, tumour type, and geographical region from which reported. *J. Small Anim. Pract.* 20: 1-11.
- Ramaswamy PG, et al. (1990).** Vitamin and provitamin A levels in epithelial cancers: a preliminary study. *Nutr. Cancer* 14: 273-276.

- Reed MJ, et al. (1983). Plasma levels of estrone, estrone sulfate, and estradiol and the percentage of unbound estradiol in postmenopausal women with and without breast disease. *Cancer Res.* 43: 3940-3943.
- Reddy BS, et al. (1974). Fecal bacterial β -glucuronidase: Control by diet. *Science* 183: 416-417.
- Remvikos Y, et al. (1992). Proliferative activity of breast cancers increases in the course of genetic evolution as defined by cytogenetic analysis. *Breast Cancer Res. and Treat.* 23: 43-49.
- Rigby A, et al. (1992). Biochemical status of vitamin A in patients with malignant and benign breast disease. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 13: 53-61.
- Roberts A and Sporn M. (1984). Cellular biology and biochemistry of retinoids. En: Sporn M, Roberts A and Goodman D. *The retinoids*. Vol 2. Ed: Academic Press, New York. 209-286.
- Rogers AE. (1983). Influence of dietary content of lipids and lipotropic nutrients on chemical carcinogenesis in rats. *Cancer Res.* 43: 2477-2484.
- Rogers AE, et al. (1986). Mammary tumorigenesis in rats fed diets high in lard. *Lipids* 21: 275-280.
- Rohan TE, et al. (1988). A population-based case-control study of diet and breast cancer in Australia. *Am. J. Epidemiol.* 128: 478-489.
- Rohan TE, et al. (1990). A case-control study of diet and benign proliferative epithelial disorders of the breast. *Cancer Res.* 50: 3176-3181.
- Roodenburg ACJ, et al. (1994). Comparison between time-dependent changes in iron metabolism of rats as induced by marginal deficiency of either vitamin A or iron. *Br. J. Nutr.* 71: 687-699.
- Rose DP. (1986). Dietary factors and breast cancer. *Cancer Surveys* 5: 671-687.
- Rose DP and Connolly JM (1993). Effects of dietary omega-3 fatty acids on human breast cancer growth and metastases in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 85: 1743-1747.
- Ross MH and Bras G. (1971). Lasting influence of early caloric restriction on prevalence of neoplasms in the rat. *J. Natl. Cancer Inst.* 47: 1095-1113.
- Ross MH and Bras G. (1973). Influence of protein under-and over nutrition on spontaneous tumour prevalence in the rat. *J. Nutr.* 103: 944-963.
- Rous P. (1914). The influence of diet on transplanted and spontaneous mouse tumours. *J. Exp. Med.* 20: 433-451.
- Rutteman GR, et al. (1988). Flow cytometric analysis of DNA Ploidy in Canine Mammary Tumours. *Cancer Res.* 48: 3411-3417.
- Rutteman GR, et al. (1989). Anterior pituitary function in female dogs with spontaneous mammary tumours. I. Growth hormone. *Anticancer Res.* 9: 235-240.
- Rutteman GR. (1990). Hormones and mammary tumour disease in the female dog. An update. *In vivo* 4: 33-40.

Bibliografita

- Rutteman GR and Cornelisse CJ. (1991).** Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in solid tumours. *Vet. Pathol.* 28: 453-456.
- Sani BP, et al. (1990).** Isolation, partial purification and characterization of nuclear retinoic acid receptor of chick skin. *Arch. Biochem. Biophys.* 283: 107-113.
- Sasaki S, et al. (1993).** An ecological study of the relationship between dietary fat intake and breast cancer mortality. *Prev. Med.* 22: 187-202.
- Scanziani E, et al. (1991).** Flow cytometric analysis of cellular DNA content in paraffin wax-embedded specimens of canine mammary tumours. *J. Comp. Pathol.* 105: 75-82.
- Schatzkin A, et al. (1988).** Site-specific analysis of total serum cholesterol and incident cancer in the National Health and Nutrition Examination Survey I Epidemiologic follow-up study. *Cancer Res.* 48: 452-458.
- Schatzkin A, et al. (1987).** Serum cholesterol and cancer in the NHANES I Epidemiologic follow-up study. *The Lancet* 2: 298-301.
- Schatzkin A, et al. (1989).** The dietary fat-breast cancer hypothesis is alive. *J. Am. Med. Assoc.* 261: 3284-3287.
- Schneider R. (1970).** Comparison of age, sex and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer (Phila.)* 26: 419-426.
- Schneider R, et al. (1969).** Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J. Natl. Cancer Inst.* 43: 1249-1261.
- Schrauzer GN, et al. (1985).** Selenium in the blood of Japanese and American women with and without breast cancer and fibroquistic disease. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* 76: 374-377.
- Selman, et al. (1994).** Progesterin-induced growth hormone excess in the dog originates in the mammary gland. *Endocrinology* 134: 287-292.
- Shackney SE, et al. (1989).** Model for the genetic evolution of human solid tumors. *Cancer Res.* 49: 3344-3354.
- Shackney SE, et al. (1990).** Discrepancies between flow cytometric and cytogenetic studies in the detection of aneuploidy in human solid tumours. *Cytometry* 11: 94-104.
- Shealy YF. (1989).** Synthesis and evaluation of some new retinoids for cancer chemoprevention. *Prev. Med.* 18: 624-645.
- Shekelle RB, et al. (1981).** Dietary vitamin A and risk of cancer in the western electric study. *The Lancet* II: 1185-1190.
- Sherman B, et al. (1981).** Relationship of body weight to menarcheal and menopausal age: implications for breast cancer risk. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 52: 488-493.
- Sherwin RW, et al. (1987).** Serum cholesterol levels and cancer mortality in 361,662 men screened for the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *J. Am. Med. Assoc.* 257: 943-948.

Bibliografía

- Shetty PS and Kurpad AV. (1986).** Increasing starch intake in the human diet increases fecal bulking. *Am. J. Clin. Nutr.* 43: 210-212.
- Shofer FS, et al. (1989).** Histopathologic and dietary prognostic factors for canine mammary carcinoma. *Breast Cancer Res. and Treat.* 13: 49-60.
- Shun-Zhang Y, et al. (1990).** A case-control study of dietary and nondietary risk factors for breast cancer in Shanghai. *Cancer Res.* 50: 5017-5021.
- Sies H. (1990).** Antioxidant defense systems. *Proceedings of the International Conference on Antioxidant vitamins and beta carotene in disease prevention.* London.
- Siiteri PK. (1987).** Adipose tissue as a source of hormones. *Am. J. Clin. Nutr.* 45: 277-282.
- Silverman J, et al. (1980).** Effect of dietary fat on x-ray induced mammary cancer in Sprague-Dawley rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 64: 631-634.
- Silverman J, et al. (1989).** Effects on C3H mouse mammary cancer of changing from a high fat to a low fat diet before, at, or after puberty. *Cancer Res.* 49: 3857-3860.
- Sylvester PW, et al. (1986).** Effects of high dietary fat on the growth and development of ovarian-independent carcinogen-induced mammary tumors in rats. *Cancer Res.* 46: 763-769.
- Silvestrini R, et al. (1985).** Cell kinetics as a prognostic marker in node negative breast cancer. *Cancer* 56: 1982-1987.
- Soini I. (1977).** Risk factors of breast cancer in Finland. *Int. J. Epidemiol.* 6: 365-373.
- Sonnenschein EG, et al. (1991).** Body conformation, Diet, and Risk of Breast Cancer in Pet Dogs: A Case-Control Study. *Am. J. Epidemiol.* 133: 694-703.
- Spiller GA, et al. (1986).** Effect of increasing levels of hard wheat fiber on fecal weight, minerals and steroids and gastro-intestinal transit time in healthy young women. *J. Nutr.* 116: 778-785.
- Spyratos F, et al. (1987).** Flow cytometric study of DNA distribution in cytopunctures of benign and malignant breast lesions. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 9: 485-494.
- Stahelin HB, et al. (1984).** Cancer, vitamins and plasma lipids. Prospective basil study. *J. Natl. Cancer Inst.* 73: 1463-1468.
- Stal O, et al. (1989).** Prognostic value of DNA ploidy and S-phase fraction in relation to estrogen receptor content and clinicopathological variables in primary breast cancer. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 25: 301-309.
- Staszewski J. (1971).** Age at menarche and breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 47: 935-940.
- Stavraky K and Emmonds S. (1974).** Breast cancer in premenopausal women. *J. Natl. Cancer Inst.* 53: 647-654.
- Stefanik PA and Toulson MC. (1962).** Determining the frequency of intakes of foods in large group studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 11: 335-343.

- Steinmetz KA and Potter JD. (1991). Vegetables, fruit and cancer. II mechanisms. *Cancer Causes and control* 2: 427-442.
- Stephan AM and Wald NJ. (1990). Trends in individual consumption of dietary fat in the United States. *Am. J. Clin. Nutr.* 52: 457-569.
- Stemmermann GN, et al. (1991). Serum cholesterol and mortality among Japanese-American men: the Honolulu (Hawaii) Heart Program. *Arch. Intern. Med.* 151: 969-72.
- Strandberg AD. (1974). Animal model: canine mammary neoplasia. *Am. J. Pathol.* 75: 225.
- Sun Y. (1990). Free radicals, antioxidants enzymes, and carcinogenesis. *Free Radic. Biol. and Med.* 8: 583-599.
- Tailor GN, et al. (1976). Mammary neoplasia in a closed beagle colony. *Cancer Res.* 36: 2740-2743.
- Taioli E, et al. (1991). Dietary habits and breast cancer: a comparative study of United States and Italian data. *Nutr. Cancer* 16: 259-2625.
- Talamini R, et al. (1984). Social factors, diet and breast cancer in a northern Italian population. *Br. J. Cancer* 49: 723-729.
- Tannenbaum A. (1940). The initiation and growth of tumours. Introduction. I. Effects of underfeeding. *Am. J. Cancer* 38: 335-350.
- Tannenbaum A. (1942). The genesis and growth of tumours III. Effects of a high fat diet. *Cancer Res.* 2: 460-488.
- Tannenbaum A. (1944). The dependence on the genesis of induced skin tumors on the fat content of the diet during different stages of carcinogenesis. *Cancer Res.* 4: 683-687.
- Tannenbaum A. (1945). The dependence of tumor formation on the composition of the caloric restricted diet as well as on the degree of restriction. *Cancer Res.* 5: 616-625.
- Taylor GN, et al. (1976). Mammary neoplasia in a closed beagle colony. *Cancer Res.* 36: 2740-2743.
- Taylor IW, et al. (1983). The influence of age on the DNA ploidy levels of breast tumours. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 19: 623-628.
- Teppo L, et al. (1975). Cancer in Finland 1953-1970: incidence, mortality, prevalence. *Acta Pathol. et Microbiol. Scan., Section A Suppl* 252: 5-79.
- Theilen GH and Madewell BR. (1987). Tumours of the mammary gland. En: Theilen GH y Madewell BR. *Veterinary Cancer Medicine.* (2nd ed). Ed: Lea and Febiger, Philadelphia. 326-344.
- Thompson HJ, et al. (1985). Effect of energy intake on the promotion of mammary carcinogenesis by dietary fat. *Nutr. Cancer* 7, 37-41.
- Thurnham DI. (1989). Lutein, cholesterol and risk of cancer. *The Lancet* 2: 441-442.

- Tinsley IJ, et al. (1981). Influence of dietary fatty acids on the incidence of mammary tumors in the C3H mouse. *Cancer Res.* 41: 1460-1465.
- Toniolo P, et al. (1989). Calorie providing nutrients and risk of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 81: 278-286.
- Tubiana M, et al. (1984). The long term prognostic significance of the thymidine labelling index in breast cancer. *Int. J. Cancer* 33: 441-445.
- Ursin G, et al. (1993). Dietary patterns associated with a low-fat diet in the National Health Examination Follow-up Study: Identification of potential confounders for epidemiologic analyses. *Am. J. Epidemiol.* 137: 916-927.
- Van den Brandt PA, et al. (1993). A prospective cohort study on dietary fat and the risk of postmenopausal breast cancer. *Cancer Res.* 53: 75-82.
- Van den Vijver MJ. (1993). Molecular genetic changes in human breast cancer. *Adv. Cancer Res.* 61: 25-56.
- Van Noord PAH, et al. (1987). Selenium levels in nails of premenopausal breast cancer patients assessed prediagnostically in a cohort-nested case-referent study among women screened in the DOM project. *Int. J. Epidemiol.* 16: 318-322.
- Van Noord PAH, et al. (1993). Selenium and the risk of postmenopausal breast cancer in the DOM cohort. *Breast Cancer Res. and Treat.* 25: 11-19.
- Van Staveren WA, et al. (1986). Validity of the fatty acid composition of subcutaneous fat tissue microbiopsies as an estimate of the long-term average fatty acid composition of the diet of separate individuals. *Am. J. Epidemiol.* 123: 455-463.
- Van't Veer P, et al. (1990). Dietary fiber, beta-carotene and breast cancer: results from a case-control study. *Int. J. Cancer* 45: 825-828.
- Vatten LJ and Foss OP. (1990). Total serum cholesterol and triglycerides and risk of breast cancer: a prospective study of 24,329 Norwegian women. *Cancer Res.* 50: 2341-2346.
- Vatten LJ and Kvinnsland S (1990). Body height and risk of breast cancer; a prospective study of 23831 Norwegian women. *Br. J. Cancer* 61: 881-895.
- Verma AK and Erickson D. (1986). Retinoic acid (RA) and multi-stage carcinogenesis in mouse skin: inhibition of stage I and stage II tumor promotion and ornithine decarboxylase (ODC)-gene-transcription. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 27: 147-159.
- Vermuelen A and Verdonck L. (1978). Sex hormone concentrations in post-menopausal women. *Clin. Endocrinol.* 9: 59-66.
- Vielh P, et al. (1991). Analysis of DNA content. En: Vielh P. *Flow Cytometry*. Ed. Igaku-Shoin, New York. 21-57.
- Vindelov LL, et al. (1983). Limits of detection of nuclear DNA abnormalities by flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 3: 332-339.

- Vindelov LL, et al. (1983). A detergent-trypsin method for preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 3: 323-327.
- Vindelov LL, et al. (1990). A review of techniques and results obtained in one laboratory by an integrated system of methods designed for routine clinical flow cytometry DNA analysis. *Cytometry* 11: 753-770.
- Visek WK and Clinton SK. (1991). Dietary protein and cancer. En: Alfin-Slater RB and Kritchevsky D. *Human Nutrition: cancer and nutrition*. Ed: Plenum Press, New York and London. 103-120.
- Visscher MG, et al. (1942). The influence of caloric restriction upon the incidence of spontaneous mammary carcinoma in mice. *Surgery (St. Louis)* 11: 48-55.
- Visscher DW, et al. (1990). Multiparametric deoxyribonucleic acid and cell cycle analysis of breast carcinomas by flow cytometry: Clinicopathologic correlations. *Lab. Invest.* 62: 370-378.
- Vivanco F, et al. (1982). Tabla de composición de alimentos españoles. En: Vivanco F, Palacios JM y Garcia Almansa A. *Alimentación y nutrición*. Ed: Dirección Gral de Salud Pública. 391-399.
- Wald NJ, et al. (1984). Plasma retinol, β -carotene and vitamin E levels in relation to the future risk of breast cancer. *Br. J. Cancer* 49: 321-324.
- Wallace RB, et al. (1982). Cancer incidence in humans: relationship to plasma lipids and relative weight. *J. Natl. Cancer Inst.* 68: 915-918.
- Watrach AM, et al. (1978). Induction of oncornavirus-like particles in cell line of canine mammary carcinoma. *Br. J. Cancer* 38: 639-642.
- Watrach AM, et al. (1982). Effect of selenium on growth rate of canine mammary carcinoma cells in athymic nude mice. *Cancer Lett.* 15: 137-143.
- Weinberg, RA. (1989). *Oncogenes and the molecular origins of cancer*. Ed: Cold Spring Harbor Lab. Press, New York.
- Welsch CW, et al. (1984). Retinoid feeding, hormone inhibition, and/or immune stimulation and the progression of N-methyl-N-nitrosourea-induced rat mammary carcinoma: suppression by retinoids of peptide hormone-induced tumor cell proliferation in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 44: 166-171.
- Welsch CW. (1987). Enhancement of mammary tumorigenesis by dietary fat: a review of potential mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 45: 192-202.
- Welsch CW and DeHoog JV. (1988). Influence of caffeine consumption on 7,12-dimethylbenzanthracene-induced mammary gland tumorigenesis in female rats fed a chemically defined diet containing standards and high levels of unsaturated fat. *Cancer Res.* 48: 2074-2077.
- Welsch CW, et al. (1990). Enhancement of mammary carcinogenesis by high levels of dietary fat: a phenomenon dependent on ad libitum feeding. *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 1615-1620.
- Welsch CW. (1992). Relationship between dietary fat and experimental mammary tumorigenesis: a review and critique. *Cancer Res.* 52: 2040-2048.

- Welsch CW. (1992). Dietary fat, calories, and mammary gland tumorigenesis. En: M.M. Jacobs. Exercise, calories, fat, and cancer. Ed: Plenum Press, New York.
- White FR, et al. (1944). Effect of caloric restriction in mammary-tumor formation in strain C3h mice and on the response of strain DBA to painting with methylcholanthrene. J. Natl. Cancer Inst. 5: 43-48.
- White FR. (1961). The relationship between underfeeding and tumor formation, transplantation and growth in rats and mice. Cancer Res. 21: 281-290.
- White E, et al. (1992). Maintenance of a low-fat diet: follow-up of the women's health trial. Cancer Epidemiol. Biom. and Prev. 1: 315-323.
- Willett WC, et al. (1983). Cigarette smoking, relative weight and menopause. Am. J. Epidemiol. 117: 651-658.
- Willett WC, et al. (1985). Reproducibility and validity of a semiquantitative food frequency questionnaire. Am. J. Epidemiol. 122: 51-65.
- Willett WC and Stampfer MJ. (1986). Total energy intake: implications for epidemiologic analyses. Am. J. Epidemiol. 124: 17-27. 1986.
- Willett WC, et al. (1987). Dietary fat and the risk of breast cancer. N. Eng. J. Med. 316: 22-28.
- Willett WC. (1989). The search for the causes of breast and colon cancer. Nature 338: 389-394.
- Willett WC. (1990). Nutritional epidemiology. Ed: Oxford University Press, New York.
- Willett WC and Stampfer MJ. (1990). Dietary fat and cancer: another view. Cancer Causes and Control 1: 103-109.
- Willett WC, et al. (1992). Dietary fat and fiber in relation to risk of breast cancer. J. Am. Med. Assoc. 268: 2037-2044.
- Williams CM and Dickerson JWT. (1990). Dietary fat, micronutrients and cancer. Nutrition Research Reviews. Guilford.
- Winchester DJ, et al. (1990). The importance of DNA flow cytometry in node-negative breast cancer. Arch. Surg. 125: 886-889.
- Wynder EL, et al. (1978). The epidemiology of breast cancer in 785 United States Caucasian women. Cancer 41: 2341-2345.
- Wynder EL, et al. (1990). Clinical trials of dietary interventions to enhance cancer survival. En: Mettlin CJ and Aoki K. Recent progress in research on nutrition and cancer. Ed: Wiley-liss, New-York. 217-229.
- Yan L, et al. (1991). Effect of dietary selenium and magnesium on human mammary tumor growth in athymic nude mice. Nutr. Cancer 16: 239-248.
- Zaridje DG, et al. (1985). Diet and cancer: Value of different types of epidemiological studies. En: Joosens JV, Hill MJ and Geboers J. Diet and human carcinogenesis. Ed: Excerpta Medica, New York. 221-233.