

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE VETERINARIA**



**TESIS DOCTORAL**

**Estudio de tumores mamarios caninos poco frecuentes**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Ángela Alonso Díez**

**Directores**

**Laura Luisa Peña Fernández  
Juan Carlos Illera del Portal**

**Madrid**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**



**TESIS DOCTORAL**

Estudio de Tumores Mamarios Caninos poco frecuentes

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Ángela Alonso Diez

DIRECTORES

Laura Luisa Peña Fernández  
Juan Carlos Illera del Portal

Madrid, 2021



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**Departamento de Medicina y Cirugía Animal**



**ESTUDIO DE TUMORES MAMARIOS CANINOS POCO  
FRECUENTES**

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por

**Ángela Alonso Díez**

Doctores

Laura Peña Fernández

Juan Carlos Illera del Portal

Madrid, 2021







La presente Tesis Doctoral es un compendio de 3 trabajos de investigación realizados en el Departamento de Medicina y Cirugía Animal y la Sección Departamental de Fisiología, respectivamente. De ellos, dos trabajos han sido publicados en revistas de alto impacto y uno se encuentra en proceso de revisión.

- Artículo 1

-Título de la publicación: **Canine Spindle Cell Mammary Tumor: A Retrospective Study of 67 cases.**

-Autores: **Alonso-Diez, Ángela; Ramos, Antonio; Roccabianca, Paola; Barreno, Lucía; Pérez-Alenza, M<sup>a</sup> Dolores; Tecilla, Marco; Avallone, Giancarlo; Gama, Adelina; Peña, Laura.**

-Revista, volumen y páginas: **Vet Pathol. 2019 Jul; 56(4): 526-535. DOI: 0.1177/0300985819829522.**

- Artículo 2

-Título de la publicación: **Anti-Angiogenic Treatments Interact with Steroid Secretion in Inflammatory Breast Cancer Triple Negative Cell Lines.**

-Autores: **Alonso-Diez, Ángela; Cáceres, Sara; Peña, Laura; Crespo, Belén; Illera, Juan Carlos.**

-Revista, volumen y páginas: **Cancers (Basel). 2021 Jul 21; 13 (15):3668. DOI: 10.3390/cancers13153668.**

- Artículo 3

-Título de la publicación: **E-cadherin and CADM1 overexpression as signature of the “inflammatory phenotype” in canine inflammatory cancer.**

-Autores: **Alonso-Diez, Angela; Affolter, Verena K; Sevane, Natalia; Dunner, Susana; Clemente, Mónica; de Andrés, Paloma J; Illera, Juan Carlos; Perez-Alenza, M<sup>a</sup> Dolores; Peña, Laura.**

-Revista, volumen y páginas: **Res Vet Sci (En revisión).**

La idoneidad de presentar la tesis en formato publicaciones, es la posibilidad que ofrece esta modalidad de obtener una mayor visibilidad de todo el esfuerzo y trabajo realizado por el doctorando en la comunidad científica, además de proporcionar una mayor experiencia en metodologías, difusión científica y la posibilidad de desarrollar nuevas ideas y colaborar con otros grupos de investigación relevantes.

Asimismo, mejora las oportunidades de trabajo y competencias académicas, genera motivación para comenzar a desarrollar una carrera investigadora y docente y aumenta el desarrollo profesional y personal del doctorando.

*“Cuando una persona desea realmente una cosa, el universo entero conspira para que pueda realizar sus sueños”*

*A mis padres y hermana por su incondicional apoyo*



# AGRADECIMIENTOS

---



Ha llegado el día en que esta etapa de mi vida finaliza, y tengo una mezcla de sentimientos encontrados. Por un lado, una alegría inmensa de poder ver plasmado un trabajo de 5 años que ha sido muy bonito y duro a partes iguales y, por otro lado, una tristeza enorme de saber que termina para afrontar nuevos retos.

Como escribió una compañera de doctorado, las casualidades no existen y todas las personas que se han cruzado y han formado parte de este recorrido lo están por algún motivo.

Laura y Juan Carlos GRACIAS. Es una palabra muy corta que no se, si es suficiente para demostraros lo agradecida que me siento de que hayáis querido ser mis directores de tesis y formar parte de este proceso. Que haya personas como vosotros, con esa motivación y entusiasmo por la investigación, significa que personas como yo podamos cumplir nuestro sueño de empezar nuestro camino en la difícil carrera investigadora. Voy a estaros eternamente agradecida por la oportunidad que me habéis dado, el esfuerzo y tiempo dedicado a lo largo de estos años, y por ser ejemplo de que todo sacrificio y esfuerzo al final tiene su recompensa.

Nunca perdáis esas ganas de seguir investigando porque eso permitirá que haya otros compañeros que sean igual de afortunados que yo de poder cumplir su sueño.

Dar las gracias a todos los profesores del Departamento de Fisiología y del Departamento de Anatomía Patológica, sois muchos para ir mencionando uno a

uno, pero cada uno de vosotros me habéis aportado enseñanzas y vuestra inestimable ayuda siempre que lo he necesitado, además de brindarme ánimos y buenísimos momentos que siempre voy a recordar.

También agradecer a Carmen, mi paño de lágrimas del Departamento de Fisiología, y Pedro, Vanesa y Fernando, mis otros paños de lágrimas del Laboratorio de Anatomía Patológica. Vuestro trabajo, disposición a ayudar en cualquier momento y sobre todo esos ánimos, han sido de gran ayuda en los momentos duros que este proceso conlleva.

No puedo olvidarme de mi familia: papás, tata, gracias a vosotros hoy soy quien soy. Todo este trabajo y esfuerzo está especialmente dedicado a vosotros. Gracias por vuestro apoyo incondicional, por no dudar nunca de mi y mis sueños, y siempre, siempre empujarme a ser mejor. Tata gracias por cuidarme y demostrarme que por muy malo que sea un momento, nunca hay que rendirse y siempre hay que darlo todo y luchar.

Adriano, Miranda, los expertos en sacarme siempre una sonrisa y la alegría de mi casa, aun sois pequeños para daros cuenta, pero vuestro cariño también ha sido el empuje que he necesitado en mis peores momentos.

A mis tíos, y especialmente a ellas, Luisa y Paqui, sin vuestra ayuda todo este recorrido habría sido más difícil de caminar.

Hablando de casualidades, que afortunada soy de qué estos cuatro; Sara, Lucía, Guillermo y Daniel, hayan sido mis compañeros a lo largo de estos 5 años. A Sara, mi fuente de apoyo incondicional y amiga, especial gratitud por todo lo

que me has enseñado sin esperar nada a cambio, por tu ayuda y cariño y por siempre estar cuando más lo he necesitado. Lucía, qué cosas tiene la vida, nos conocimos en la universidad y hemos continuado nuestros caminos de forma paralela haciendo lo que más nos gusta. Darte las gracias por enseñarme a ver siempre el lado positivo de las cosas, escucharme, animarme y empujarme en los momentos difíciles. Nunca pierdas esa risa contagiosa y esa forma de ver la vida. Guillermo, gracias por esa tranquilidad y templanza que me transmites, por siempre estar ahí cuando lo he necesitado y enseñarme que nunca hay nada imposible, solo cosas difíciles que siempre tienen solución. Siempre tendrás todo mi apoyo y ayuda cuando lo necesites, te lo debo. Daniel, no he compartido tantos momentos contigo como con el resto, pero todos formamos un equipo y nos empujamos unos a otros cuando es necesario, así que también, gracias. Espero, y realmente deseo, poder seguir trabajando y seguir compartiendo innumerables momentos con todos vosotros.

Bendita casualidad haberte conocido Ana, porque sin tu disposición y ayuda desinteresada esta tesis no tendría "Mención Internacional". No es casualidad haberme cruzado contigo. Gracias a esta estancia creo firmemente que hemos cruzado la barrera de ser compañeras de docencia a tener una bonita amistad y esto es lo más bonito que uno puede llevarse de todo este proceso. Álex, gracias por darme la oportunidad de hacer dicha estancia y estar pendiente de mi en todo momento. Toby, Fabian, Shivani, Jade y resto del personal de laboratorio, gracias por ser tan atentos conmigo y haberme hecho sentir como en casa. Alicia, (my Simple Pieces Girl) me abriste las puertas de tu casa en uno de

los peores momentos a mi llegada a Londres sin conocerme absolutamente de nada y me lo has puesto muy fácil estos meses que he estado fuera de casa, siempre preocupándote por mi. Te mereces lo mejor y espero y deseo que a pesar de la distancia, yo vea todo lo bueno que te pase en la vida. Te espero en Madrid con los brazos abiertos.

Patricia y Salva soy muy afortunada de teneros, sois esas personas que la vida cruza en tu camino para quedarse y, ejemplo de que los amigos siempre están ahí cuando más se los necesita. Eternamente agradecida.

No podía terminar sin dar las gracias a mis mejores amigas, Vanessa y Selene. La vida te pone gente maravillosa en el camino, pero yo he tenido la suerte de poder haberos tenido desde siempre. Simplemente gracias, gracias por disfrutar de la vida juntas.

Aquí en esta habitación, donde tantas veces imagine escribir estas palabras a tu lado, también te doy las gracias y te echo de menos.

# ÍNDICE

---



<b>I. LISTA DE ABREVIATURAS</b>	1
<b>II. RESUMEN</b>	11
<b>III. SUMMARY</b>	21
<b>IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	29
1. Introducción general a los tumores mamarios caninos	31
1.1 Clasificación histopatológica de los tumores mamarios caninos	32
1.2. Introducción a los tumores mamarios caninos de células fusiformes (CSCMT)	34
1.3. Grado histológico de malignidad de los tumores mamarios caninos	36
1.4. Marcadores inmunohistoquímicos para células fusiformes	39
2. Introducción al carcinoma inflamatorio	41
2.1. Características epidemiológicas del carcinoma inflamatorio humano y canino	43
2.2. Características clínicas e histopatológicas del IBC e IMC	44
2.3. Modelos experimentales de investigación del cáncer mamario en general y del cáncer mamario inflamatorio.	49
2.3.1. Modelos <i>in vitro</i>	50
2.3.2. Modelos <i>in vivo</i>	54
2.3.3. Modelos espontáneos animales	59
2.4. Bases moleculares del IBC e IMC	61
2.4.1 Moléculas de adhesión	65

2.4.2. Transición epitelio-mesenquimatosa (EMT)	70
2.5. Angiogénesis tumoral	72
2.6. Otros factores relacionados con la angiogénesis tumoral	80
2.6.1. Enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2)	80
2.6.2. Interleucina IL-8 (CXCL8)	82
2.7. Tratamientos anti-angiogénicos	85
2.8. Hormonas esteroides y cáncer de mama	89
2.8.1. Progesterona	91
2.8.2. Andrógenos	92
2.8.3. Estrógenos	95
2.9. Receptores hormonales	97
2.10. Angiogénesis tumoral y hormonas esteroideas	100
<b>V. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>105</b>
<b>CAPÍTULO 1. Estudio de tumores mamarios caninos de células fusiformes (CSCMT)</b>	<b>111</b>
1. Resumen	115
2. Diseño experimental	118
<b>Canine spindle cell mammary tumor: a retrospective study of 67 cases</b>	<b>121</b>
<b>CAPÍTULO 2. Interacción de tratamientos anti-angiogénicos en la secreción de hormonas esteroides en líneas celulares triple negativo de cáncer inflamatorio</b>	<b>131</b>

	<i>Índice</i>
1. Resumen	135
2. Diseño experimental	138
<b>Anti-angiogenic treatments interact with steroid secretion of inflammatory breast cancer triple negative cell lines</b>	141
<b>CAPÍTULO 3. Estudio de la expresión de E-caderina y CADM1 en el cáncer inflamatorio mamario canino (IMC)</b>	165
1. Resumen	171
2. Diseño experimental	175
<b>E-cadherin and CADM1 overexpression as signature of the “inflammatory phenotype” in canine inflammatory mammary cancer</b>	177
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	215
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	251
<b>VIII. CONCLUSIONS</b>	255
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA</b>	259



# **I. LISTA DE ABREVIATURAS**

---



**A4-** Androstenediona.

**CADM1-** Molécula de adhesión celular 1 (*Cell adhesion molecule 1*).

**Calp-** Calponina (*Calponin*).

**CAM-** Molécula de adhesión (*Cell adhesion molecule*).

**CI-** Cáncer inflamatorio mamario.

**CK-** Citoqueratina (*Cytokeratin*).

**c-Kit-** Receptor del factor de células madre (*Stem cell factor receptor*).

**COX-** Ciclooxygenasas.

**COX-1-** Ciclooxygenasa 1.

**COX-2-** Ciclooxygenasa 2.

**COX-3-** Ciclooxygenasa 3.

**CSCMT-** Tumor mamario canino de células fusiformes (*Canine spindle cell mammary tumor*).

**CTC-** Célula tumoral circulante (*Circulating tumor cell*).

**DC-** Célula dentrítica (*Dendritic cell*).

**DFI-** Intervalo libre de enfermedad (*Disease free interval*).

**DFS-** Supervivencia libre de enfermedad (*Disease free survival*).

**DHEA-** Dehidroepiandrosterona.

**DHT**- Dehidrotestosterona.

**E-cad**- E-caderina.

**EC**- Célula endotelial (*Endothelial cell*).

**EGFR**- Receptor del factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal growth factor receptor*).

**EIA**- Ensayo inmunológico enzimático (*Enzyme Immuno Assay*).

**ELC**- Célula tipo endotelial (*Endothelial-like cell*).

**EMT**- Transición epitelio-mesenquimatosa (*Epithelial-to-mesenchymal transition*).

**EMT-TF**- Factor de transcripción de transición epitelio-mesenquimatosa (*Transcriptor factor of epithelial-to-mesenchymal transition*).

**EPC**- Célula endotelial progenitora (*Endothelial progenitor cell*).

**E1**- Estrona.

**E1SO4**- Sulfato de estrona.

**E2**- 17 $\beta$  estradiol.

**FDA**- Administración de Alimentos y Medicamentos (*Food and Drug Administration*).

**GEMM**- Modelos de ratón diseñados genéticamente (*Genetic engineered mouse models*).

**GFAP**- Proteína ácida fibrilar glial (*Glial fibrillary acidic protein*).

**HEP-** Hemangioericitoma (*Hemangiopericytoma*).

**HER-2-** Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*).

**HMWCK-** Citoqueratinas de alto peso molecular (*High-molecular-weight cytokeratins*).

**HPF-** Campo de alta magnitud (*High-power field*).

**HRT-** Terapia de reemplazo hormonal (*Hormonal replacement therapy*).

**HSC-** Célula madre hematopoyética (*Hematopoietic stem cell*).

**HT-** Terapia hormonal (*Hormonal therapy*).

**H&E-** Hematoxilina y eosina.

**IBC-** Cáncer inflamatorio mamario humano (*Inflammatory Breast Cancer*).

**ICAM2-** Molécula de adhesión intercelular 2 (*Intercellular adhesion molecule 2*).

**IHQ-** Inmunohistoquímica.

**ILC-** Carcinoma lobular infiltrante (*Infiltrative lobular carcinoma*).

**IMC-** Cáncer inflamatorio mamario canino (*Inflammatory Mammary Cancer*).

**LPI-** Índice de proliferación linfangiogénica (*Lymphangiogenic proliferation index*).

**MINO-** Crecimiento intraepitelial mamario neoplásico (*Mammary intraepithelial neoplasm outgrowth*).

**MMT**- Transición mioepitelial-mesenquimatosa (*Mioepithelial-mesenchymal transition*).

**MUC-1**- Mucina-1 asociada a la superficie celular (*Cell surface-associated mucin-1*).

**no-IBC**- Tumor mamario no inflamatorio.

**NrCAM**- Molécula de adhesión celular neuronal (*Neuronal cell adhesion molecule*).

**OHE**- Ovariohisterectomía.

**OS**- Supervivencia total (*Overall survival*).

**pCR**- Respuesta patológica completa (*Pathological complete response*).

**PDGFR $\alpha$** - Receptor  $\alpha$  del factor de crecimiento derivado de plaquetas (*Platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$* ).

**PDX**- Xenoinjerto derivado de paciente (*Patient-derived xenograft*).

**PECAM-1**- Molécula de adhesión de células endoteliales-plaquetarias 1 (*Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1*).

**PNST**- Tumor de la vaina nerviosa (*Perineural nerve sheath tumor*).

**PWT**- Tumor de la pared vascular (*Perivascular wall tumor*).

**P4**- Progesterona.

**qRT-PCR**- Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

(*Quantitative Real-Time Polymerase Reaction*).

**RA**- Receptor de andrógenos.

**RE**- Receptor de estrógenos.

**ROS**- Especies reactivas de oxígeno (*Reactive oxygen species*).

**RP**- Receptor de progesterona.

**RTK**- Receptor tirosin quinasa (*Tyrosine kinase receptor*).

**SCID**- Inmunodeficiencia combinada severa (*Severe combined immunodeficiency*).

**SMA**- Actina de musculo liso (*Smooth muscle actin*).

**SNC**- Sistema nervioso central.

**SNP**- Poliformismo de un solo nucleótido (*Single nucleotide polymorphism*).

**STAT**- Familia de genes de transducción de señal y activación de transcripción  
(*Signal transducer and activator of transcription gene family*).

**STS**- Sarcoma de tejidos blandos (*Soft tissue sarcoma*)

**STS**- Sulfatasa esteroide (*Steroid sulfatase*).

**T**- Testosterona.

**TLE**- Tiempo libre de enfermedad.

**TMC**- Tumor mamario canino.

**TNBC-** Cáncer de mama triple negativo (*Triple Negative Breast Cancer*).

**VCO-** Co-opción vascular (*Vessel co-option*).

**VEGF-** Factor de crecimiento vascular endotelial (*Vascular endothelial growth factor*).

**VEGF-A-** Factor de crecimiento vascular endotelial A (*Vascular endothelial growth factor A*).

**VEGF-C-** Factor de crecimiento vascular endotelial C (*Vascular endothelial growth factor C*).

**VEGF-D-** Factor de crecimiento vascular endotelial D (*Vascular endothelial growth factor D*).

**VEGFR-** Receptor del factor de crecimiento endotelial (*Vascular endothelial growth factor receptor*).

**VEGFR-2-** Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial (*Vascular endothelial growth factor receptor 2*).

**VEGFR-3-** Receptor 3 del factor de crecimiento endotelial (*Vascular endothelial growth factor receptor 3*).

**Vim-** Vimentina (*Vimentin*).

**VM-** Mimetismo vascular (*Vasculogenic mimicry*).

**VTCN1**- Inhibidor 1 de la activación de linfocitos T inmunosupresores que contienen el dominio V-set (*Immunosuppressive V-set domain-containing T cell activation inhibitor*).



## **II. RESUMEN**

---



Los tumores mamarios son las neoplasias que con mayor frecuencia se diagnostican en la perra siendo, por tanto, un problema clínico importante. Son conocidos por su gran heterogeneidad biológica e histomorfológica; estando constituidos por poblaciones celulares de origen epitelial, mioepitelial y/o mesenquimatoso. Además, aunque dichas neoplasias pueden ser de carácter benigno, aproximadamente el 50% son de carácter maligno. A pesar de que en la mayor parte de las ocasiones se trata de tumores de origen epitelial o carcinomas, también existen otras neoplasias que son poco prevalentes que no se conocen en profundidad.

Por ello, la presente Tesis Doctoral comprende la realización de tres trabajos de investigación todos ellos centrados en el estudio de tumores mamarios caninos poco prevalentes, centrándose especialmente en los tumores mamarios caninos de células fusiformes (CSCMT) y el cáncer inflamatorio mamario canino (IMC), con el objetivo principal de esclarecer algunos aspectos de su biología celular que se desconocen o son poco conocidos

En primer lugar, para el estudio de los CSCMT, se realizó un estudio retrospectivo, incluyendo un total de 67 tumores mamarios malignos. En todos los casos seleccionados, se determinó su diagnóstico histopatológico (H&E), su origen probable (mamario, cutáneo o desconocido) y el grado de malignidad histológica a partir de secciones teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). Asimismo, se estableció su diagnóstico definitivo mediante el empleo de varios marcadores inmunohistoquímicos de fenotipo tumoral y, en aquellos casos en los que fue posible, se determinaron las características epidemiológicas, clínicas y de

pronóstico. Los resultados revelaron que los CSCMT son neoplasias de baja prevalencia (1% de todos los tumores mamarios). De todos los casos incluidos en el estudio, 3 fueron neoplasias benignas (1 angioma y 2 mioepiteliomas benignos) y 67 casos fueron tumores mamarios malignos, los cuales, tras la realización de la inmunohistoquímica (IHQ), fueron diagnosticados como mioepitelioma maligno (64%), carcinoma y mioepitelioma maligno (19%), hemangiosarcoma (8%), carcinoma indiferenciado (5%), tumor de la vaina nerviosa (PNST) (3%) y fibrosarcoma (2%). El diagnóstico histopatológico a partir de las secciones teñidas con H&E cambio en un 75% de los casos tras la realización de la IHQ, lo que sugiere que esta técnica es esencial para poder establecer el diagnóstico de estos tumores. Asimismo, los resultados demostraron que los CSCMT son tumores solitarios (57%), de gran tamaño ( $6,42 \pm 3,92$  cm), y poco agresivos. Utilizando el sistema destinado a determinar el grado histológico de malignidad para sarcomas, el grado de mayor malignidad (grado III), se asoció con una edad avanzada y un mayor tamaño tumoral.

En resumen, los CSCMT son neoplasias mamarias poco frecuentes, generalmente de comportamiento benigno, que deben ser evaluadas por medio de técnicas IHQ con objeto de determinar su histotipo y poder valorar su comportamiento benigno.

En cuanto al cáncer inflamatorio mamario canino (IMC), neoplasia mamaria también de baja prevalencia en la especie canina; en este trabajo se estudiaron diversos aspectos involucrados en su biología celular que aun no han

sido completamente elucidados, como el posible papel de las hormonas esteroides en la angiogénesis tumoral y la expresión de diferentes moléculas de adhesión y su posible papel en el “fenotipo inflamatorio”.

Específicamente, para poder postular la influencia de diferentes tratamientos anti-angiogénicos en la producción *in vitro* e *in vivo* de hormonas esteroides y la posible influencia de estas hormonas en la angiogénesis tumoral, se procedió a la determinación de la viabilidad celular y la capacidad *in vitro* de formar estructuras de tipo vascular de dos líneas celulares de cáncer inflamatorio mamario humano y canino (SUM149 e IPC-366) tras su tratamiento con diferentes agentes anti-angiogénicos (SU5416, bevacizumab y celecoxib) y VEGF. Tras la realización de ambos ensayos, se determinaron las concentraciones en medio de cultivo de diferentes hormonas esteroides (progesterona, dehidroepiandrosterona, androstenediona, testosterona, dihidrotestosterona, sulfato de estrona y estradiol) y factores de crecimiento endotelial (VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D) e IL-8. Además, ambas líneas celulares fueron inoculadas en hembras de ratones inmunodeprimidos (SCID) que fueron tratadas con distintas dosis de los tratamientos anteriormente mencionados. En estos ratones se determinaron parámetros de curvas de crecimiento tumoral, frecuencia de aparición de metástasis y concentraciones intratumorales y séricas de las hormonas esteroides y factores angiogénicos previos. Los resultados demostraron que, en condiciones *in vitro*, la progesterona y el estradiol inducen la producción de VEGF promoviendo la proliferación celular. Además, por primera vez, se determinó la capacidad de SUM149 e IPC-366 de formar

estructuras de tipo vascular en condiciones *in vitro*, y que los andrógenos (DHEA y DHT) están involucrados en la formación de estas estructuras. *In vivo*, los resultados demostraron que bevacizumab fue el único tratamiento que redujo el crecimiento tumoral aproximadamente en un 40%. En cuanto al análisis hormonal, éste reveló, que las concentraciones séricas de los diferentes esteroides y factores angiogénicos estudiados fueron menores que las encontradas intratumoralmente, lo que indica que estos son producidos localmente en los tejidos donde actúan. Asimismo, se observó que las concentraciones intratumorales de testosterona fueron mayores en ratones tratados con bevacizumab y celecoxib respecto a los grupos control, lo que sugiere que éstas, pueden estar involucradas en la inhibición del crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis a distancia. Por otro lado, las elevadas concentraciones de E1SO4 tras el tratamiento con SU5416, podrían estar involucradas en la progresión tumoral y la aparición de metástasis.

Por lo tanto, se puede establecer que las hormonas esteroides podrían estar involucradas en la producción de diferentes factores angiogénicos y, por ello, en la regulación de la angiogénesis tumoral. Asimismo, es necesario llevar a cabo la medición intratumoral de las diferentes hormonas esteroides y factores angiogénicos en los compartimentos donde son biológicamente activos con el objetivo de desarrollar estrategias terapéuticas preventivas individualizadas.

Se ha descrito que el IMC comparte numerosas características epidemiológicas, clínico-patológicas y de comportamiento; así como mecanismos carcinogénicos específicos con el IBC en la mujer. Además, la sobreexpresión de

la molécula de adhesión E-caderina, también ha sido identificada como una de las características específicas del IBC involucrada en el “fenotipo inflamatorio”. Sin embargo, hasta la fecha no se había estudiado su expresión en el IMC. Por tanto, en último lugar, se investigó la expresión de E-caderina y otras moléculas de adhesión en tumores IMC respecto a tumores no-IMC de alto grado de malignidad y, además se determinó si la sobreexpresión de estas moléculas de adhesión se asocia al “fenotipo inflamatorio”. Para ello, se seleccionaron retrospectivamente aquellos casos remitidos para su diagnóstico histopatológico (H&E), compatibles con tumores IMC y tumores no-IMC de alto grado de malignidad y con presencia de metástasis en linfonódulos regionales. En todos los casos seleccionados, se revisó el diagnóstico histopatológico, se estableció su grado de malignidad histológica y se determinó la expresión de las moléculas de adhesión E-caderina y CADM1 por medio de inmunohistoquímica. Además, se analizó la expresión de los genes que codifican la expresión de dichas moléculas por medio de microarray y, posteriormente, dicha expresión se validó por medio de qRT-PCR. Este estudio demostró que la expresión de E-caderina y CADM1 fue mayor en los tumores IMC en comparación con los tumores no-IMC, siendo además, más frecuente una inmunotinción citoplasmática en los tumores IMC para ambas proteínas. Además, la inmunotinción citoplasmática de E-caderina se asoció significativamente con la inmunoexpresión de los factores angiogénicos y linfangiogénicos, COX-2, VEGF-A y VEGF-D. A diferencia de la sobreexpresión de la proteína de E-caderina, el estudio transcriptómico no mostró diferencias en la expresión del gen de E-caderina (CDH1) en los tumores IMC respecto a los no-

IMC; sin embargo, los niveles de expresión del gen CADM1 fueron 7 veces mayores en los tumores IMC en comparación con los no-IMC. En resumen, estos resultados demuestran que, de la misma manera que ocurre en el IBC, existe una asociación positiva entre la expresión de E-caderina y el “fenotipo inflamatorio”, y sugieren un posible papel de la E-caderina en la regulación de la exacerbada angiogénesis y linfangiogénesis característica de este tipo de neoplasia mamaria. De la misma manera, la expresión de CADM1 y otras moléculas de adhesión encontrada en los tumores IMC también sugiere que, no solo la E-caderina, sino que otras moléculas de adhesión podrían estar involucradas en el fenotipo inflamatorio. Por ello, todos estos resultados respaldan al IMC como un modelo natural de la enfermedad en la mujer.

Como conclusión, todos estos estudios han esclarecido numerosos aspectos, hasta la fecha desconocidos, acerca de las neoplasias estudiadas, ofreciendo información de gran utilidad acerca del comportamiento biológico de los tumores mamarios caninos fusiformes, así como información para su correcto diagnóstico. Además, establecen la posible influencia de las hormonas esteroides en la exacerbada angiogénesis característica del cáncer inflamatorio mamario y determinan la existencia de una sobreexpresión de varias moléculas de adhesión, algunas de las cuáles parecen estar también involucradas en la regulación no solo de la angiogénesis sino también de la linfangiogénesis. Esto abre la puerta a la realización de investigaciones futuras donde dichos aspectos sean tenidos en cuenta a la hora de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas destinadas a la

lucha de esta enfermedad de tan difícil tratamiento en la especie canina y humana.



## **III. SUMMARY**

---



Mammary tumors are the most frequently diagnosed neoplasms in the female dog, and therefore, they represent a significant clinical problem. They are characterized by an intrinsic biological and morphological heterogeneity, with a frequent involvement of different cell populations with an epithelial, myoepithelial and/or mesenchymal origin. Although these neoplasms can be benign, approximately 50% are malignant. Although, most of the cases are tumors of epithelial origin or carcinomas, there are also other mammary neoplasms with low prevalence that are not fully understood.

For this reason, the present Doctoral Thesis comprises the compilation of three investigations with focus on the study of rare canine mammary tumors, specifically canine spindle cell mammary tumors (CSCMT) and inflammatory carcinoma, with the main objective of clarifying some aspects of their biology that are unknown or poorly known.

For the study of canine spindle cell mammary tumors (CSCMT), a retrospective study including a total of 67 malignant mammary tumors was performed. In all selected cases, the histopathological diagnosis, the probable origin of the neoplasms (mammary, skin, or unknown), and the grade of malignancy were determined from HE-stained sections. Likewise, to determine the definitive diagnosis, immunohistochemistry (IHC) for the identification of several immunohistochemical markers of tumor phenotype was performed. Moreover, when it was possible, epidemiological, clinical, and prognostic features were established. The results revealed that CSCMT are low prevalence neoplasms (1% of all mammary tumors). Of all cases included in the study, 3

were benign neoplasms (1 angioma and 2 benign myoepitheliomas) and 67 cases were malignant mammary tumors, that after IHC were diagnosed as malignant myoepithelioma (64%), carcinoma and malignant myoepithelioma (19%), hemangiosarcoma (8%), undifferentiated carcinoma (5%), nerve sheath tumor (3%) and fibrosarcoma (2%). The diagnoses after IHC differed from HE-based diagnoses in 75% of cases, which suggests that IHC is essential for the proper diagnosis of these tumors. Likewise, the results showed that CSCMT are solitary (57%), large-sized ( $6.42 \pm 3.92$  cm) tumors, and generally with low aggressiveness. High sarcoma grade or grade III was associated with older age and larger tumor size. In summary, CSCMT are rare mammary neoplasms with a generally benign clinical behavior. These tumors should be evaluated by IHC to determine their histotype and to denote their relatively benign clinical behavior.

Regarding canine inflammatory mammary cancer (IMC), a mammary neoplasm with low prevalence in the canine species, this study investigated several aspects involved in its cellular biology that have not yet been completely elucidated, such as the possible role of steroid hormones in tumor angiogenesis and the expression of different adhesion molecules.

Specifically, to elucidate the influence of different anti-angiogenic treatments on the *in vitro* and *in vivo* production of steroid hormones and the possible influence of these hormones on tumor angiogenesis, cell viability and the *in vitro* capacity to form vascular-like structures of human and canine

inflammatory mammary cancer cell lines (SUM149 and IPC-366) were determined after administration of different anti-angiogenic compounds (SU5416, bevacizumab and celecoxib) and VEGF. Subsequently, steroid hormones (progesterone, dehydroepiandrosterone, androstenedione, testosterone, dihydrotestosterone, estrone sulfate and estradiol) and angiogenic factors (VEGF-A, VEGF-C, VEG-D) and IL-8 determinations were assayed in culture medium by EIA. Moreover, both cell lines were inoculated into female SCID mice, which were treated with different dosages of these therapeutic agents. Different parameters such as tumor growth curves, the percentage of distant metastasis and intratumoral and serum concentrations of the aforementioned steroid hormones and angiogenic factors, were determined after these treatments. The results demonstrated that under *in vitro* conditions, progesterone and estradiol induce VEGF production promoting cell proliferation. Furthermore, for the first time, the ability of SUM149 and IPC-366 to form vascular-like structures under *in vitro* conditions has been determined, and the androgens (DHEA and DHT) are involved in the formation of these vascular-like structures. *In vivo*, the results showed that bevacizumab was the only treatment that reduced tumor growth by approximately 40%. The hormonal profile revealed that serum concentrations of steroid hormones and angiogenic growth factors were lower than tumor homogenate levels, indicating that these hormones and angiogenic factors are produced locally in the tissues where they act. Moreover, intratumoral testosterone concentrations were higher in xenotransplanted mice treated with bevacizumab and celecoxib compared to

control groups, suggesting that these concentrations may be involved in the inhibition of tumor growth and the development of distant metastasis. On the other hand, elevated concentrations of estrone sulfate could be involved in tumor progression and development of distant metastases after SU5416 treatment. Altogether, these findings support that sex steroid hormones could be involved in the production of different angiogenic factors and, therefore, in the regulation of tumor angiogenesis. The intratumoral measurement of the different steroid hormones and angiogenic factors in the compartments where they are biologically active is necessary to develop individualized preventive therapeutic strategies.

Canine inflammatory mammary cancer (IMC) shares numerous epidemiological, clinicopathological and behavioral features as well as specific carcinogenic mechanisms with human inflammatory breast cancer (IBC). In fact, overexpression of the adhesion molecule E-cadherin has been identified as one of the specific features of IBC involved in the "inflammatory phenotype". However, its expression in IMC has not been studied to date. Therefore, we investigated the expression of E-cadherin and other adhesion molecules in IMC tumors in comparison to non-IMC grade III carcinomas and if increased cell adhesion molecule expression is associated to the "inflammatory phenotype". For this purpose, cases submitted for histopathological diagnosis compatible with IMC tumors and non-IMC grade III mammary carcinomas with lymphovascular invasion and/or lymph node metastases were retrospectively selected. The selected cases were morphologically reviewed (HE), the histological grade of

malignancy was established and the expression of adhesion molecules E-cadherin and CADM1 was determined by immunohistochemistry. In addition, the expression of genes encoding these molecules was analyzed by microarray, and subsequently validated by qRT-PCR. This study showed that E-cadherin and CADM1 expression was higher in IMC vs non-IMC tumors, with cytoplasmic immunolabeling being also more frequent in IMC tumors for both molecules. Furthermore, cytoplasmic immunolabeling of E-cadherin was significantly associated with the immunoexpression of the angiogenic and lymphangiogenic factors, COX-2, VEGF-A and VEGF-D. The transcriptional study did not show a differential expression of E-cad gene (CDH1) in IMC when compared to non-IMC cases, however, CADM1 expression was increased 7-fold in IMC in comparison with non-IMC cases. In summary, these results demonstrate that, as in human IBC, a positive association between E-cadherin expression and the IMC "inflammatory phenotype" exists. Moreover, the overexpression of E-cadherin in IMC cases suggests a possible role of E-cadherin in the characteristic exacerbated angiogenesis and lymphangiogenesis of this type of mammary neoplasm. Likewise, CADM1 and other cell-to cell adhesion molecules were differentially expressed IMC tumors suggesting that not only E-cadherin, but other adhesion molecules involved in cell-to-cell- adhesion and invasiveness could form part of the "inflammatory phenotype". Altogether, these findings support the value of canine IMC as a good natural model for the study of the human disease.

In conclusion, all these studies have clarified numerous unknown aspects of the neoplasms studied. They provide valuable information not only about the

biological behavior of canine spindle cell mammary tumors (CSMTs) but also useful information for their correct diagnosis. In addition, the studies establish the possible influence of steroid hormones in the characteristic exacerbated angiogenesis of inflammatory breast carcinoma and determine the existence of an overexpression of several adhesion molecules, some of which seem to be involved in the regulation of angiogenesis. Altogether, these findings offer the possibility of developing future studies of new therapeutic strategies, in which these aspects can be considered to combat this disease in both species.

## **IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

---



## **1. Introducción general a los tumores mamarios caninos**

Los tumores mamarios caninos (TMC) son las neoplasias más frecuentes en las perras después de los tumores de piel (Destexhe *et al.*, 1993), representando entre el 50% y 70% de todos los tumores en hembras no castradas (Moe, 2001, Salas *et al.*, 2015, Goldschmidt *et al.*, 2017, Sorenmo *et al.*, 2020).

Su prevalencia varía dependiendo de la localización geográfica, y la principal causa de dicha variabilidad reside en la realización una ovariectomía (OHE) a una edad temprana, siendo mayor en aquellos países donde dicha práctica no se realiza de forma rutinaria. Concretamente, en estos países, dicha prevalencia es tres veces mayor en la perra que en la mujer (Goldschmidt *et al.*, 2017). Históricamente, aproximadamente el 50% de los TMC han sido considerados malignos; sin embargo, estudios recientes han demostrado un incremento en la incidencia de los tumores mamarios malignos frente a los tumores benignos en los últimos años, siendo dicha tendencia similar a lo observado en medicina humana (Salas *et al.*, 2015).

Además de dicha tendencia, los TMC y el cáncer mamario humano, también comparten muchas características epidemiológicas, ambientales, biológicas, clínicas, genéticas y patológicas; incluyendo la heterogeneidad histológica y molecular (Nguyen *et al.*, 2018). Asimismo, los desafíos terapéuticos y los obstáculos a la hora de obtener una cura también son similares, y el desarrollo de metástasis y resistencia frente a fármacos son la principal causa de que los tratamientos no funcionen en ninguna de las dos especies. De ahí, que muchos autores afirmen que los TMC son un buen modelo espontáneo para el

estudio del cáncer mamario humano, y especialmente del cáncer inflamatorio mamario (CI), la neoplasia mamaria más agresiva y letal en ambas especies (Peña *et al.*, 2003b, Clemente *et al.*, 2009, Peña *et al.*, 2013, Abadie *et al.*, 2018, Lee *et al.*, 2018, Jeong *et al.*, 2019).

La etiología de los TMC es multifactorial, siendo los principales factores de riesgo la influencia hormonal, incrementándose dicho riesgo de un 0,5% a un 8% y hasta un 26%, dependiendo de si la OHE se realiza en el primer, segundo o cualquier estro posterior, respectivamente; y la edad, siendo la edad media de aparición, 9-11 años en perras con tumores mamarios malignos frente a los 7-9 años en perras con tumores benignos. Además, entre otros factores de riesgo también se incluyen la raza y factores dietéticos. Estudios previos han demostrado que algunas razas (e.j. Yorkshire Terrier, Pastor Alemán, Cocker Spaniel, entre otras) tienen una predisposición genética a padecer TMC aunque dicha predisposición varía según la localización geográfica (Kaszak *et al.*, 2018). Asimismo, otros estudios han determinado que perros alimentados con una dieta rica en carne roja o que son obesos con un año tienen mayor riesgo de desarrollar displasias o tumores mamarios (Gray *et al.*, 2020, Sorenmo *et al.*, 2020).

### **1.1 Clasificación histopatológica de los tumores mamarios caninos**

El diagnóstico histopatológico de los TMC resulta una ardua tarea debido a su gran complejidad histológica. Dichas neoplasias pueden tener un origen epitelial, mioepitelial o mesenquimatoso dando lugar a múltiples combinaciones,

y por ello originar diferentes subtipos histológicos. La nueva clasificación de los TMC (Zappulli *et al.*, 2019) que sustituye a la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 1974 y a la última clasificación de 2011 (Goldschmidt *et al.*, 2011), comprende cambios hiperplásicos/displásicos, neoplasias epiteliales benignas, neoplasias epiteliales malignas, subtipos especiales de neoplasias epiteliales malignas, neoplasias mesenquimatosas malignas, carcinosarcomas, la hiperplasia/displasia del pezón y las neoplasias del pezón. En un enfoque simplista, los tumores mamarios malignos pueden ser carcinomas simples (formados por células epiteliales malignas), carcinomas complejos (constituidos por un componente epitelial y un componente mioepitelial) o carcinomas mixtos (formados por componentes epiteliales, mioepiteliales y mesenquimatosos). Además, los TMC malignos pueden estar formados exclusivamente por tejido mesenquimatoso (sarcomas); siendo el osteosarcoma el subtipo histológico más frecuente en la perra, o bien estar constituidos por componentes epiteliales, mioepiteliales y mesenquimatosos malignos (Zappulli *et al.*, 2019, Sorenmo *et al.*, 2020). Entre todos los tumores mamaros que pueden desarrollarse en la perra, el adenoma complejo, el tumor mixto benigno, el carcinoma complejo y el carcinoma sólido, son los subtipos histológicos más frecuentes (Goldschmidt *et al.*, 2011).

## **1.2. Introducción a los tumores mamarios caninos de células fusiformes**

### **(CSCMT)**

Aunque la mayoría de las neoplasias mamarias caninas son carcinomas o están constituidas por proliferaciones mioepiteliales fáciles de identificar por medio de técnicas rutinarias (hematoxilina y eosina, H&E), existe un grupo de tumores mamarios poco frecuentes con una apariencia histológica similar por medio H&E. Su principal característica histológica común, es que están constituidos por células de morfología fusiforme o alargada, lo que hace que dicha morfología sea insuficiente para alcanzar un diagnóstico definitivo, y por ello, sea necesario recurrir a la realización de técnicas inmunohistoquímicas (IHQ) para su correcto diagnóstico (Peña *et al.*, 2014).

Los autores de este estudio hemos usado el término tumores mamarios caninos de células fusiformes (del inglés, *Canine spindle cell mammary tumors*, CSCMTs) para englobar estas neoplasias.

De acuerdo con la clasificación histológica de los TMC anteriormente establecida por Goldschmidt y colaboradores. (2011) y en la que nos hemos basado en la presente tesis doctoral, bajo dicha nomenclatura propuesta encontramos; por un lado, carcinomas o tumores de origen epitelial y/o mioepitelial, entre los que se incluyen el carcinoma y mioepitelioma maligno (con mínima proliferación epitelial), el mioepitelioma benigno y maligno, el carcinoma de células fusiformes y el carcinoma de células escamosas-variedad fusiforme; y por otro lado, sarcomas o tumores de origen mesenquimatoso, representados por el hemangiosarcoma y el fibrosarcoma; siendo este último

considerado como el sarcoma mamario más frecuente en la perra (Dolka *et al.*, 2013).

Además, otros posibles subtipos histológicos presentes en la mama a tener en cuenta son, los tumores derivados de los diferentes componentes de la pared vascular con exclusión del revestimiento endotelial, conocidos como tumores perivasculares (del inglés, *Perivascular wall tumors*, PWT) (Avallone *et al.*, 2007), recientemente identificados a raíz de la reclasificación de los hemangiopericitomas (del inglés, *hemangiopericytoma*, HEP) (Stefanello *et al.*, 2011) o los tumores de la vaina nerviosa (del inglés, *Perineural nerve sheath tumors*, PNST) o schwannomas. Estos últimos, son neoplasias de origen neuroectodérmico que se originan a partir de las células de Schwann, las células perineurales o ambos tipos celulares (Suzuki *et al.*, 2014). Todos estos subtipos histológicos anteriormente mencionados, también están constituidos por células de morfología fusiforme que se disponen formando remolinos, espirales o haces entrelazados alrededor de una estructura central, pequeña, ovalada y eosinófila (nervio) o alrededor de pequeños capilares.

Asimismo, aunque tampoco han sido descritos previamente, la proliferación benigna de células endoteliales de origen mamario o angioma es otro posible subtipo histológico que estudiar.

En la actualidad, los CSCMT representan un desafío diagnóstico tanto para anatomopatólogos como clínicos debido a su baja prevalencia, a la escasa información que se dispone para poder diferenciarlos, y al escaso conocimiento

que existe sobre su comportamiento biológico. Un estudio previo determinó que los fibrosarcomas y osteosarcomas son los subtipos histológicos con menor tiempo de supervivencia entre los CSCMT (Hellmén *et al.*, 1993). En cuanto al resto de subtipos histológicos que constituyen los CSCMT, no existe información acerca de su comportamiento, excepto para el carcinoma de células fusiformes y el mioepitelioma maligno (con abundante componente epitelial), clasificados como tumores agresivos (Rasotto *et al.*, 2017). Esto es especialmente importante ya que los diferentes subtipos histológicos están asociados a diferentes pronósticos (Peña *et al.*, 2014).

### **1.3. Grado histológico de malignidad de los tumores mamarios caninos**

Como ya se ha mencionado previamente, la diversidad histológica de los tumores mamarios caninos dificulta su diagnóstico y proporciona una escasa información pronóstica (Peña *et al.*, 2014). Asimismo, el principal problema en la evaluación de los tumores mamarios caninos es identificar aquellos que son “realmente” malignos (Goldschmidt *et al.*, 2011). Por ello, el empleo de un sistema destinado a determinar el grado histológico de malignidad es muy útil para llevar a cabo una clasificación de estos tumores, así como para establecer un pronóstico de estos (Peña *et al.*, 2014).

El sistema de clasificación actual empleado en todo el mundo para los TMC malignos, es una adaptación del método Nottingham empleado para los tumores mamarios en la mujer (Elston y Ellis). Dicho sistema determina la malignidad en tres grados histológicos: grado I (bajo grado, bien diferenciado),

grado II (grado medio, moderadamente diferenciado) y grado III (grado alto, poco diferenciado), en función de la formación de túbulos, el pleomorfismo nuclear y el índice mitótico. Dicho sistema es el que se aplica actualmente para los carcinomas mamarios caninos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Grado de malignidad histológica para tumores mamarios caninos (Goldschmidt *et al.*, 2011).

Grado de diferenciación	>75% de túbulos en el tumor	1
	10-75% de túbulos (moderada formación tubular)	2
	<10% de túbulos (ausencia o escasa formación tubular)	3
Pleomorfismo nuclear	Pequeños núcleos regulares o uniformes con un pequeño nucléolo ocasional	1
	Moderado grado de variación del tamaño nuclear, núcleos hipercromáticos y presencia de nucléolos (alguno puede ser prominente)	2
	Marcada variación del tamaño nuclear, núcleos hipercromáticos y a menudo un o varios nucléolos prominentes	3
Índice mitótico (nº mitosis/10 HPF)	0-9 mitosis/10 HPF	1
	10-19 mitosis/10 HPF	2
	>19 mitosis/10 HPF	3
Grado histológico de malignidad (puntuación total)	<b>Grado I. Bien diferenciado</b>	<b>3-5</b>
	<b>Grado II. Intermedio, moderadamente diferenciado</b>	<b>6-7</b>
	<b>Grado III. Poco diferenciado</b>	<b>8-9</b>

Respecto a los sarcomas, sólo se ha determinado su pronóstico en general, siendo considerado muy desfavorable en la mayor parte de los casos, aunque existen escasos estudios al respecto (Dolka *et al.*, 2013). En la actualidad, tan solo existe un sistema para determinar el grado de malignidad de los sarcomas

establecido por Denis y colaboradores (2011) (Tabla 2), no obstante, es necesario que se lleven a cabo nuevos estudios que se ajusten a los métodos necesarios para hacerlo ya que aún existen muchas incertidumbres al respecto.

**Tabla 2.** Grado de malignidad histológica para sarcomas de tejidos blandos (Dennis *et al.*, 2011).

Grado de diferenciación	Bien diferenciado	1
	Poco diferenciado	2
	Indiferenciado	3
Índice mitótico (nº mitosis/10 HPF)	0-9 mitosis/10 HPF	1
	10-19 mitosis/10 HPF	2
	>19 mitosis/10 HPF	3
Índice de necrosis (%)	Ausencia de necrosis	0
	<50% de necrosis	1
	>50% de necrosis	2
Grado histológico de malignidad (puntuación total)	<b>Grado I. Bien diferenciado</b>	<b>≤ 3</b>
	<b>Grado II. Intermedio, moderadamente diferenciado</b>	<b>4-5</b>
	<b>Grado III. Poco diferenciado</b>	<b>≥ 6</b>

Es importante destacar que estos sistemas de clasificación no pueden sustituir al diagnóstico histológico; pero si complementarlo, siendo una herramienta especialmente útil para establecer un diagnóstico, facilitar la interpretación clínica de aquellos diagnósticos histológicos complicados y proporcionar a los patólogos un criterio unificado.

#### **1.4. Marcadores inmunohistoquímicos para células fusiformes**

La inmunohistoquímica (IHQ) ha desempeñado en paralelo con la histopatología, un papel cada vez más importante como herramienta diagnóstica en la identificación de las neoplasias (Peña *et al.*, 2014).

Concretamente en patología mamaria humana, la IHQ se emplea de forma rutinaria para ayudar a establecer el pronóstico y determinar el tratamiento específico que han de recibir las pacientes. Contrariamente, en Medicina Veterinaria, esta no se emplea frecuentemente, aunque en los últimos 15 años se ha incrementado el número de estudios realizados en busca de marcadores inmunohistoquímicos de diagnóstico y/o pronósticos fiables (Peña *et al.*, 2014).

Tanto en la perra como en la mujer, las células normales de la glándula mamaria tienen distintos inmunoperfiles que pueden emplearse para el diagnóstico y el establecimiento de terapias dirigidas. Las células epiteliales luminales se caracterizan por la expresión de las citoqueratinas (CKs) de bajo peso molecular ácidas tipo I, CK-18 y CK-19, y básicas tipo II, CK-5 y CK-6. En cuanto a las células mioepiteliales, mucho más numerosas en los TMC en la perra en comparación con otras especies como la gata y la mujer (Goldschmidt *et al.*, 2011), también expresan otros marcadores como p63, calponina (calp), vimentina (vim), actina de músculo liso (del inglés, *Smooth muscle actin*, SMA), P-caderina (P-cad), CD10, receptor del factor de crecimiento epidérmico (del inglés, *Epidermal growth factor receptor*, EGFR), maspina y proteína sigma 14-3-3 (Destexhe *et al.*, 1993, Espinosa Los de Monteros *et al.*, 2002, Gama *et al.*, 2003, Peña *et al.*, 2014). Sin embargo, un estudio realizado en 2002 (Böcker *et al.*, 2002)

demonstró que de la misma manera que ocurre en la mama de la mujer, las subpoblaciones celulares de la glándula mamaria son mucho más complejas. Mediante el empleo de IHQ de marcaje simple y doble en secciones seriadas de la glándula mamaria canina normal, se identificaron 5 subpoblaciones diferentes: 1) células progenitoras (CK-5+, CK-14+, p63+ y vim+), 2) células mioepiteliales intermedias (CK-5+, CK-14+, p63+, SMA+, calp+ y vim+), 3) células mioepiteliales diferenciadas terminalmente (SMA+, calp+ y vim+), 4) células glandulares lumbales intermedias (CK-5+, CK-14+ y CK-8/18+) y 5) células glandulares lumbales diferenciadas terminalmente (CK-8/18+). Además, los conductos mamaros son considerados nichos regenerativos ya que contienen células progenitoras y células glandulares lumbales intermedias, sin embargo, estos están situados en posición basal, y no en una posición luminal como ocurre en la mujer (Boecker y Buerger, 2003, Rasotto *et al.*, 2014)

De acuerdo con la estandarización del marcaje inmunohistoquímico de los TMC establecido por Peña y colaboradores (2014), para la correcta identificación del fenotipo tumoral es recomendable emplear un panel de anticuerpos que incluya marcadores inmunohistoquímicos para células lumbales (CK-8, CK-18 y CK-19) y células mioepiteliales (p63, calp). Del mismo modo, de acuerdo con estas pautas, para confirmar el diagnóstico de mioepitelioma maligno, es necesario realizar técnicas inmunohistoquímicas que permitan diferenciarlo del fibrosarcoma y otras neoplasias de células fusiformes tanto de origen epitelial como mioepitelial.

Por tanto, en todas estas situaciones, para confirmar la presencia de células mioepiteliales, es recomendable emplear marcadores de fenotipo epitelial (pancitoqueratinas), mioepitelial (p63, calp, SMA) y mesenquimatoso (vim). De esta manera, la inmunotinción positiva para las pancitoqueratinas confirmará el origen epitelial, y la positividad para al menos a uno de los marcadores de células mioepiteliales confirmará la naturaleza mioepitelial de la neoplasia.

Además, es de vital importancia tener cuidado no solo en la selección de los marcadores que se emplearan en la identificación IHQ, sino también en la interpretación de los resultados, ya que se debe tener en cuenta que las células mioepiteliales neoplásicas pueden perder sus características mioepiteliales cuando se produce su transformación mioepitelial-mesenquimatosa (del inglés, *Mioepithelial-mesenchymal transition*, MMT) y adquirir características mesenquimatosas por medio de mecanismos que aún se desconocen (Beha *et al.*, 2012). Por todo ello, una negatividad a un marcador mioepitelial no debe considerarse como excluyente al 100%, de ahí que sea recomendable emplear al menos 2 marcadores mioepiteliales. Aunque todos los marcadores anteriormente mencionados pueden ser empleados, los más adecuados en la identificación de las células mioepiteliales son p63 y calp (Peña *et al.*, 2014).

## **2. Introducción al cáncer inflamatorio mamario**

Existe otra neoplasia mamaria poco frecuente que no se encuentra englobada dentro de la clasificación anteriormente mencionada, conocida como cáncer inflamatorio mamario (CI). Se trata de un tipo especial de neoplasia

mamaria que afecta tanto a las mujeres (del inglés, *Inflammatory breast cancer*, IBC) como a las perras (del inglés, *Inflammatory mammary cancer*, IMC), y es considerada la neoplasia más agresiva, de peor pronóstico y con menor tiempo de supervivencia en ambas especies (Pérez Alenza *et al.*, 2001, Sleenckx *et al.*, 2011, Raposo *et al.*, 2017a). Además, tanto en la mujer como en la perra presenta características genéticas, biológicas y clínico-patológicas diferentes del resto de tumores mamarios (Tavassoli, 1999, Pérez Alenza *et al.*, 2001, Giordano y Hortobagyi, 2003, Pena *et al.*, 2003, Kim *et al.*, 2011).

El IBC fue descrito por primera vez en 1814 por Charles Bell en su libro *System of Operative Surgery*, como un tumor de mama doloroso, que presenta una coloración violácea de la piel de la zona tumoral y de mal pronóstico. A partir de ese momento, en la literatura ha sido denominado bajo multitud de nombres; incluyendo “Síndrome de Volkmann’s”, “mastitis carcinomatosa”, “carcinoma mamario agudo”, “carcinoma escirro agudo”, “linfocitoma de mama”, “carcinomatosis mamaria aguda” y “cáncer de lactación”, todos ellos refiriéndose a la existencia de un tumor mamario agudo y agresivo. Posteriormente en 1924, Lee y Tannenbaurn realizaron una descripción clínica de esta patología (revisado por Anderson y colaboradores (2005) y Singletary Singletary y Cristofanilli, 2008), tras lo cual pasó a denominarse “carcinoma inflamatorio de mama”.

En la actualidad, se denomina genéricamente cáncer inflamatorio mamario y se distinguen dos presentaciones clínicas denominadas, cáncer inflamatorio primario y secundario.

Por otro lado, en Medicina Veterinaria, el cáncer inflamatorio mamario (IMC) fue descrito por primera vez en la especie canina en 1983 por Susanek y colaboradores (1983). Posteriormente, investigaciones realizadas por Pérez-Alenza y colaboradores (2001), Peña y colaboradores (2003) y sucesivos estudios de dicho grupo de investigación, han establecido las características epidemiológicas, clínicas y patológicas de dicha enfermedad, además, de realizar varios estudios enfocados en determinar el perfil hormonal, genético e inmunohistoquímico en la especie canina hasta la actualidad (Pérez Alenza *et al.*, 2001, Peña *et al.*, 2003a, Peña *et al.*, 2003b, Illera *et al.*, 2006, Queiroga *et al.*, 2015).

### **2.1. Características epidemiológicas del cáncer inflamatorio mamario humano y canino (IBC e IMC)**

La prevalencia del CI es muy baja en ambas especies, en la mujer oscila entre 2% y 4% de todos los tumores mamarios (Woodward, 2015) mientras que, en la especie canina, su prevalencia es algo mayor, con una incidencia del 7,6% de todos los tumores mamarios malignos (Perez Alenza *et al.*, 2001).

Respecto a la edad, se ha observado una mayor proporción de casos de IBC en mujeres jóvenes (Il'yasova *et al.*, 2011), estimándose la edad de riesgo de padecer IBC los 57 años respecto a los 61,9 años establecida para el resto de los tumores mamarios no inflamatorios (Anderson *et al.*, 2005). Todo lo contrario, ocurre en la especie canina, donde la edad de aparición es mayor respecto a otros tumores mamarios malignos, determinándose, según diferentes estudios, en 10,2 (Pérez Alenza *et al.*, 2001) o 11,4 años (de M Souza *et al.*, 2009) frente a los 9,9 años.

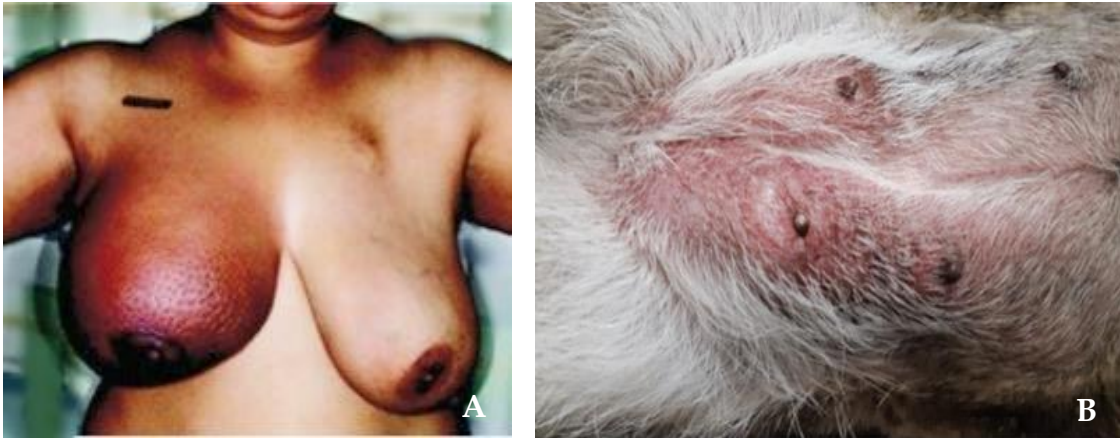
En cuanto al pronóstico en la mujer, cuando se compara con pacientes con cáncer de mama no inflamatorio localmente avanzado y en estadios similares, las mujeres con IBC, tiene un pronóstico desfavorable, con una tasa de supervivencia global de menos del 55% a los 5 años (Cristofanilli *et al.*, 2007, Dawood *et al.*, 2011, Masuda *et al.*, 2014, Rueth *et al.*, 2014, Fouad *et al.*, 2017). Asimismo, en la perra, el pronóstico también es extremadamente desfavorable. Clemente y colaboradores (2009) estimaron un tiempo de supervivencia entre 35 y 57 días, dependiendo de si el animal recibía tratamiento quimioterapéutico o paliativo, respectivamente, aunque M Souza y colaboradores (2009) establecieron un tiempo de supervivencia ligeramente mayor, 183 días, tras el tratamiento de las perras con el antiinflamatorio no esteroideo piroxicam.

## **2.2. Características clínicas e histopatológicas del IBC e IMC**

Tanto en la mujer como en la perra, el CI presenta características biológicas que lo diferencian del resto de tumores mamarios (Giordano y Hortobagyi, 2003). Clínicamente, la principal diferencia que define al CI en ambas especies respecto a otros tumores mamarios malignos es la aparición repentina de edema, eritema, endurecimiento, aumento de la temperatura de la zona, y a menudo la ausencia de una masa bien definida detectable por medio de palpación y mamografía (Pérez Alenza *et al.*, 2001, Robertson *et al.*, 2010, Woodward, 2015) (Figura 1). Asimismo, aunque no es considerado como un criterio diagnóstico, la aparición de retracción, endurecimiento o formación de ampollas o costras en el pezón, también suele ser un hallazgo común en la mujer (Robertson *et al.*, 2010,

Woodward, 2015). Por su parte, en la perra es muy común la afectación de múltiples glándulas mamarias pudiendo también presentar edema en la cara interna de la parte proximal de las extremidades (Pérez Alenza *et al.*, 2001).

En cuanto a la afectación ganglionar, entre el 55% y 85% de las mujeres que padecen IBC, tienen metástasis en linfonódulos axilares y supraclaviculares en el momento del diagnóstico (Robertson *et al.*, 2010). Asimismo, en la perra también se ha descrito la afectación de los linfonódulos axilares e inguinales, así como una severa infiltración del tejido muscular y adiposo adyacente y la aparición de metástasis a distancia, siendo la metástasis pulmonar la más frecuente (Pérez Alenza *et al.*, 2001). Posteriormente, Clemente y colaboradores (2010a) en un estudio comparativo entre los patrones de metástasis de tumores IMC y no-IMC, observaron que las perras con IMC también presentan una gran incidencia de metástasis en vejiga de la orina y aparato reproductor (ovarios, cuerpo uterino y vagina), mientras que la incidencia de metástasis en pulmón, hígado, riñones y hueso fue significativamente menor respecto a las perras con no-IMC.

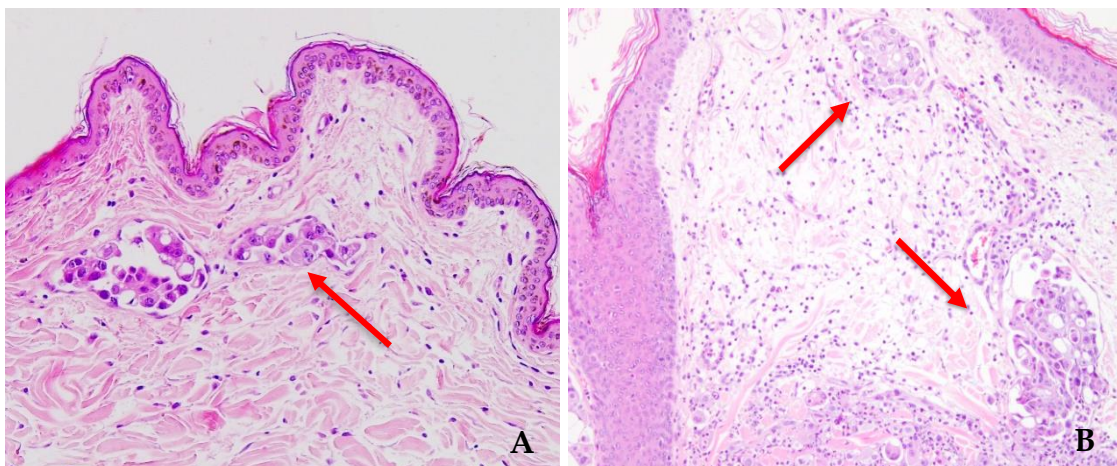


**Figura 1 (A, B).** Signos clínicos de IBC (A) e IMC (B). Aumento de tamaño de la mama y presencia de edema y marcado eritema. **A:** Imagen tomada de Robertson y colaboradores (2010); **B:** Imagen cedida por la Unidad de Oncología Mamaria (UOM), Facultad de Veterinaria).

Es importante destacar que en ambas especies todos estos signos clínicos y especialmente, en ausencia de un nódulo mamario palpable, pueden equivocarse con un proceso inflamatorio de la mama o piel (mastitis o dermatitis), y conducir al establecimiento de un diagnóstico erróneo teniendo consecuencias clínicas negativas para el paciente debido su rápida progresión (Robertson *et al.*, 2010, van Uden *et al.*, 2015).

Histológicamente, la principal característica histopatológica del IBC e IMC que les diferencia del resto de tumores mamarios es la presencia de émbolos tumorales o la invasión de los vasos linfáticos de dermis superficial por células neoplásicas que bloquean el drenaje linfático y causan el edema cutáneo característico (Tavassoli, 1999, Pérez Alenza *et al.*, 2001, Peña *et al.*, 2003a, Robertson *et al.*, 2010, Clemente *et al.*, 2013, Raposo *et al.*, 2017) (Figura 2).

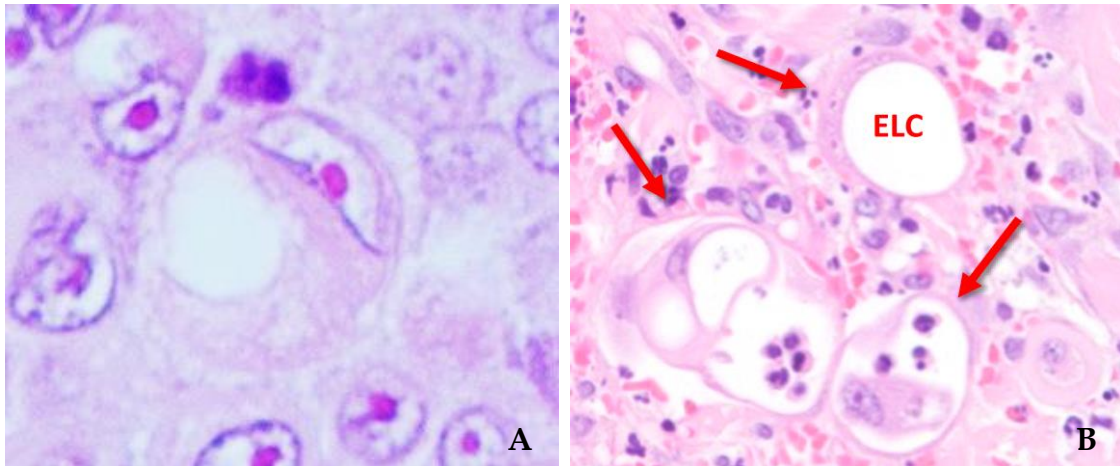
En el IBC, las células que componen dichos émbolos son generalmente de elevado grado nuclear y de fenotipo ductal, mientras que en el IMC se observan dos patrones histológicos de embolización: un patrón tubular/papilar con estructuras tubulares o papilares bien diferenciadas, y un patrón sarcomatoso, caracterizado por células independientes de elevada malignidad histológica (células anaplásicas) (Peña *et al.*, 2003a). Además, frecuentemente los vasos linfáticos que no contienen dichos émbolos tumorales suelen estar marcadamente dilatados (linfangiectasias) (Peña *et al.*, 2003a, Robertson *et al.*, 2010).



**Figura 2 (A, B).** Presencia de émbolos tumorales en vasos linfáticos de dermis superficial (Imágenes: Unidad de Oncología Mamaria (UOM), Facultad de Veterinaria).

Tanto el IBC como el IMC no se corresponden con un subtipo histológico específico, si bien es verdad que el IBC a menudo es de tipo ductal infiltrativo con alto grado de malignidad histológica (Robertson *et al.*, 2010), mientras que para el IMC se ha demostrado que varios subtipos histológicos de alto grado de malignidad como el carcinoma simple (tubular, papilar y sólido), el carcinoma complejo, el carcinoma de células escamosas, el comedocarcinoma y el carcinoma rico en lípidos, producen el fenotipo “inflamatorio” en la perra (Pérez Alenza *et al.*, 2001, Peña *et al.*, 2003, Clemente *et al.*, 2013).

Otra característica relevante del IBC e IMC es su alto potencial angiogénico, linfangiogénico y linfangioinvasivo. Asimismo, en este tipo especial de neoplasia mamaria, es común el fenómeno de mimetismo vascular (del inglés, *Vasculogenic mimicry*, VM) (Figura 3), proceso descrito por primera vez en el melanoma humano (Maniotis *et al.*, 1999) y que es una característica importante de los tumores altamente agresivos y con plasticidad fenotípica (Robertson *et al.*, 2010).



**Figura 3 (A, B).** Mimetismo vascular (VM). Xenotrasplante de IPC-366 en ratón SCID. Células neoplásicas con morfología similar a células endoteliales (*Endothelial-like cells*, ELC). **A.** Célula neoplásica con un gran espacio citoplasmático central sugerente de una luz. **B.** Células neoplásicas individualizadas que pueden contener otros tipos celulares en dicha luz (Imágenes: Unidad de Oncología Mamaria (UOM), Facultad de Veterinaria).

### **2.3. Modelos experimentales de investigación del cáncer mamario en general y del cáncer inflamatorio mamario.**

Dado que el cáncer mama es el cáncer más frecuentemente diagnosticado y la principal causa de mortalidad entre las mujeres de todo el mundo, el desarrollo de estrategias terapéuticas y su prevención son objetivos de vital importancia para un gran número de investigadores.

No obstante, debido a la escasez de muestras de tejido humano y a las cuestiones éticas relativas a la realización de este tipo de investigación en Medicina Humana, los grupos de investigación requieren de modelos *in vitro* e *in vivo* para el estudio de esta enfermedad (Ghoncheh *et al.*, 2016).

El uso de modelos experimentales es necesario con objeto de poder reproducir la evolución fisiopatológica del cáncer (desde su origen hasta las últimas etapas de desarrollo observadas en los pacientes), investigar el posible origen, patogénesis y mecanismos fisiopatológicos involucrados, realizar estudios sobre mecanismos moleculares, identificar marcadores moleculares y analizar y probar compuestos químicos como posibles fármacos potenciales (van Staveren *et al.*, 2009).

### **2.3.1. Modelos *in vitro***

Durante la última década, las líneas celulares de cáncer de mama se han convertido en uno de los modelos más empleados a la hora de investigar esta patología.

Su utilización tiene numerosas ventajas, incluyendo su capacidad de replicación ilimitada, sencillo manejo y bajo coste, además de ser fácilmente reemplazables a partir de reservas congeladas (Holliday y Speirs, 2011, Abdelmegeed y Mohammed, 2018). Sin embargo, entre sus desventajas destacan una propensión a la deriva genotípica y selección fenotípica debido al continuo cultivo de clones procedentes de subpoblaciones (Abdelmegeed y Mohammed, 2018).

La primera línea celular de cáncer establecida fue la línea celular HeLa y se obtuvo a partir de un cáncer cervical (Gey, 1952). A partir de entonces, se desarrollaron más líneas celulares, estableciéndose en 1958, la primera línea

celular de cáncer mamario denominada BT-20 (Lasfargues y Ozello., 1958; revisado por Holliday y Speirs, 2011).

En la actualidad, las líneas celulares de cáncer mamario más empleadas en investigación pertenecen a la serie MCF (siglas de *Michigan Cancer Foundation*), como MCF7; a la serie MDA (aisladas en el hospital *MD Anderson Cancer Center*) como la línea hormono-independiente MDA-MB-231; o las pertenecientes a la serie SUM (creadas en la Universidad de Michigan) como son las líneas SUM149 o SUM190 (Martínez-Carpio y Navarro Moreno, 2003, Lacroix y Leclercq, 2004, Neve *et al.*, 2006).

Se han establecido más de 33 líneas celulares de cáncer de mama que derivan de tumores mamarios primarios, tumores metastásicos y efusiones pleurales (Martínez-Carpio y Navarro Moreno, 2003, Lacroix y Leclercq, 2004, Neve *et al.*, 2006). Sin embargo, son pocas las líneas celulares disponibles para el estudio de la biología del IBC, entre las que se enumeran SUM149, SUM190, MDA-IBC-3, KPL4, y la línea recientemente caracterizada FC-IBC02 (Visan *et al.*, 2016). De todas ellas, SUM149 ha sido la más empleada y en la cual se han determinado muchas de las características biológicas del IBC (Tabla 3).

**Tabla 3.** Líneas celulares más empleadas en la investigación del cáncer de mama (Neve *et al.*, 2006).

Línea celular	Clasificación	Fenotipo	Origen	Tumor de procedencia
BT-20	Basal A	RE-, RP-, HER-2-	Mama	Carcinoma ductal infiltrante
MCF7	Luminal	RE+, RP+, HER-2-	Efusión pleural	Carcinoma ductal infiltrante
MDA-MB-231	Basal B	RE-, RP-, HER-2-	Efusión pleural	Adenocarcinoma
MDA-MB-435	Basal B	RE-, RP-, HER-2-	Efusión pleural	Carcinoma ductal infiltrante
SkBr3	Luminal	RE-, RP-, HER-2+	Efusión pleural	Adenocarcinoma
SUM149	Basal B	RE-, RP-, HER-2-	Mama	Cáncer inflamatorio mamario
SUM159	Basal B	RE-, RP-, HER-2-	Mama	Carcinoma anaplásico
SUM190	Basal A	RE-, RP-, HER-2+	Mama	Cáncer inflamatorio mamario
T47D	Luminal	RE+, RP+, HER-2-	Efusión pleural	Carcinoma ductal infiltrante

Además de las líneas celulares procedentes de la especie humana, también existen varias líneas de cáncer mamario canino. La primera línea de cáncer mamario canino, REM 134, fue caracterizada en 1982 (Else *et al.*, 1982). Posteriormente, se han desarrollado otras muchas líneas celulares; algunos ejemplos son: CMT-1, CMT-2 (Wolfe *et al.*, 1986), CMT-U27, CMT-U111

(Hellmén, 1992), DTK-E y DTK-PYME (Hsiao *et al.*, 2014), KTOSA5 CSKOS (Pang *et al.*, 2014), CHMP (Michishita *et al.*, 2011), CMT-W1 y CMT-W2 (Majchrzak *et al.*, 2013), entre otras.

La obtención de las líneas celulares de cáncer mamario se realiza a partir de metástasis o tumores mamaros primarios tras su escisión quirúrgica y deben conservar las características originales del tumor primario (Pawlowski *et al.*, 2009). Además, alguna de ellas, presentan resistencia frente a distintos fármacos, por lo que se han propuesto como un modelo comparativo útil para el estudio de la resistencia farmacológica (Chang *et al.*, 2010).

En 2015, se estableció y caracterizó la primera y única línea celular de IMC, denominada IPC-366 (Illera-Peña-Cáceres) (Caceres *et al.*, 2015). Se trata de una línea triple negativa (negativa a RE, RP y HER-2), de tipo basal-epitelial, de fenotipo muy agresivo y angiogénico con presencia del fenómeno de mimetismo vascular (VM), y gran capacidad de proliferación tanto *in vitro* como *in vivo*. Deriva de un cáncer inflamatorio mamario primario de perra y mantiene todas las características histopatológicas del IMC *in vivo* (Caceres *et al.*, 2015). Además, comparte muchas características con su homóloga humana, SUM149 (Caceres *et al.*, 2017), lo cual es de vital relevancia, ya que como se ha mencionado anteriormente, en la actualidad hay pocas líneas celulares para el estudio del IBC, de tal manera que, esta línea celular supone un modelo comparativo muy útil en la realización de estudios oncológicos que permitan avanzar en el estudio de ambas enfermedades y la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas.

### 2.3.2. Modelos *in vivo*

El empleo de los modelos animales ha sido fundamental para obtener nuevos conocimientos acerca de los mecanismos que sustentan el desarrollo del cáncer de mama, proporcionando oportunidades para el estudio de estrategias terapéuticas y preventivas frente al cáncer (Abdelmegeed y Mohammed, 2018). En la actualidad, existe una gran variedad de modelos *in vivo* disponibles y la elección del modelo más adecuado depende fundamentalmente de la pregunta/as específicas planteadas en cada estudio (Holen *et al.*, 2017).

Generalmente, los roedores, y especialmente los ratones, son los animales más empleados en la investigación del cáncer de mama. El éxito de estos modelos radica en el profundo conocimiento que se tiene de su biología mamaria (en relación con el desarrollo o aparición de tumores espontáneos), además de la cantidad de genes promotores que han sido caracterizados en esta especie, permitiendo la introducción o eliminación de genes mediante técnicas de ingeniería genética (Borowsky, 2003). Sin embargo, todavía existen numerosos retos en la validación de los modelos murinos para el estudio del cáncer de mama, ya que ciertos subtipos mamarios no pueden ser validados en estos modelos, puesto que no reproducen con precisión las características concretas de estos tumores.

En las últimas décadas, mediante el uso de ingeniería genética se han desarrollado 2 modelos que han sido ampliamente utilizados en el estudio del cáncer de mama: los ratones transgénicos y los ratones *knockout*, genéricamente conocidos como GEMMs (del inglés, *Genetic engineered mouse models*).

Ambos modelos son muy útiles en la evaluación genética del cáncer, permitiendo conocer, no sólo los efectos de las alteraciones producidas en genes individuales, sino también para determinar los mecanismos de cooperación entre múltiples genes involucrados en la tumorigénesis (Menezes *et al.*, 2014, Holen *et al.*, 2017, Abdelmegeed y Mohammed, 2018) y comprender el proceso de iniciación tumoral, el desarrollo tumoral temprano y la recaída tras las terapias. Sin embargo, estos modelos están limitados; por un lado, debido a que las células cancerosas proceden de las células del ratón luego no pueden imitar completamente los tumores humanos y, por otro lado, debido a su escasa predicción de terapias efectivas (Whittle *et al.*, 2015, Holen *et al.*, 2017, Murayama y Gotoh, 2019).

Concretamente, los modelos transgénicos se desarrollan mediante la introducción de un gen exógeno de interés (oncogen) en el genoma de un óvulo fertilizado (Menezes *et al.*, 2014, Murayama y Gotoh, 2019). De todos ellos, los más empleados en la investigación del cáncer mamario son los Erbb2 y MINO (del inglés, *Mammmary intraepithelial neoplasia outgrowth*), empleados especialmente en la investigación de mecanismos moleculares (Namba *et al.*, 2004).

Por otro lado, los modelos *knockout*, se generan mediante la introducción de un vector que codifica una versión modificada y no funcional del gen de interés (gen supresor tumoral) en las células madre embrionarias del ratón (Menezes *et al.*, 2014, Murayama y Gotoh, 2019, Hughes y Saunders, 2011). Estos modelos son particularmente interesantes en la investigación del papel que

desempeñan genes supresores, como los modelos Tp53, que carecen de la expresión del gen p53, o modelos *knockout* para genes supresores de tumores como el Rb, E-caderina o BRCA1 y BRCA2 (Jerry *et al.*, 2000, Moynahan, 2002).

Además de los modelos modificados genéticamente, también encontramos los ratones inmunodeprimidos. Los ratones “*nude*” (atímicos) y SCID (del inglés, *Severe combined immunodeficiency*) (inmunodeficiencia combinada severa) son los roedores más empleados en la realización de xenotransplantes, definiéndose como un transplante de un material biológico a un hospedador perteneciente a una especie diferente de la que procede el material integrado, en este caso células neoplásicas (Borowsky, 2003, de Jong y Maina, 2010).

Las principales ventajas del uso de estos modelos son numerosas: muchos de ellos son reproducibles, fácilmente disponibles y el número de animales a utilizar es estadísticamente válido. Sin embargo, también presentan desventajas derivadas de un elevado coste de mantenimiento, los animales están inmunodeprimidos, el componente estromal del tumor es de origen murino, y, en la mayoría de las ocasiones, los tumores se implantan en localizaciones que no coinciden con la localización original del tumor primario (Teicher, 2006).

Recientemente, los modelos de xenoinjertos derivados de paciente (del inglés, *Patient-derived xenograft*, PDX) han surgido como una poderosa herramienta en la investigación del cáncer de mama frente a los modelos anteriormente descritos, debido a la tendencia actual de ofrecer a cada paciente

un plan de tratamiento individualizado adaptado al tipo de tumor que posee y al estadio clínico en el que se encuentra (Dobrolecki *et al.*, 2016). En estos modelos, las células neoplásicas o pequeños fragmentos del tumor de un paciente obtenidos por medio de cirugía o a partir de una biopsia, son inoculados directamente en un ratón inmunodeprimido (Murayama y Gotoh, 2019, Ramirez *et al.*, 2019). Sus principales ventajas son que retienen las características histológicas, inmunohistoquímicas, genómicas, transcriptómicas y proteómicas del tumor original. Además, se ha demostrado que tienen respuestas al tratamiento comparables a las observadas clínicamente en pacientes, de ahí que sean muy útiles en la evaluación de la eficacia de fármacos antitumorales, y se empleen como modelo de estudio de metástasis (Zhang *et al.*, 2013, Dobrolecki *et al.*, 2016, Liu *et al.*, 2019, Murayama y Gotoh, 2019, Ramirez *et al.*, 2019).

No obstante, el principal problema de estos modelos es que siguen tratándose de ratones inmunodeprimidos, luego las interacciones que se establecen entre las células tumorales y las células inmunitarias en el tumor original no pueden ser reproducidas, lo que dificulta predecir de forma fehaciente la eficacia de los medicamentos probados y determinar los mecanismos de resistencia que se establecen frente a dichos fármacos, todo ello unido a su elevado coste económico (Murayama y Gotoh, 2019).

Con el fin de superar esta desventaja y dado que en las últimas décadas se ha demostrado que los componentes del microambiente tumoral (como las células inmunitarias, fibroblastos, células endoteliales, etc.) juegan un papel muy importante en el crecimiento y mantenimiento del tumor, en la actualidad están

cobrando especial relevancia el empleo de ratones humanizados. Estos modelos se generan mediante la inoculación de células madre hematopoyéticas humanas (del inglés, *Hematopoietic stem cells*, HSC) o leucocitos aislados de sangre periférica o bazo, en ratones inmunodeprimidos que previamente han sido irradiados con objeto de eliminar completamente su sistema inmunitario, y a los que posteriormente se les inocula fragmentos de tumores derivados de un paciente (Pearson *et al.*, 2008, Murayama y Gotoh, 2019). Estos modelos pueden respaldar muchos estudios en muchas áreas de la inmunología, incluida la autoinmunidad, los trasplantes, las enfermedades infecciosas y el cáncer, y son especialmente valiosos en la experimentación donde no se dispone de un modelo animal específico de la enfermedad humana, como ocurre en el caso de algunas enfermedades virales (Pearson *et al.*, 2008).

En la investigación del cáncer mamario en la especie canina, también se dispone de modelos animales, bien por medio de la inoculación en ratones inmunodeprimidos de líneas celulares obtenidas a partir de tumores mamarios caninos (Norval *et al.*, 1984, Kawabata *et al.*, 2006, Gentshev *et al.*, 2009, Chang *et al.*, 2010), o por medio de trasplantes de tumores primarios (Sugimoto *et al.*, 1994, Yamashita *et al.*, 2001). Estos modelos han sido empleados en conocer el comportamiento y las características de los tumores obtenidos (Norval *et al.*, 1984, Sugimoto *et al.*, 1994), así como, en el estudio de terapias antineoplásicas (Yamashita *et al.*, 2001, Chang *et al.*, 2010) y vacunas virales como un posible agente terapéutico frente a los TMC (Gentshev *et al.*, 2009).

En cuanto a la investigación del IMC, también se ha recurrido al empleo de modelos animales. Concretamente, en 2013, Camacho y colaboradores caracterizaron un modelo de ratones inmunodeprimidos trasplantados ectópicamente a partir de tumores primarios de IMC. Los resultados obtenidos, mostraron que los xenotransplantes reproducían las características histológicas del tumor primario, siendo tumores altamente agresivos, con presencia de émbolos tumorales en los vasos linfáticos de dermis superficial, de fenotipo RE y RP positivos y HER-2 negativos y productores locales de estrógenos y andrógenos.

### **2.3.3. Modelos espontáneos animales**

Aunque los estudios *in vitro* a partir de líneas celulares inmortales y los modelos *in vivo*, empleando xenotransplantes de líneas celulares o tejidos derivados de pacientes, indudablemente han aumentado nuestra comprensión acerca de los mecanismos moleculares implicados en el cáncer de mama, también tienen limitaciones significativas, como las elevadas tasas de fracaso de muchos de los fármacos desarrollados. De hecho, se ha estimado que tan solo el 3-6% de los fármacos que muestran resultados prometedores en estos estudios preclínicos finalmente son empleados en clínica (Gray *et al.*, 2020).

Por ello, en los últimos años la oncología comparativa ha surgido como una alternativa a estos modelos, ya que permite investigar el cáncer de mama humano empleando tumores que se desarrollan espontáneamente en los animales.

La especie canina es un excelente modelo para la realización de este tipo de estudios, ya que las perras presentan tasas de incidencia de cáncer de mama similares a la mujer, desarrollan espontáneamente numerosos tumores mamarios y tienen características clínico-patológicas, como la edad, el índice de masa corporal o la influencia hormonal entre otros, similares al cáncer mamario en la mujer (Paoloni y Khanna, 2008, Rowell *et al.*, 2011, Kristiansen *et al.*, 2016). Además, los factores de riesgo involucrados en la carcinogénesis también son similares entre ambas especies, ya que los perros y los humanos comparten un entorno común, estando expuestos a los mismos carcinógenos y, los tumores se desarrollan espontáneamente en presencia de un sistema inmune funcional, incluyendo las complejas interacciones que se establecen entre el sistema inmune y las células tumorales (Pang *et al.*, 2014).

Por otro lado, la vida media de los perros es más corta que la de los humanos, lo que permite a los investigadores estudiar tumores que se desarrollan en un menor período de tiempo, que es suficiente para establecer la comparación de las respuestas al tratamiento, pero sin dejar de ser lo suficientemente corto para asegurar una rápida y fehaciente conclusión de los ensayos clínicos (Gray *et al.*, 2020).

Además, los perros son más similares a los humanos que los roedores en términos de anatomía, fisiología, metabolismo, inmunología y genética (Gray *et al.*, 2020).

Por todas estas razones, la especie canina es considerada cada vez más como un excelente modelo intermedio entre los roedores y los humanos para uso en investigación traslacional y como modelo predictivo para el desarrollo de fármacos en humanos (Paoloni y Khanna, 2008, Gordon *et al.*, 2009, Lokuhetty *et al.*, 2019).

En el caso del CI, las similitudes encontradas en cuanto a características epidemiológicas, clínicas e histopatológicas entre el IBC e IMC demuestran la validez de la perra como un buen modelo natural para el estudio del IBC en el contexto de la investigación oncológica comparada y la investigación traslacional en beneficio de ambas especies (Peña *et al.*, 2003a, Clemente *et al.*, 2010a, Raposo *et al.*, 2017).

#### **2.4. Bases moleculares del IBC e IMC**

En patología humana, la IHQ se emplea de forma rutinaria para determinar el pronóstico y guiar la planificación del tratamiento que van a recibir las pacientes con cáncer de mama, al emplear marcadores específicos para predecir la respuesta a la terapia (Payne *et al.*, 2008). Durante los últimos años, se han realizado esfuerzos considerables para caracterizar y clasificar a nivel molecular los tumores mamarios en la mujer con objeto de poder proporcionar tratamientos individualizados. Sin embargo, debido a las limitaciones económicas y el tiempo que supone su realización, su clasificación molecular todavía se basa en gran medida en la evaluación IHQ de los biomarcadores: receptor de estrógenos (RE), receptor de progesterona (RP), receptor 2 del factor

de crecimiento epidérmico humano (HER-2) y Ki-67, entre otros (Lokuhetty *et al.*, 2019). En base a esto, en la actualidad los tumores mamarios en la mujer se clasifican por medio de IHQ en los siguientes subtipos moleculares: luminal A, luminal B HER-2 negativo, luminal B HER-2 positivo, HER-2 positivo y TNBC (del inglés, *Triple negative breast cancer*) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Clasificación de los subtipos moleculares en el cáncer de mama humano.

Subtipo molecular	RE	RP	HER-2	Ki-67	GHM*
Luminal A	+++	+++	-	Bajo	Bajo
Luminal B HER-2 negativo	+	+/-	-	Alto	Medio/Alto
Luminal B HER-2 positivo	+	+/-	+ / ++	Alto	Medio/Alto
HER-2 positivo	-	-	+++	Alto	Alto
TNBC	-	-	-	Alto	Alto

\*GHM= Grado histológico de malignidad.

+ = bajo; ++ = moderado., +++ = alto; - = negativo.

En cuanto al cáncer de mama triple negativo (TNBC), subtipo molecular caracterizado por la ausencia de expresión de RE, RP y HER-2 , a su vez, puede subdividirse de acuerdo con su perfil genético en: receptor de andrógenos luminal (LAR), mesenquimatoso (MES) y dos subtipos basales de acuerdo con su positividad a citoqueratinas de alto peso molecular (del inglés, *High-molecular-weight cytokeratins*, HMWCK), y son: el subtipo inmunodeprimido (o de tipo basal inmunodeprimido, BLIS) y el inmunoactivado (o de tipo basal inmunoactivado, BLIA), dependiendo de la mayor o menor expresión de genes asociados con las

células T, B y *natural killer* (Rakha y Green, 2017, Harbeck *et al.*, 2019, Lokuhetty *et al.*, 2019) (Tabla 5).

**Tabla 5.** Subtipos moleculares de los tumores mamarios triple negativo (TNBC).

Subtipo molecular de TNBC	Características
LAR	RA +, MUC-1 +
MES	Genes EMT +, PDGFR $\alpha$ +, c-Kit +
BLIS	HMWCK +, VTCN1 +
BLIA	HMWCK +, STAT +

RA: Receptor de andrógenos; MUC-1: Mucina-1 asociada a la superficie celular;

EMT: Transición epitelio-mesenquimatoso; PDGFR $\alpha$ : Receptor  $\alpha$  del factor de crecimiento derivado de plaquetas; c-Kit: Receptor del factor de células madre;

HMWCK: Citoqueratinas de alto peso molecular; VTCN1: inhibidor 1 de la activación de linfocitos T inmunosupresores que contienen el dominio V-set;

STAT: familia de genes transductores de señal y activadores de transcripción.

Todos los subtipos moleculares anteriormente mencionados, pueden aparecer en el IBC, aunque su proporción varía respecto a los tumores mamarios no inflamatorios (no-IBC). Concretamente, la incidencia de tumores positivos al RE es menor en el IBC (30%) respecto a los tumores no-IBC (60%-80%), mientras que los subtipos HER-2 positivos y TNBC son más frecuentes en el IBC, representando un 40% para el IBC frente a un 25% en tumores no-IBC y un 30% frente al 10-15% en tumores no-IBC, respectivamente (Lim *et al.*, 2018). Además, todos estos subtipos son considerados más agresivos en el IBC en comparación con los de los tumores no-IBC, manifestando una menor respuesta terapéutica,

una menor supervivencia y una mayor recurrencia (Masuda *et al.*, 2013, Lim *et al.*, 2018).

Al contrario de lo que ocurre en el cáncer mamario humano donde el establecimiento del subtipo molecular es de gran relevancia, la clasificación molecular no se encuentra tan bien definida en los tumores mamarios caninos. A pesar de las pautas establecidas por Peña y colaboradores (2014) para su evaluación IHQ y la correcta interpretación de los resultados, el porcentaje de estos subtipos moleculares varían enormemente entre los diferentes estudios realizados debido al empleo diferentes métodos de detección y sistemas de evaluación (Gama *et al.*, 2008a, Sassi *et al.*, 2010, Im *et al.*, 2014, Abadie *et al.*, 2018).

Recientemente, en un estudio realizado por Abadie y colaboradores (2018), se determinó que el subtipo molecular más frecuente y con una prevalencia aun mayor que en las mujeres, es el subtipo TNBC (76%), mientras que un 23,7% de los casos son de subtipo luminal, concretamente un 14,3% son luminal A y un 9,4% son luminal B y, además no observaron tumores con sobreexpresión a HER-2 (Abadie *et al.*, 2018). Estos resultados contrastan con algunos estudios previos, que describen al subtipo luminal (tanto luminal A como luminal B) como el subtipo molecular más frecuente, así como la existencia de tumores con sobreexpresión a HER-2 (Gama *et al.*, 2008a, Sassi *et al.*, 2010, Im *et al.*, 2014).

Además, Abadie y colaboradores (2018) determinaron que los tumores TNBC muestran muestra un intervalo libre de enfermedad (del inglés, *Disease-*

*free interval*, DFI) y una supervivencia general (del inglés, *Overall survival*, OS) significativamente menor en comparación con los tumores luminal A (Abadie *et al.*, 2018). Resultados comparables se han obtenido en otros estudios, donde el fenotipo TNBC se relacionó con un elevado grado histológico de malignidad, la invasión linfática y un mal pronóstico, mientras que los tumores luminales A fueron a menudo tumores complejos asociados con un mejor pronóstico y un gran DFI y OS.

#### **2.4.1 Moléculas de adhesión**

La diseminación metastásica de las células tumorales a órganos distantes es una de las principales causas de muerte en pacientes con cáncer. Se trata de un proceso complejo donde una de las características más destacadas es la pérdida de las uniones células-célula como consecuencia de cambios en la expresión y/o función de las moléculas de adhesión (del inglés, *Cell adhesion molecules*, CAM) (Cavallaro y Christofori, 2004, Makrilia *et al.*, 2009). Por ello, estas moléculas se hayan convertido en centro de una intensa investigación, con objeto de determinar si pueden ser empleadas como importantes biomarcadores de diagnóstico y posibles dianas terapéuticas (Makrilia *et al.*, 2009).

Las moléculas de adhesión son proteínas transmembrana ampliamente expresadas en el epitelio y endotelio normal y las células inflamatorias, y median las uniones célula-célula y las interacciones entre las células y los componentes de la matriz extracelular (Janiszewska *et al.*, 2020). Aparte de esta función, también están involucradas en una gran variedad de procesos celulares, como el

mantenimiento de la arquitectura de los tejidos, la embriogénesis, morfogénesis y organogénesis, la transducción de señales, la comunicación celular, el crecimiento y supervivencia celular, la apoptosis, la respuesta inmune e inflamatoria y la reparación tisular (Okegawa *et al.*, 2002, Okegawa *et al.*, 2004, Makrilia *et al.*, 2009, Janiszewska *et al.*, 2020). En función de su estructura y el tipo de unión que establecen se dividen en 4 grupos: caderinas, integrinas, selectinas y miembros de la familia de las inmunoglobulinas (Igs) (Makrilia *et al.*, 2009, Janiszewska *et al.*, 2020).

Respecto a estas moléculas y su papel en el desarrollo y progresión tumoral, destaca la E-caderina (E-cad), una glicoproteína transmembrana perteneciente a la familia de las caderinas localizada en las uniones adherentes (*zona adherens*), que media las uniones intercelulares célula-célula mediante el establecimiento de uniones homofílicas en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Lombaerts *et al.*, 2006). Esta molécula está compuesta por un dominio extracelular externo compuesto por 5 subdominios, un segmento transmembrana y un dominio citoplasmático corto y conservado, el cuál interactúa con el citoesqueleto de actina a través de varias proteínas llamadas cateninas ( $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -catenina). Específicamente, en las uniones adherentes, la  $\beta$ -catenina se une a la región C-terminal de la E-cad y luego, directamente a la  $\alpha$ -catenina formando el complejo caderina-catenina, el cual a su vez se une al citoesqueleto de actina (Cavallaro y Christofori, 2004, Bryant y Stow, 2004).

En condiciones normales, esta proteína de adhesión es esencial en el mantenimiento de la polaridad celular, las uniones célula-célula y la

organización de la arquitectura tisular, y se ha visto que tiene un importante papel supresor en varios cánceres, incluido el cáncer de mama (Rodríguez *et al.*, 2012). Este mecanismo de supresión tumoral puede proceder de la función cohesiva de la E-caderina, que evita que las células tumorales se separen las unas de las otras, impidiendo así su migración hacia otros órganos y tejidos, o alternativamente, antagonizando la función de señalización nuclear de la  $\beta$ -catenina, al alterar su capacidad para regular genes diana que favorecen la iniciación tumoral, ya que la  $\beta$ -catenina es un proto-oncogen (Kaszak *et al.*, 2018).

Sin embargo, la pérdida de su expresión o función por medio de mecanismos genéticos y epigenéticos es un importante prerrequisito para el desarrollo y progresión tumoral, el aumento de la motilidad celular y el potencial metastásico de un tumor (Cavallaro y Christofori, 2004), y además está estrechamente relacionado con el proceso de transición epitelio-mesenquimatosa (EMT).

Algunos estudios han descrito la existencia de cambios genéticos del gen de E-cad (CDH1); incluyendo mutaciones somáticas, reordenamientos de la cromatina o la hipermetilación del gen, en el cáncer mamario humano (Berx y Van Roy, 2001). Específicamente, en el carcinoma lobular infiltrativo (del inglés, *Infiltrative lobular carcinoma*, ILC), el cuál típicamente no muestra una expresión de E-cad, se ha demostrado la existencia de mutaciones inactivantes en combinación con una pérdida de la heterocigosidad del alelo de tipo natural o silvestre (*wild-type*) del gen CHD1, mientras que en el carcinoma ductal infiltrante, el cual muestra una disminución heterogénea de la expresión de E-

cad, no se han encontrado mutaciones de este gen (Berx y Van Roy, 2001). En el caso de la especie canina, aunque se han descrito la existencia de algunas variaciones de dicho gen, tales como los polimorfismos de un solo nucleótido (del inglés, *Single nucleotide polymorphism* SNPs), su influencia en el desarrollo y progresión del cáncer mamario es desconocida (Canadas *et al.*, 2019).

En el cáncer mamario canino, se ha demostrado una asociación significativa entre la pérdida de expresión de E-cad y características clínico-patológicas de agresividad, tales como, un elevado grado histológico de malignidad e índice mitótico, un mayor tamaño tumoral y la presencia de ulceración, necrosis y metástasis en linfonódulos regionales (Brunetti *et al.*, 2003, Gama *et al.*, 2008b, Yoshida *et al.*, 2014). Además, dicha pérdida de expresión también se ha asociado con un mal pronóstico, como una menor supervivencia libre de enfermedad (del inglés, *Disease-free survival*, DFS) y OS (Canadas *et al.*, 2019), demostrando así, la importancia de esta molécula como un importante marcador pronóstico. En el caso de los tumores mamarios en la mujer existe controversia, ya que algunos estudios no han confirmado esta relación (Bukholm *et al.*, 1998, Kovacs *et al.*, 2003, Gama *et al.*, 2008b), mientras que otros (Gillett *et al.*, 2001, Howard *et al.*, 2005) sí que han asociado la expresión de E-cad con la presencia de metástasis en linfonódulos regionales.

Curiosamente, al contrario de lo que ocurre en otros tumores mamarios malignos en la mujer, donde la expresión de esta molécula se pierde con la malignidad, en el IBC, la E-cad está sobreexpresada y distribuida circunferencialmente alrededor de la membrana celular (Ye *et al.*, 2010). Además,

su sobreexpresión también se ha observado en las células tumorales circulantes (del inglés, *Circulating tumor cells*, CTCs) y se ha sugerido que está involucrada en la formación de los émbolos linfovascuales, los cuáles son extremadamente eficientes en la diseminación metastásica y resistentes a la quimioterapia/radioterapia por medio de mecanismos aun desconocidos (Ye *et al.*, 2010, Rodríguez *et al.*, 2012).

De hecho, se ha establecido que una posible explicación en la formación de estos émbolos está estrechamente relacionada con una menor expresión de Sialyl Lewis x/a (sLe<sup>x/a</sup>) y la sobreexpresión de E-cad; de tal manera que, la menor expresión de sLe<sup>x/a</sup> impide la adherencia de estos émbolos al endotelio linfático permitiendo así, que las células tumorales se movilicen en grupos, y al mismo tiempo, la falta de repulsión entre los epítomos de sLe<sup>x/a</sup> favorece el mantenimiento de las uniones homofílicas establecidas por la E-cad aumentando así la cohesión entre las células tumorales (Alpaugh *et al.*, 2002).

En el caso de la perra, tan sólo se ha determinado la sobreexpresión de E-cad en la línea de cáncer inflamatorio mamario IPC-366 (Caceres *et al.*, 2015), mientras que no se ha caracterizado la expresión de sLe<sup>x/a</sup> (Raposos *et al.*, 2017).

Otra importante molécula de adhesión asociada con el desarrollo del cáncer mamario es CADM1 (del inglés, *Cell adhesion molecule 1*), proteína perteneciente a la familia de las inmunoglobulinas involucrada en la adhesión intercelular mediante el establecimiento de uniones homofílicas independientes de Ca<sup>2+</sup> y que ha sido identificada como un importante gen supresor en una gran

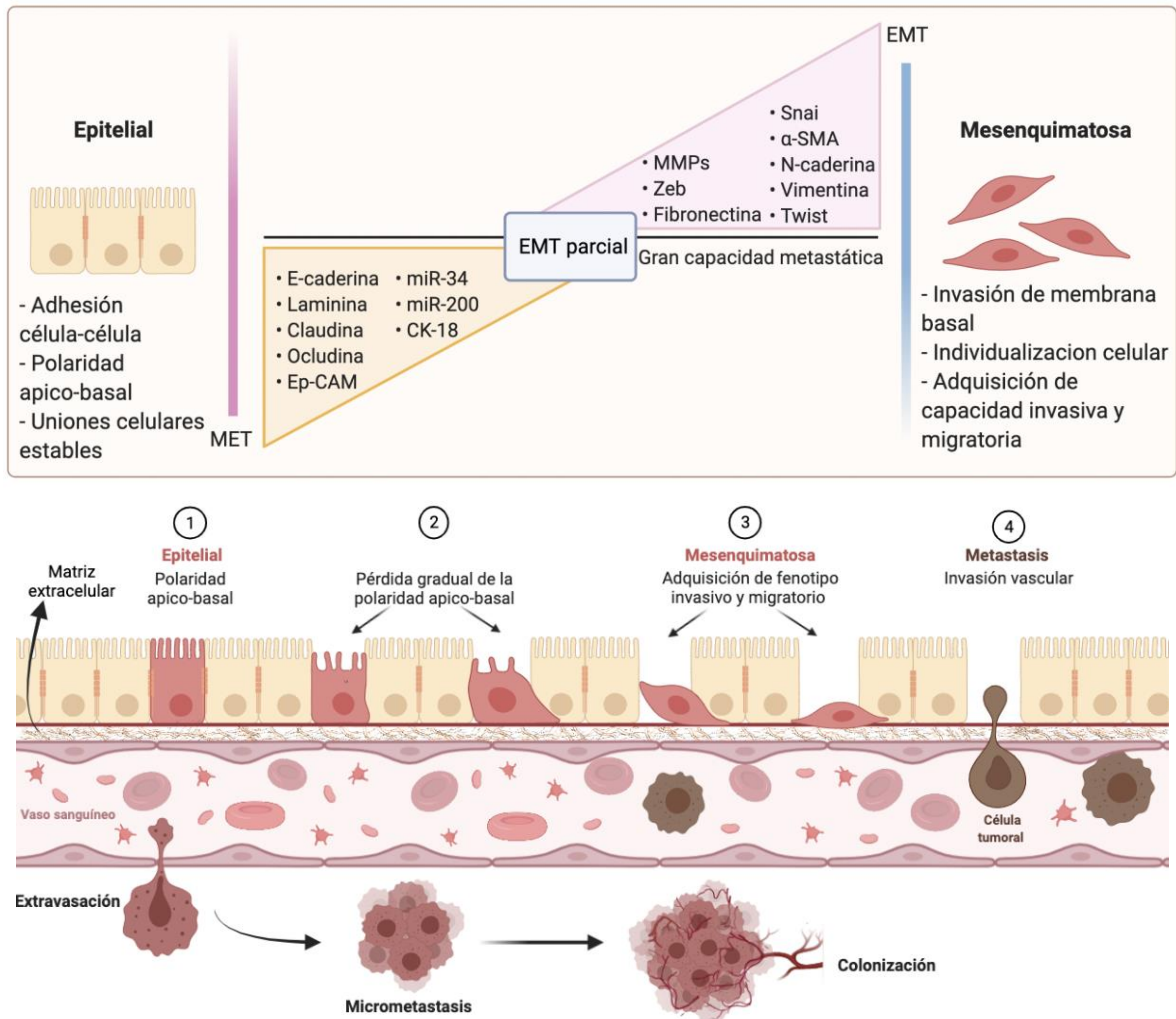
variedad de tumores, incluido el cáncer mamario. En el caso concreto de esta molécula, una pérdida o menor expresión, está asociada con un avanzado estadio tumoral, una mayor invasión linfovascular, la formación de tumores de mayor tamaño, la presencia de metástasis en linfonódulos regionales y un pronóstico desfavorable (Allinen *et al.*, 2002, Heller *et al.*, 2007, Bertolo *et al.*, 2008, Takahashi *et al.*, 2012, Wikman *et al.*, 2014, Saito *et al.*, 2018).

Además, recientemente ha sido identificada como un gen de susceptibilidad a la metástasis (*Metastasis susceptibility gene*), al suprimir el desarrollo de las metástasis al sensibilizar a las células tumorales a los mecanismos de inmunovigilancia mediados por las células T CD8+ (Faraji *et al.*, 2012). En cuanto a su posible papel en la patogénesis del IBC e IMC, no existen estudios previos que hayan determinado un posible papel de esta molécula.

#### **2.4.2. Transición epitelio-mesenquimatosa (EMT)**

La EMT se trata de un fenómeno biológico transitorio implicado en la progresión tumoral y el desarrollo de metástasis. Está mediado por varios factores de transcripción (del inglés, *transcriptor factors of epithelial-to-mesenchymal transition*, EMT-TF); entre los que se incluyen ZEB1, ZEB2, SNAI1/Snail, SNAI2/Slug, TWIST1, TWIST2 y FOXC2 (Kaszak *et al.*, 2018a), así como microRNAs (miRNA) (Ma *et al.*, 2010, Wong *et al.*, 2014), e implica una pérdida del fenotipo epitelial y la adquisición de un fenotipo mesenquimatoso. Una de las características de la EMT es el “cambio de caderina” (*Cadherin switch*),

caracterizado por una pérdida de marcadores epiteliales como E-cad y citoqueratinas y el aumento de expresión de marcadores mesenquimatosos como N-caderina y vim. A través de este cambio se producen una serie de alteraciones tales como, una interrupción de las uniones intercelulares, una pérdida de la polaridad celular, la degradación de la membrana basal, una reorganización de la matriz extracelular y la adquisición de un fenotipo invasivo y migratorio, favoreciendo así la diseminación metastásica (Figura 4). Además, confiere a las células neoplásicas protección frente a la *anoikis*; muerte celular producida tras la interrupción del anclaje de las células a la membrana basal, resistencia frente a la apoptosis y frente a los tratamientos y la adquisición de propiedades de células madre (Nieto *et al.*, 2016, Liao y Yang, 2017, Shibue y Weinberg, 2017, Simeone *et al.*, 2019, Janiszewska *et al.*, 2020, Sun y Yang, 2020, Ribatti *et al.*, 2020).



**Figura 4.** Esquema del proceso de transición epitelial-mesenquimatoso (EMT)

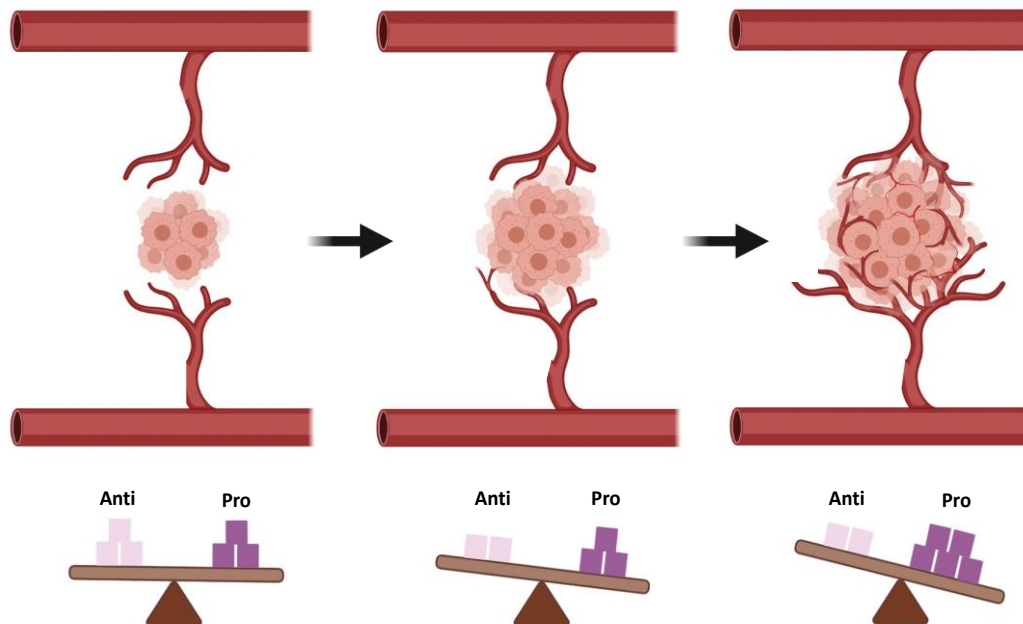
(Adaptado de Zhang *et al.*, 2021).

### 2.5. Angiogénesis tumoral

La angiogénesis es un proceso esencial en multitud de procesos fisiológicos, y su importancia en el desarrollo tumoral y metástasis en el cáncer de mama está bien definida (Wang *et al.*, 2020).

Desde 1971, se sabe que el crecimiento de los tumores sólidos más allá de un volumen de 1-2 mm<sup>3</sup>, está marcadamente condicionado por un aporte suficiente de nutrientes y oxígeno (Folkman, 1971). En las fases iniciales del

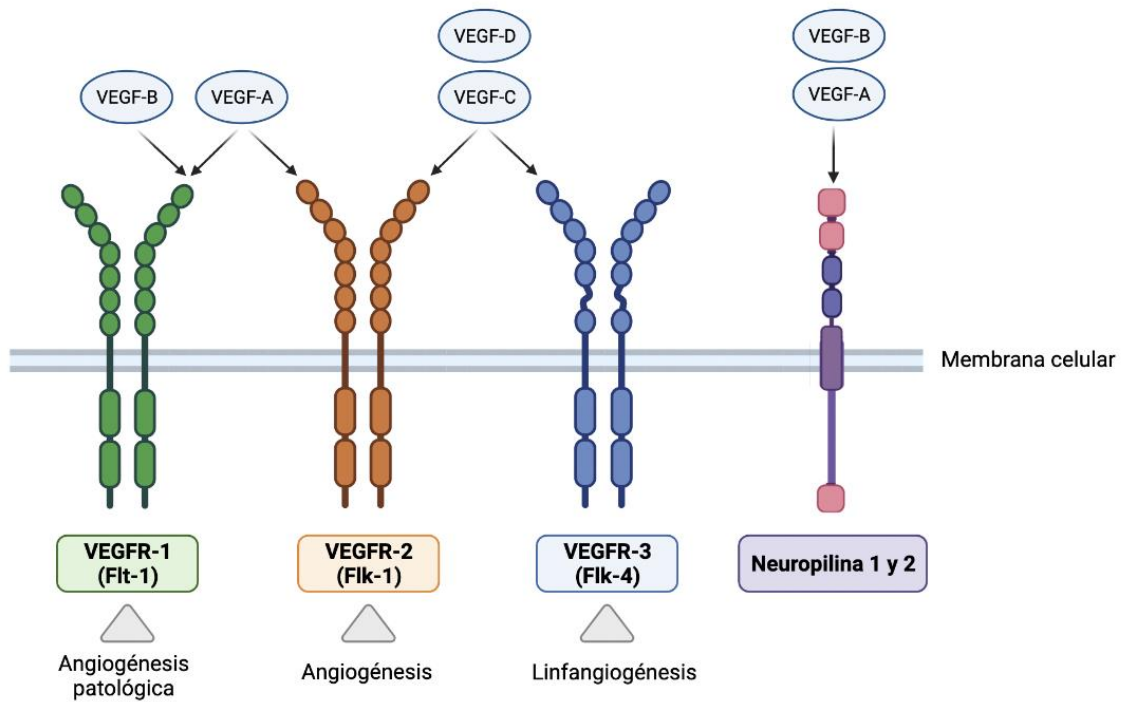
desarrollo tumoral, cuando el volumen de un tumor es menor de  $2 \text{ mm}^3$ , las células neoplásicas no inducen la angiogénesis, y obtienen el oxígeno y nutrientes necesarios por medio de difusión pasiva, en una fase definida como “estado avascular” (Folkman, 1971, Wei *et al.*, 2021). Sin embargo, al exceder dicho volumen, el centro de un tumor sólido no puede obtener suficiente oxígeno y nutrientes tan solo por medio de difusión (Wei *et al.*, 2021). Por ello, para poder seguir creciendo, satisfacer las demandas de oxígeno y nutrientes y hacer frente a la hipoxia, las células tumorales inducen un cambio fenotípico que afecta al equilibrio entre los factores pro y anti-angiogénicos hacia a un estado proangiogénico (“cambio angiogénico”) que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos (Petrovic, 2016, Madu *et al.*, 2020, Wei *et al.*, 2021) (Figura 5).



**Figura 5.** Angiogénesis tumoral. La angiogénesis en tejidos sanos está regulada por un equilibrio entre los factores pro y anti-angiogénicos. En los tumores dicho equilibrio se rompe a favor de los factores pro-angiogénicos, dando lugar a la formación de vasos sanguíneos anormales (Adaptado de Madu *et al.*, 2020).

Esta angiogénesis por brotes es un proceso complejo regulado por factores pro y anti-angiogénicos, entre los que destaca la familia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y sus receptores (VEGFRs), entre otros (Petrovic, 2016, Ramjiawan *et al.*, 2017)

Específicamente, esta familia está constituida por 7 proteínas, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E y los factores de crecimiento placentario PIGF-1 y PIGF-2, las cuáles se unen selectivamente y con diferente afinidad, a tres receptores: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) y VEGFR-3 (Flt-4) expresados en las células endoteliales (VEGFR-1 y VEGFR-2), y en las células del endotelio linfático (VEGFR-3) (Nash *et al.*, 2006, Yehya *et al.*, 2018, Madu *et al.*, 2020). De todos ellos, VEGF-A y VEGF-B, son considerados fundamentalmente angiogénicos y median sus efectos por medio de su unión a los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2, en el caso de VEGF-A; y VEGFR-1 en el caso de VEGF-B. VEGF-C y VEGF-D median tanto la linfangiogénesis como la angiogénesis, por medio de su unión a los receptores VEGFR-3 y VEGFR-2 (Nash *et al.*, 2006) (Figura 6).



**Figura 6.** Interacción de los miembros de la familia del VEGF con los receptores VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 y neuropilina 1 y 2. La señalización a través de VEGFR-2 contribuye a la angiogénesis normal y patológica. La activación de VEGFR-3 es un prerrequisito para la linfangiogenesis, pero también es esencial en la remodelación de la vasculatura sanguínea en el embrión. Los receptores neuropilina 1 y 2 no están directamente involucrados en la señalización, pero parecen facilitar la unión de VEGF-A y VEGF-B a los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2.

Centrándonos en el posible papel de estos factores de crecimiento en el cáncer de mama en general, y específicamente en el CI, se demostró que los tumores IBC tienen una mayor expresión del ARNm de VEGF-A, elevados niveles circulantes de VEGF-A y una mayor expresión de VEGF-A en el estroma tumoral, estando este último asociado con un mayor riesgo de muerte por cáncer de mama y un mayor riesgo de recurrencia en pacientes con IBC (Arias-Pulido *et*

*al.*, 2012, Wang *et al.*, 2020). En el caso de la perra, también se ha descrito una elevada expresión de VEGF-A, pero su valor pronóstico no ha sido evaluado (Millanta *et al.*, 2010, Camacho *et al.*, 2013, Clemente *et al.*, 2013).

En cuanto al VEGF-B, no existen estudios previos que hayan determinado la expresión de este factor tanto en el IBC como el IMC o en los tumores mamarios caninos en general. De hecho, aún no se conoce con exactitud su función biológica, aunque parece ser que promueve la migración de las células tumorales (Nash *et al.*, 2006, Clarke y Hurwitz, 2013).

Finalmente, en cuanto al papel del VEGF-C y VEGF-D en el IBC e IMC, el número de estudios es limitado. En Medicina Humana, estudios empleando líneas celulares y muestras de tejido mamario (Van der Auwera *et al.*, 2004, Kurebayashi *et al.*, 1999), han determinado mayores niveles de ambos factores en los tumores IBC respecto a los no-IBC, además de la existencia de una correlación entre VEGF-C, VEGF-D y VEGFR-3 (Van der Auwera *et al.*, 2004), demostrando así, que el IBC es un tumor altamente linfangiogénico, lo que explica su gran capacidad metastásica también por vía linfática.

En el caso de la perra, no existen estudios previos que hayan determinado la expresión de VEGF-C en el IMC. Sin embargo, su expresión si ha sido demostrada en otros tumores mamarios caninos (Qiu *et al.*, 2008), estableciéndose que sus niveles son mayores en los tumores mamarios malignos respecto a los tumores benignos. Además, de la misma forma que ocurre en la mujer, su expresión es mayor en aquellos tumores mamarios malignos con metástasis en

linfonódulos regionales, lo que sugiere que su expresión puede estar involucrada en la progresión tumoral y metástasis (Qiu *et al.*, 2008).

En cuanto al VEGF-D, si existen estudios previos donde se ha demostrado su expresión en el IMC. Concretamente, Clemente y colaboradores (2013), determinaron una elevada expresión del mismo en los tumores IMC respecto a los tumores no-IMC, además de una asociación entre VEGF-D, VEGFR-3, LPI (del inglés, *Lymphangiogenic proliferation index*) y COX-2, apoyando también la existencia de una marcada linfangiogénesis en el IMC canino (Clemente *et al.*, 2013). Posteriormente, Camacho y colaboradores (2013) corroboraron dichos resultados a partir del uso de un modelo de ratón xenotransplantado de IMC.

Por otro lado, la angiogénesis por intususcepción (o angiogénesis por división), también es otro mecanismo de formación de vasos sanguíneos a partir de la división de un vaso en dos o más vasos. Por último, la angiogénesis a partir de precursores de células endoteliales derivados de médula ósea, donde dichos precursores se diferencian en células endoteliales maduras, también se ha estudiado ampliamente, aunque su implicación en la angiogénesis tumoral y la resistencia a los tratamientos todavía sigue siendo controvertida (Jain y Booth, 2003).

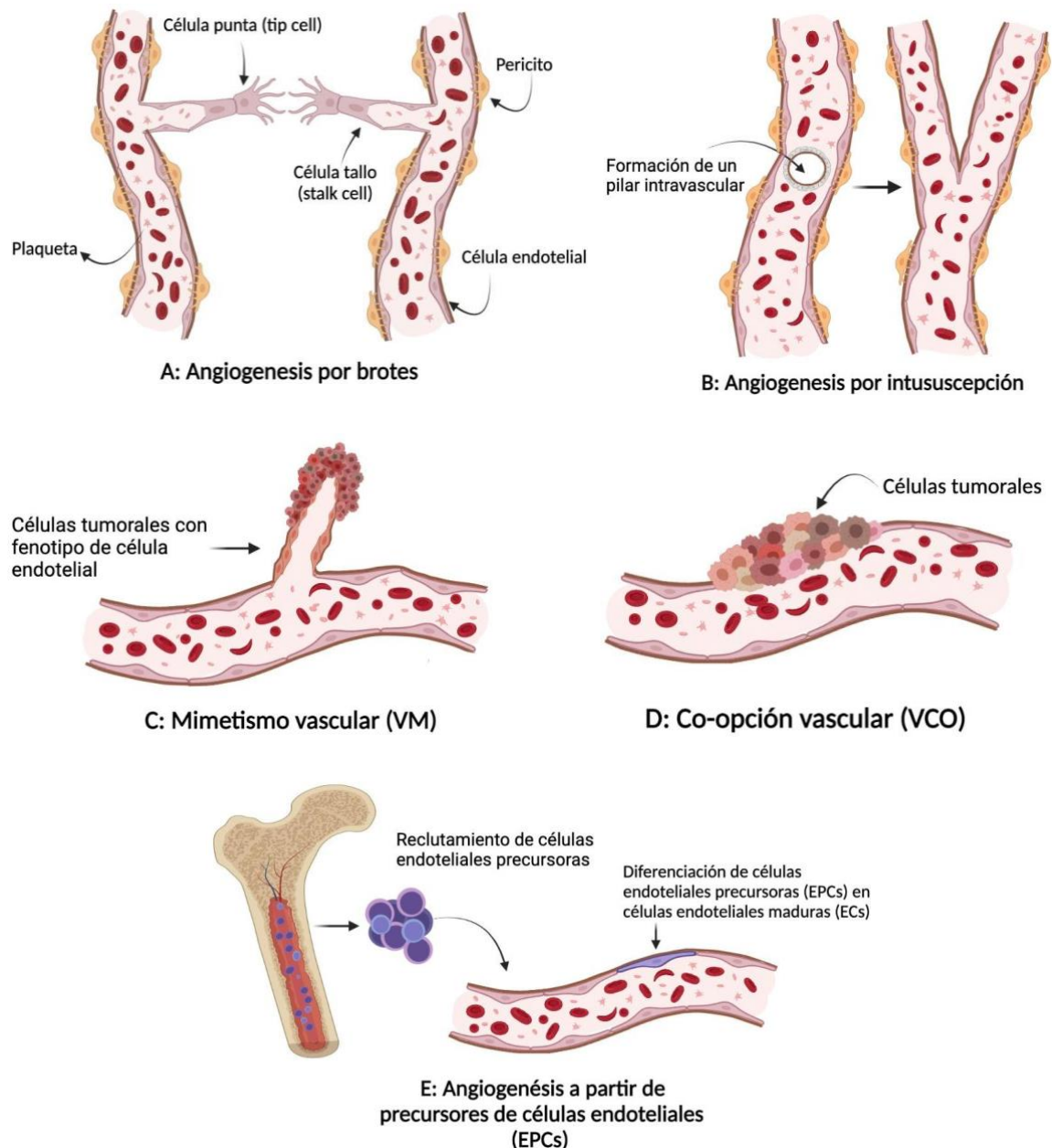
La angiogénesis por brotes, por intususcepción o partir de precursores de células endoteliales derivados de médula ósea, no son los únicos mecanismos por medio de los cuales las células neoplásicas obtienen el oxígeno y nutrientes que necesitan; otros mecanismos recientemente descubiertos y que son exclusivos de

neoplasias muy agresivas, también están involucrados en la angiogénesis tumoral y se han relacionado con la metástasis y el desarrollo de una resistencia intrínseca o adaptativa frente a los tratamientos anti-angiogénicos (Ramjiawan *et al.*, 2017). Estos mecanismos son: el mimetismo vascular (del inglés, *Vasculogenic mimicry*, VM) y la co-opción vascular (del inglés, *Vessel co-option*, VCO) (Valdivia *et al.*, 2021) (Figura 7).

El mimetismo vascular consiste en la formación “*de novo*” de canales vasculares tapizados por células neoplásicas altamente malignas y genéticamente desreguladas. Estas células neoplásicas, expresan marcadores de células madre de cáncer (Caceres *et al.*, 2017), y muestran una morfología similar a células endoteliales (del inglés, *Endothelial-Like cells*, ELC) mediante microscopía electrónica en líneas celulares de cáncer inflamatorio mamario humano (SUM149) y canino (IPC-366) (Barreno *et al.*, 2019). Este mecanismo angiogénico se ha asociado con la diseminación y el desarrollo de metástasis en tumores mamarios malignos humanos y caninos, y se describe como una característica histopatológica frecuente en el IBC (Shirakawa *et al.*, 2002) e IMC (Clemente *et al.*, 2010b).

En la co-opción vascular, las células neoplásicas emplean los vasos sanguíneos preexistentes para obtener un aporte sanguíneo, concretamente, se adhieren estrechamente a los vasos sanguíneos para así satisfacer sus demandas metabólicas sin necesidad de estimular la formación de nuevos vasos (Kuczynski *et al.*, 2019). Se ha demostrado su existencia en varios tipos de tumores en la especie humana, y se ha propuesto como un mecanismo de resistencia frente al

tratamiento con bevacizumab en el cáncer de colon (Ramjiawan *et al.*, 2017). Sin embargo, en Medicina Veterinaria, la co-opción vascular aún no ha sido demostrada (Valdivia *et al.*, 2021).



**Figura 7 (A, B, C, D).** Esquema de los diferentes mecanismos de vascularización tumoral. **A:** Angiogenesis por brotes; **B:** Angiogenesis por intususcepción, **C:** Mimetismo vascular (VM); **D:** Co-opción vascular (VCO), **D:** Angiogenesis a partir de precursores de células endoteliales.

## **2.6. Otros factores relacionados con la angiogénesis tumoral**

### **2.6.1. Enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2)**

Las ciclooxigenasas (COX) son un grupo de enzimas que catalizan la conversión del ácido araquidónico en prostanoïdes (prostaciclina, prostaglandinas y tromboxanos). Tanto en la especie humana como en los animales, COX existe en 3 isoformas: COX-1, la cual está expresada en la mayoría de los tejidos y es responsable de mantener la homeostasis, la protección de la mucosa gástrica y la regulación de la agregación plaquetaria y el flujo sanguíneo renal; COX-2, una isoforma inducible por acción de factores de crecimiento, mitógenos, hormonas y citoquinas proinflamatorias, presente tanto en las células normales como neoplásicas; y COX-3, expresada principalmente en el SNC y la pared aórtica (Tamura *et al.*, 2015, Szweda *et al.*, 2019).

Centrándonos exclusivamente en COX-2, en los últimos años, se ha propuesto la existencia de numerosos mecanismos moleculares que explican como el aumento de la expresión de dicha enzima y la consiguiente producción de prostaglandinas pueden contribuir a la carcinogénesis. Se ha demostrado que COX-2 tiene efectos autónomos en las células tumorales, provocando una estimulación del crecimiento celular y la angiogénesis tumoral, un aumento de la supervivencia celular al disminuir la apoptosis y proporciona una mayor capacidad de invasión a las células tumorales y una mayor capacidad para evadir la respuesta inmune (Rizzo, 2011). Asimismo, COX-2 también induce la expresión de la enzima aromatasa, la cual a su vez regula la producción de estrógenos (Brueggemeier *et al.*, 1999).

En relación con el cáncer de mama, COX-2 se encuentra comúnmente expresada en lesiones premalignas como las displasias, el carcinoma *in situ*, el cáncer invasivo y la enfermedad metastásica en la mujer (Harris *et al.*, 2014), y su expresión está considerada como un importante factor pronóstico, ya que se ha correlacionado con un elevado tamaño tumoral, un avanzado estadio clínico (Shim *et al.*, 2003a), y un elevado grado nuclear (Shim *et al.*, 2003b) y grado histológico de malignidad (Takeshita *et al.*, 2005). Algo similar se ha observado en la especie canina, donde su expresión se ha asociado con la presencia de metástasis en linfonódulos regionales al momento de la cirugía y/o el desarrollo de metástasis a distancia durante el seguimiento clínico, una menor tasa de supervivencia, un menor tiempo libre de enfermedad y un mal pronóstico (Queiroga *et al.*, 2005, Queiroga *et al.*, 2010). Asimismo, también se ha demostrado una sobreexpresión de esta enzima en el IBC e IMC (Van der Auwera *et al.*, 2004, Queiroga *et al.*, 2005, Clemente *et al.*, 2013).

En cuanto a su papel en la angiogénesis tumoral, se ha determinado la existencia de una correlación positiva entre la expresión de COX-2, la expresión de VEGF-A y la densidad microvascular (Costa *et al.*, 2002). Además, COX-2 regula la síntesis de VEGF-C y, por tanto, la linfangiogénesis en el cáncer mamario humano, al observarse que los niveles de ARNm de COX-2 están correlacionados con los niveles de ARNm de VEGF-C (Timoshenko *et al.*, 2006). Asimismo, también contribuye a la formación de estructuras de tipo vascular *in vitro*, de tal manera que las líneas celulares que sobreexpresan COX-2, son más invasivas y originan un mayor número de estas estructuras de tipo vascular en

un menor tiempo que las líneas celulares con una menor expresión de esta (Basu *et al.*, 2005).

En la especie canina, estudios previos también han determinado una correlación entre la sobreexpresión de COX-2 y factores angiogénicos y linfangiogénicos. Específicamente, su sobreexpresión se ha correlacionado con la expresión de VEGF-A en los tumores mamarios de elevada malignidad; sin embargo, en el IMC su expresión está asociada con la expresión de VEGF-D y VEGFR-3, lo que sugiere que COX-2 media un mecanismo diferente en las vías angiogénicas y linfangiogénicas en los tumores mamarios en la perra; estando involucrada en el proceso de angiogénesis en los tumores mamarios malignos y siendo responsable de la marcada linfangiogénesis en el IMC (Clemente *et al.*, 2013).

### **2.6.2. Interleucina IL-8 (CXCL8)**

Las interleucinas son una familia de citocinas secretadas por las células del sistema inmune innato y adaptativo encargadas de regular diferentes funciones biológicas en la respuesta inmunitaria (Yehya *et al.*, 2018). Aunque originalmente fueron descritas como mediadores en el reclutamiento de leucocitos hacia los sitios de inflamación, evidencias recientes apuntan a que alguna de estas interleucinas podría estar involucrada en el cáncer. De todas ellas, la interleucina 8 (IL-8/CXCL8) es una de las más estudiadas, ya que se ha identificado como un potente mediador en la progresión tumoral, angiogénesis y metástasis (Yehya *et al.*, 2018).

Si nos centramos en el papel de la IL-8 en la angiogénesis tumoral, estudios *in vitro* han demostrado que esta interleucina influye en este proceso al favorecer la proliferación y supervivencia de las células endoteliales tras su unión a sus receptores específicos, así como en la formación *in vitro* de estructuras de tipo vascular de forma dosis dependiente (Todorović-Raković y Milovanović, 2013, Yehya *et al.*, 2018).

También se ha demostrado que estimula la expresión de VEGF en las células endoteliales tras su unión a su receptor CXCR-2 y, además, favorece la producción y secreción de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9 por parte de las células neoplásicas y las células endoteliales. De esta forma, estas metaloproteinasas degradan la matriz extracelular, permitiendo así que las células endoteliales abandonen los vasos pre-existentes y migren a la zona donde se desarrolla el tumor. Por ello, que se haya sugerido que esta interleucina puede modular la invasividad y/o intervenir en la remodelación de la matriz extracelular en el entorno tumoral (Li *et al.*, 2005). Parece ser que también intervine en el fenómeno de transición epitelio-mesenquimatosa (EMT), al estar involucrada en el cambio fenotípico que induce una mayor motilidad y capacidad invasiva a las células tumorales y ejerce un papel esencial en la adquisición y/o mantenimiento de las características mesenquimatosas e invasivas de las células tumorales (Todorović-Raković y Milovanović, 2013).

Teniendo en cuenta la importancia de la IL-8 en la angiogénesis, así como en el inicio, la progresión y metástasis del cáncer de mama, esta interleucina se ha definido como un factor pronóstico desfavorable, de tal manera que, elevados

niveles séricos de la misma se han asociado con un avanzado estadio clínico, una mayor agresividad e invasividad, y el desarrollo de metástasis a distancia más precoces (Liu *et al.*, 2016). Además, pacientes con elevados niveles de IL-8 y con linfonódulos negativos a metástasis, tienen un pronóstico más desfavorable, incluyendo un tiempo de supervivencia menor y el desarrollo de metástasis a distancia (Liu *et al.*, 2016). De ahí que, esta interleucina se haya convertido una diana terapéutica en los tratamientos anti-angiogénicos, y sea considerada como un factor pronóstico (Liu *et al.*, 2016, Madu *et al.*, 2020).

En cuanto al IBC, poco se sabe acerca del papel de las interleucinas en este tipo de tumor y los resultados obtenidos son contradictorios. Val Golen y colaboradores (2006) demostraron que tanto la interleucina IL-8 como IL-6 son producidas por líneas celulares de IBC. Shirakawa y colaboradores (2001) determinaron que tanto los niveles séricos de IL-8 en un modelo murino de IBC, como sus concentraciones en el medio de cultivo de líneas celulares de IBC, fueron mayores respecto a los encontrados en células de cáncer mamario no inflamatorio. Sin embargo, en un estudio realizado por Bièche y colaboradores (2004) donde se cuantificaron los niveles de expresión de diferentes citocinas en muestras de IBC se encontró una expresión de IL-6, pero no de otras citocinas proinflamatorias.

Al contrario de lo que ocurre en Medicina Humana, no existen muchos estudios enfocados en el papel de las interleucinas en los tumores mamarios caninos. Aunque inicialmente un estudio de Zuccari y colaboradores (2011) determinó que la IL-8 podía ejercer un efecto protector en el cáncer de mama, ya

que su expresión se correlacionó positivamente con una mayor tasa de supervivencia y la ausencia de metástasis, estudios posteriores del mismo grupo de investigación, así como otros autores (Gelaleti *et al.*, 2012, de Andrés *et al.*, 2013, Baba *et al.*, 2019), han demostrado la existencia de elevados niveles séricos de IL-8 en tumores mamarios malignos respecto a animales sanos.

En el caso de IMC, tan sólo existe un estudio realizado por de Andrés y colaboradores (2013) donde se ha determinado el papel de esta interleucina en este tipo de tumor. Concretamente, han observado que los niveles séricos de IL-8 son mayores en perras con IMC respecto a perras con tumores no-IMC de grado III de malignidad y perras sanas, lo que confirma la participación de la IL-8 en la patogénesis del IMC y su posible asociación con la angiogénesis característica de este tipo de tumor.

## **2.7. Tratamientos anti-angiogénicos**

Dada la importancia de la angiogénesis en la progresión tumoral y el desarrollo de metástasis, durante las últimas décadas se ha realizado una exhaustiva investigación con objeto de determinar las proteínas o mediadores implicados en la estimulación de este proceso y desarrollar tratamientos anti-angiogénicos eficaces que puedan prevenir la liberación de factores pro-angiogénicos, prevenir su unión a sus receptores o inhibir su efecto (Petrovic, 2016, Madu *et al.*, 2020).

De hecho, en Medicina Humana, un tercio de las terapias moleculares en desarrollo clínico están dirigidas contra la angiogénesis (Valdivia *et al.*, 2021), y específicamente contra la familia del VEGF, bloqueando tanto sus ligandos como sus receptores (Ranieri *et al.*, 2006).

De todos ellos, el tratamiento anti-angiogénico más estudiado es el bevacizumab, un anticuerpo monoclonal humano recombinante que se une con alta afinidad a todas las isoformas de VEGF evitando su unión a su receptor (Ferrara *et al.*, 2004) y, por tanto, inhibiendo la proliferación y angiogénesis de las células endoteliales del tumor, reduciendo la permeabilidad vascular y promoviendo la degradación de los vasos tumorales (Li *et al.*, 2015). En 2008, fue el primer fármaco anti-angiogénico aprobado para el tratamiento del cáncer de mama metastásico por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (del inglés, *Food and Drug Administration*, FDA), abriendo el camino a un gran número de otros compuestos con actividad anti-angiogénica. Sin embargo, debido a la falta de mejoras clínicas significativas en estudios posteriores, la aprobación fue revocada en 2011.

Además del bevacizumab, los inhibidores de los receptores tirosina quinasa (del inglés, *Receptor tyrosine kinases*, RTK): pazopanib, sunitinib y sorafenib, entre otros, también se han desarrollado como alternativas terapéuticas atractivas frente a diversos tipos de cáncer; incluido el cáncer de mama, y otras enfermedades, debido a su papel en la regulación de muchos procesos celulares (Grailer y Steeber, 2013). De hecho, muchos de ellos no solo actúan contra la angiogénesis, sino que también disminuyen otras rutas

metabólicas tumorales. Por ejemplo, SU5416 (semaxanib) actúa como un agente anti-angiogénico al inhibir al receptor VEGFR-2 y otros RTK, como VEGFR-1, c-Kit y Flt-3. Específicamente, actúa bloqueando de forma reversible el lugar de unión del ATP del receptor, inhibiendo así su autofosforilación, pero sin afectar a la expresión del receptor VEGFR-2 o su afinidad por el ligando (Grailer y Steeber, 2013). Se ha demostrado que SU5416 ejerce un efecto anti-proliferativo en las células endoteliales cultivadas y, además, presenta efectos anti-angiogénicos *in vivo*, disminuyendo el crecimiento tumoral y la vascularización, en muchos modelos murinos (Vajkoczy *et al.*, 1999, O'Donnell *et al.*, 2005, Grailer y Steeber, 2013). A pesar de sus prometedores resultados en los estudios pre-clínicos como un agente anti-cancerígeno, sus resultados han sido limitados en los ensayos clínicos. Actualmente, aunque ha dejado de ser considerado como un potente agente candidato frente al tratamiento del cáncer sigue siendo ampliamente empleado como una herramienta útil en el estudio de los RTK, en particular en el estudio de su función y vías de señalización (Grailer y Steeber, 2013).

Como ya se ha mencionado previamente, en las dos últimas décadas, los investigadores han identificado algunos cambios moleculares que también pueden ejercer un importante papel en la angiogénesis tumoral, como la expresión de COX-2, de ahí que se haya convertido en un objetivo quimiopreventivo en el cáncer de mama. Por lo tanto, los inhibidores selectivos de la COX-2, como celecoxib, entre otros muchos, han surgido como fármacos anticancerígenos prometedores en el tratamiento y prevención del cáncer de

mama, debido a sus múltiples mecanismos antitumorales, incluyendo la inhibición de la proliferación, la inducción de apoptosis, la inmunorregulación, la regulación del microambiente tumoral, efectos anti-angiogénicos y la sensibilización a otros fármacos antitumorales (Li *et al.*, 2018).

A pesar de los esfuerzos realizados en el desarrollo de nuevos fármacos anti-angiogénicos, no se han obtenido beneficios significativos que superen los posibles efectos secundarios. En pacientes con IBC, estas terapias tienen efectos mínimos en la supervivencia total, en parte debido a que no se conoce con exactitud las características biológicas y los factores pronóstico específicos de esta enfermedad (Arias-Pulido *et al.*, 2012). Algunos autores han propuesto que el uso de terapias dirigidas frente a múltiples vías involucradas en la angiogénesis; con objeto de inhibir los mecanismos alternativos de los tumores de formar nuevos vasos sanguíneos, puede ser muy útil para superar la aparente resistencia desarrollada frente a estos fármacos y mejorar el beneficio clínico de los pacientes (Clarke y Hurwitz, 2013).

En el caso de la perra, el uso de tratamientos anti-angiogénicos es limitado. Tan sólo los fármacos anti-COX-2, cuyo uso ha sido aprobado en Medicina Veterinaria, son empleados no sólo como tratamientos anti-inflamatorios, sino también como terapias adyuvantes en pacientes con cáncer de mama, independientemente de la expresión de la enzima, y en muchos casos incluso ante la falta de ensayos clínicos adecuados (Valdivia *et al.*, 2021).

## **2.8. Hormonas esteroides y cáncer de mama**

En las últimas décadas se han realizado avances significativos con objeto de discernir, que moléculas o factores están involucrados en el desarrollo del cáncer de mama. Existen evidencias significativas de que las hormonas esteroides, principalmente los estrógenos, desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de esta enfermedad, de ahí que se hayan empleado ampliamente como moléculas diana en oncología humana. Igual que en la mujer, en la especie canina también se ha demostrado que los estrógenos son un factor importante en la carcinogénesis de los TMC, ya que la realización de una ovariectomía antes del primer o segundo estro está asociada con una menor incidencia de esta enfermedad (Gray *et al.*, 2020). Además, también se ha determinado su posible potencial pronóstico y predictivo en esta especie (Queiroga *et al.*, 2015), apoyando así el papel de la perra como un buen modelo para el estudio del cáncer mamario humano.

Todos los esteroides endógenos derivan del colesterol, concretamente la principal fuente de colesterol necesario para la síntesis de hormonas esteroides o esteroidogénesis es el colesterol LDL procedente de la dieta. El primer paso de este proceso es el transporte del colesterol a la mitocondria y su posterior conversión en pregnenolona (P5), por acción de la enzima P450<sub>scc</sub> (CYP11A1), la cual se encuentra localizada en la membrana mitocondrial interna (Samavat y Kurzer, 2015, Miller, 2017). La P5 es la hormona precursora para la síntesis de glucocorticoides, mineralocorticoides y esteroides sexuales (Capper *et al.*, 2016). En el caso de los esteroides sexuales, P5 conduce a la producción de

dehidroepiandrosterona (DHEA) y progesterona (P4) a través de dos vías diferentes catalizadas por diferentes enzimas, y a su vez estas dos hormonas son las precursoras de los estrógenos; sulfato de estrona (E1SO4) y 17β estradiol (E2), y los andrógenos; androstenediona (A4) y testosterona (T) (Samavat y Kurzer, 2015, Miller, 2017) (Figura 8).

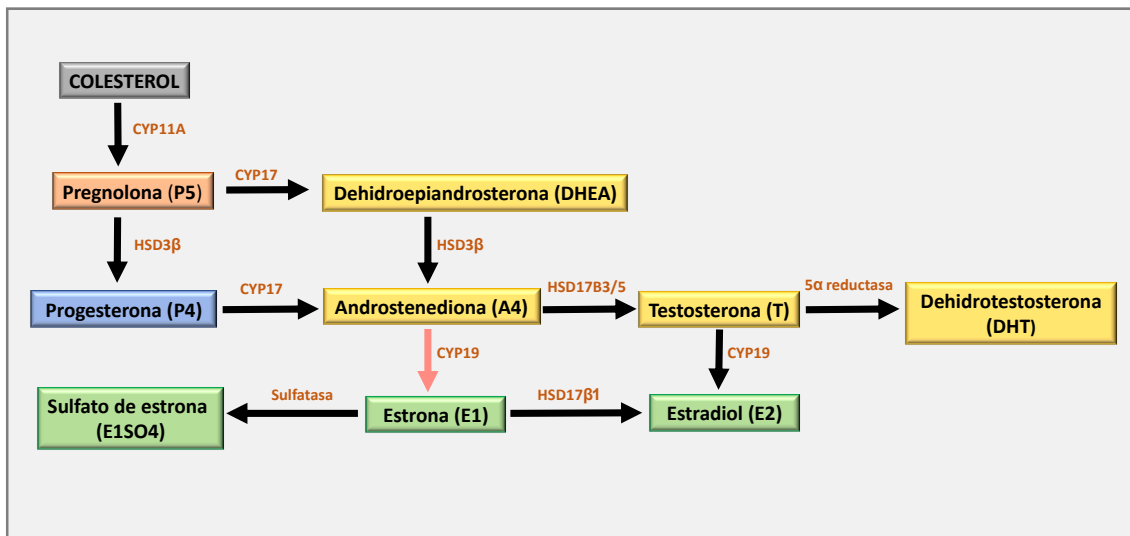
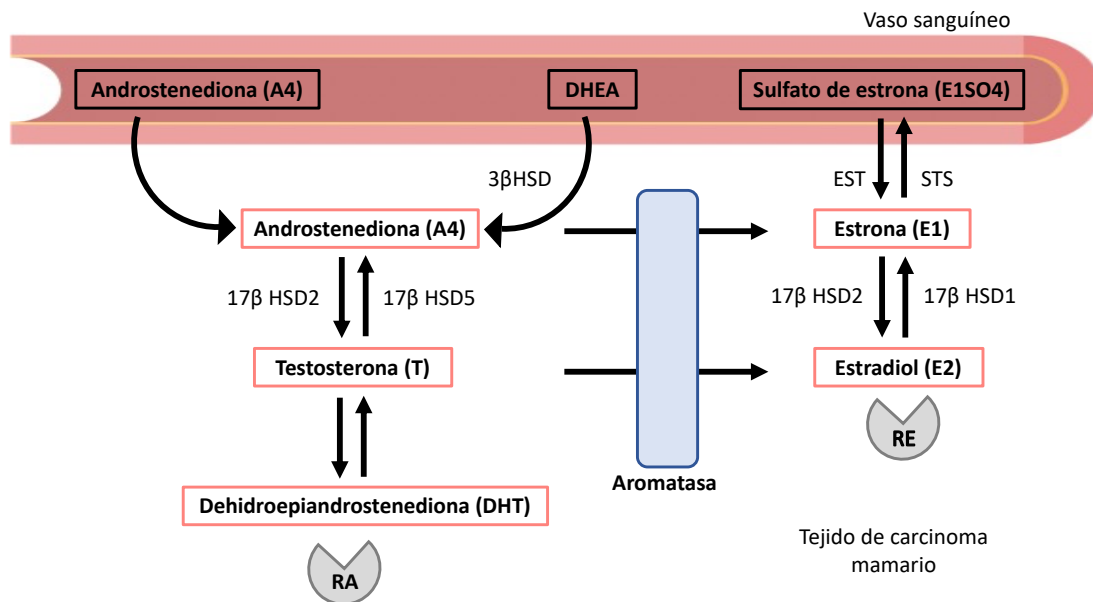


Figura 8. Esquema de la cascada esteroidogénica.

En el caso del cáncer mamario (Figura 9), se ha descrito que los mecanismos de producción local de las hormonas esteroideas ocurren de la siguiente manera: los esteroides circulantes inactivos, A4 y E1SO4, son los precursores mayoritarios en la producción local de estrógenos, lo que sugiere que los estrógenos son producidos *in situ* en el tejido mamario a partir de los esteroides circulantes inactivos. Además, la enzima aromatasa, cataliza la aromatización de los andrógenos, A4 y T, en los estrógenos, E1 y E2, mientras que la enzima sulfatasa esteroidea (del inglés, *Steroid sulfatase*, STS), hidroliza el sulfato de estrona circulante (E1SO4) en estrona (E1), la cuál posteriormente es

convertida a estradiol (E2) por acción de la enzima 17 $\beta$ -HSD deshidrogenasa,. Finalmente, el E2 actúa sobre las células neoplásicas mamarias por medio de su unión a sus receptores Er $\alpha$  y/o Er $\beta$  (Suzuki et al., 2003).



**Figura 9.** Esquema de la biosíntesis de esteroides en el cáncer mamario. Enzimas y precursores implicados en la producción de andrógenos y estrógenos.

### 2.8.1. Progesterona

La posible asociación de la progesterona (P4) con el riesgo de desarrollo del cáncer aún sigue siendo poco conocida.

Al contrario de lo establecido para los progestágenos sintéticos, donde una exposición prolongada a los mismos a partir del uso de anticonceptivos o terapia hormonal sustitutiva (del inglés, *Hormonal replacement therapy*, HRT) durante la menopausia se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama, el papel de la P4 endógena en la fisiología mamaria y en la carcinogénesis está menos definido. Estudios a partir líneas celulares, cultivos tisulares y modelos

preclínicos en la mujer, han relacionado a la P4 con la carcinogénesis (Trabert *et al.*, 2020). Por el contrario, los escasos estudios epidemiológicos existentes, no han mostrado una asociación entre los niveles circulantes de P4 y dicho riesgo de cáncer de mama, y aun no está claro si esto es un reflejo de las limitaciones de los ensayos y técnicas empleados en su determinación, o si se trata de una relación verdaderamente nula (Trabert *et al.*, 2020). Esto que implica la necesidad de realizar más estudios que permitan comprender el papel de la P4 en esta enfermedad.

A diferencia de lo que ocurre en la mujer, en la perra se ha observado que elevados niveles intratumorales de P4 están significativamente asociados con un menor tiempo de supervivencia y tiempo libre de enfermedad, y además se ha sugerido que dichas concentraciones intratumorales de P4 son sintetizadas localmente en los tumores mamarios malignos (Queiroga *et al.*, 2015).

### **2.8.2. Andrógenos**

Al contrario de lo que ocurre con los estrógenos, los mecanismos intracrinos, así como la importancia biológica y clínica de los andrógenos en pacientes con cáncer de mama, no se ha elucidado por completo a pesar de los grandes esfuerzos realizados. La mayoría de los estudios epidemiológicos prospectivos en mujeres postmenopáusicas apuntan que los andrógenos pueden tener posibles efectos adversos en la mama, al observarse una asociación positiva entre los niveles séricos de estos y el riesgo de cáncer de mama (Zeleniuch-Jacquotte *et al.*, 2012). De hecho, se ha determinado que elevados niveles urinarios

y séricos de T, están asociados con un mal pronóstico y una elevada tasa de progresión tumoral (Micheli *et al.*, 2016) y, además, en mujeres postmenopáusicas, una T sérica basal alta es un importante factor pronóstico de recurrencia, desarrollo de cáncer de mama contralateral y metástasis a distancia (Giovannelli *et al.*, 2018). Asimismo, elevados niveles de otros andrógenos, como DHEA y A4, también están correlacionados con el riesgo de cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas. No obstante, no todos los estudios indican la existencia de una correlación entre elevados niveles de T y el riesgo de cáncer. Adly y colaboradores (2006) determinaron que dicho riesgo tan sólo está asociado con elevados niveles de estrógenos, independientemente de los niveles de andrógenos existentes, de tal manera que estos últimos, están indirectamente involucrados en el riesgo de cáncer mama debido a su conversión a E2 por acción de la enzima aromatasa.

Sin embargo, y con algunas excepciones, los estudios *in vitro* postulan que los andrógenos ejercen efectos anti-proliferativos y anti-apoptóticos en las células de cáncer de mama atenuando la proliferación inducida por los estrógenos (Baglietto *et al.*, 2010, Kotsopoulos y Narod, 2012). Asimismo, varios estudios *in vivo* realizados en ratones, ratas, primates y monos Rhesus, también sugieren que los andrógenos, DHEA, T y DHT, ejercen un efecto inhibitorio sobre los efectos proliferativos de los estrógenos en tumores mamarios inducidos (Somboonporn y Davis, 2004). Recientemente, un estudio realizado empleado un modelo murino de ratones macho de IBC e IMC, ha sugerido que los elevados niveles intratumorales de T encontrados, pueden estar asociados con la menor frecuencia

de tumores y las bajas tasas de metástasis encontradas en dichos animales (Caceres *et al.*, 2016). No obstante, en otros estudios, como un estudio piloto en un modelo de primate postmenopáusico donde se evaluó el efecto de la T como un tipo de terapia hormonal alternativa (estrógenos + progesterona + andrógenos), no apoya la idea de que la T antagoniza el efecto de la terapia hormonal convencional (estrógenos o estrógenos + progesterona) sobre la proliferación mamaria o los marcadores de actividad del receptor de estrógenos, al observarse que los efectos de esta hormona fueron mínimos a corto plazo incluso a dosis elevadas (Wood *et al.*, 2009).

Parece ser que estas discrepancias entre los diferentes estudios *in vitro* son debidas a el tipo de línea celular, tipo de andrógeno y dosis empleados, así como al estado del RE de la célula entre los diferentes estudios (Kotsopoulos y Narod, 2012).

En el caso de la perra, se ha observado que los tumores mamarios malignos tienen elevadas concentraciones de DHEA, A4 y T, y estas concentraciones, se han asociado con la presencia de metástasis a distancia y el desarrollo de recurrencia (Queiroga *et al.*, 2015), de tal manera que, estos andrógenos pueden estimular el crecimiento celular, o bien directamente como factores carcinogénicos a través de la activación del receptor de andrógenos (RA), o indirectamente, al actuar como precursores para la síntesis de estrógenos por medio de su aromatización (Nicolás Díaz-Chico *et al.*, 2007).

### 2.8.3. Estrógenos

En general, hay claras evidencias experimentales y clínicas que apoyan el papel de los estrógenos en la carcinogénesis mamaria (Baglietto *et al.*, 2010, Brown y Hankinson, 2015). De hecho, todos los estudios epidemiológicos realizados hasta la fecha en Medicina Humana, han establecido la existencia de una asociación positiva entre el E2; el estrógeno biológicamente más potente, y el cáncer de mama, siendo además especialmente importante en el subgrupo de mujeres con tumores mamarios ER+ (Brown y Hankinson, 2015) donde el riesgo de desarrollar estos tumores aumenta con la exposición a los estrógenos a lo largo de la vida; por ejemplo, debido a una menarquia temprana o una menopausia tardía (Padilla-Rodriguez *et al.*, 2018). Asimismo, los estudios experimentales, también apoyan dicha corriente, al determinar que la señalización de los estrógenos a través de sus receptores estimula la proliferación celular y las señales de supervivencia y disminuye la apoptosis celular (Hilborn *et al.*, 2017).

De la misma manera, en la perra varios estudios también han observado elevados niveles séricos e intratumorales de E2 en tumores mamarios malignos, estando estos últimos asociados con un menor tiempo de supervivencia y un menor tiempo libre de enfermedad (TLE) (Illera *et al.*, 2006, Queiroga *et al.*, 2015).

Se ha postulado la existencia de 3 posibles mecanismos involucrados en los efectos de los estrógenos en la carcinogénesis (Russo y Russo, 2006):

1. Una estimulación de la proliferación celular por medio de su actividad hormonal mediada a través de sus receptores.

2. Su papel como precursores en la formación de metabolitos genotóxicos y/o especies reactivas de oxígeno (del inglés, *Reactive oxygen species*, ROS) generados durante su metabolismo mediado por la enzima citocromo P450, lo que induce el aumento de las tasas de mutación o anomalías cromosómicas.
3. Una regulación de la actividad de las enzimas o factores de transcripción implicados en la señalización redox por ROS, inducidas por estrógenos.

Otro de los estrógenos implicados en la progresión tumoral es el sulfato de estrona (E1SO<sub>4</sub>), del que se han determinado elevados niveles en ambas especies (Pasqualini *et al.*, 1996, Queiroga *et al.*, 2005), estando además asociados con un menor tiempo de supervivencia y un menor TLE en la especie canina. Concretamente, se ha establecido que dicha hormona puede actuar como un reservorio en la formación de estrógenos biológicamente activos y, por ello, promover la progresión tumoral, ya que el tejido mamario también contiene la enzima sulfatasa, la cual puede convertir el E1SO<sub>4</sub> en E1, y finalmente, producir E2 (Pasqualini *et al.*, 1996, Peña *et al.*, 2003b, Queiroga *et al.*, 2015).

Finalmente, si nos centramos exclusivamente en el CI, no hay estudios previos donde se haya determinado la dependencia hormonal del IBC y, por tanto, la posible implicación de las hormonas esteroideas en la patogénesis de esta neoplasia mamaria. Sin embargo, en la perra existen varios estudios (Peña *et al.*, 2003b, Illera *et al.*, 2006) donde se ha llevado a cabo la determinación de las

hormonas esteroides tanto en suero como intratumoralmente en pacientes con IMC, encontrándose elevadas concentraciones de DHEA, A4, T, E2 y E1SO4, lo que parece indicar la existencia de un mecanismo endocrino especial involucrado en el desarrollo de este tipo de tumor mamario en la perra.

## **2.9. Receptores hormonales**

El papel de los receptores hormonales en el cáncer de mama está claramente documentado (Gray *et al.*, 2020). De hecho, en la mujer, la determinación de la expresión del RE y RP se realiza de forma rutinaria para el establecimiento del diagnóstico y la pauta terapéutica a seguir (Wu *et al.*, 2015).

Sin embargo, en la especie canina, el análisis de estos receptores no se realiza de forma rutinaria (Peña *et al.*, 2014), aunque en la actualidad, varios estudios han demostrado que, de la misma manera que ocurre en la mujer, la expresión del RE y RP también puede ser pronóstica y predictiva (Dowsett *et al.*, 2006, Kim *et al.*, 2014).

Concretamente, en el cáncer mamario canino, la expresión del RE y RP se ha identificado aproximadamente en el 70% de los tumores benignos y el 60% de los tumores malignos (MacEwen *et al.*, 1982, Rutteman *et al.*, 1988, Pichon *et al.*, 1996); porcentajes similares a los observados en la mujer, donde aproximadamente el 60-70% de los tumores expresan estos receptores, siendo, además, indicadores de pronóstico muy útiles (Lumachi *et al.*, 2013, Kim *et al.*, 2014, Badowska-Kozakiewicz *et al.*, 2015). Por ejemplo, la expresión del RE en la

mujer está asociada con una mayor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia total, y es, además un factor predictivo de dependencia hormonal y, por tanto, de respuesta a la terapia endocrina mediante el uso de antiestrógenos, como el tamoxifeno o fluvestrant, o bien mediante la inhibición endógena de la síntesis de E2 con inhibidores de la aromatasa (Gray *et al.*, 2020, Valdivia *et al.*, 2021).

En el caso de la especie canina, se ha demostrado que el tejido mamario normal, las displasias mamarias y los tumores benignos expresan mayores niveles de RE que los tumores malignos (Rutteman *et al.*, 1988, Millanta *et al.*, 2005). Además, estudios recientes han determinado que perras con tumores RE-/RP+ tienen peores tasas de supervivencia que perras con tumores RE+/RP+ (Rutteman *et al.*, 1988, Millanta *et al.*, 2005), perras con tumores RE-/RP- tienen el pronóstico más reservado de todos y es frecuente la presencia de metástasis, y tumores RP- tienen una mayor tasa de proliferación que los tumores RP+ (Gray *et al.*, 2020). También, se ha observado una menor expresión del RE en tumores malignos en comparación con tumores benignos y, además esta menor expresión se ha asociado con tumores de mayor tamaño, la presencia de ulceración de la piel, la afectación de linfonódulos y desarrollo de metástasis a distancia, y se ha establecido como un factor predictivo de supervivencia libre de enfermedad y como un factor pronóstico de supervivencia media (Nieto *et al.*, 2000). Por lo tanto, todos estos estudios apoyan que los marcadores moleculares, y especialmente el RE, pueden emplearse como indicadores pronósticos y predictivos de supervivencia en la especie canina, y además ser útiles a la hora

de seleccionar una terapia hormonal adecuada como tratamiento, de la misma manera que ocurre en el caso de la mujer (Nguyen *et al.*, 2018).

En el caso del IBC, aunque este tipo de neoplasia puede presentar cualquier combinación de receptores hormonales, es muy frecuente encontrar una ausencia en la expresión de RE y RP (Van Laere *et al.*, 2006, Robertson *et al.*, 2010), mientras que en la perra, el 87% de los tumores IMC son negativos al RE, y entre un 71-73% de los casos expresan el RP, asociándose la expresión de este último a la presentación secundaria de la enfermedad (Peña *et al.*, 2003c, Clemente *et al.*, 2010a) y su ausencia con la existencia de metástasis pulmonares (Peña *et al.*, 2003a).

Por otro lado, el papel de los andrógenos y su receptor (RA) en la etiología y progresión del cáncer de mama sigue siendo una pregunta sin respuesta. Se ha determinado que este receptor está expresado en el 90% de los tumores RE+ y su expresión está asociada con una respuesta favorable al tratamiento endocrino y un pronóstico favorable, ya que parece inhibir la proliferación celular inducida por E2 (Giovannelli *et al.*, 2018). Sin embargo, en los tumores RE-, no está claro si el RA influye en el pronóstico de estos, ya que no existen estudios previos que hayan establecido una asociación entre su expresión y una mayor supervivencia (Kotsopoulos y Narod, 2012). En el caso de los tumores TNBC, el impacto pronóstico del RA es controvertido. Específicamente, la expresión del RA se ha asociado con la menopausia, un bajo grado de malignidad, un mayor riesgo de afectación de linfonódulos, un bajo grado nuclear y estadio clínico, así como un mayor tiempo libre de enfermedad y menor riesgo de recurrencia; mientras que

la expresión negativa al RA se ha asociado con tumores de mayor grado de malignidad y la existencia de una elevada incidencia de metástasis. Por ello, a pesar de que los estudios iniciales sugirieron que la expresión de RA estaba asociada con un mal pronóstico, las evidencias recientes apoyan que su expresión se asocia con un pronóstico favorable (Gerratana *et al.*, 2018), de ahí que se haya determinado que el RA pueda ser un interesante factor pronóstico y predictivo, así como una potencial diana terapéutica (Kotsopoulos y Narod, 2012, Chen *et al.*, 2020).

En cuanto a su expresión en el IBC e IMC, el número de estudios existentes es escaso. Recientemente, Gong y colaboradores (2014) determinaron que, en la mujer, el RA se encuentra expresado en el 39% de los casos, de los cuáles un 42,6% fueron tumores TNBC y, además, su expresión se asoció con la existencia de invasión linfovascular. En el caso de la perra, se ha observado una mayor expresión de este receptor en los tumores IMC respecto a los no-IMC (Illera *et al.*, 2006, Sánchez-Archidona *et al.*, 2007), así como en las células infiltrantes y metastásicas (Illera *et al.*, 2006, Clemente *et al.*, 2009).

## **2.10. Angiogénesis tumoral y hormonas esteroideas**

A pesar de haberse demostrado que el cáncer de mama es una enfermedad endocrino-dependiente, y de existir una clara evidencia de que la angiogénesis juega un papel esencial en el desarrollo, progresión y metástasis de esta enfermedad, la información que se dispone acerca de la acción de las hormonas

esteroideas en la regulación de dicho proceso y en la expresión de VEGF y sus receptores, es sorprendentemente limitada (Hyder, 2006).

En cuanto al posible papel de los estrógenos en este proceso, diversos estudios *in vitro*, y algunos estudios *in vivo*, han demostrado que estas hormonas intervienen en la regulación del VEGF y sus receptores. En 1995, Zhang y colaboradores, observaron que las células tumorales de la línea celular MCF-7 transfectadas con un vector de expresión de VEGF<sub>121</sub> y suplementadas con E2, eran más angiogénicas y originaban tumores de mayor tamaño en ratones xenotransplantados en comparación con las células no transfectadas con dicho vector. De la misma manera, Nakamura y colaboradores (1996) demostraron que el E2 regula la expresión de VEGF en tumores mamarios de rata y Dabrosin y colaboradores (2003) determinaron en un modelo murino de cáncer de mama, que el tratamiento con E2 incrementa la liberación de VEGF al espacio extracelular, donde es biológicamente activo y puede ser empleado por las células endoteliales. Posteriormente, Garvin y colaboradores (2005) establecieron que el E2 y el tamoxifeno tienen un efecto en el entorno angiogénico del cáncer de mama, al regular los niveles extracelulares de ciertos factores angiogénicos secretados por las células tumorales, así como la expresión de VEGFR-2 en las células endoteliales. Concretamente, estos autores observaron que los estrógenos impulsan un cambio angiogénico por medio de la estimulación de VEGF y VEGFR-2, y la inhibición de la forma soluble del receptor VEGFR-1, favoreciendo así, la angiogénesis tumoral y probablemente contribuyendo a la progresión tumoral; y, por el contrario, el tamoxifeno favorece la inhibición angiogénica.

Además, determinaron que la incubación de las células endoteliales con medio de cultivo procedente de las células tumorales tratadas con E2, donde se detectó una gran cantidad de VEGF, expresaban más VEGFR-2.

Sin embargo, al contrario de lo que ocurre con los estudios experimentales, poco se conoce acerca del papel del E2 en la regulación del VEGF y la angiogénesis en el tejido mamario normal y neoplásico en la mujer. En los pocos estudios que existen, (Dabrosin *et al.*, 2003, Dabrosin, 2005) se ha determinado la existencia de una correlación positiva entre los niveles plasmáticos e intratumorales de E2 con los niveles extracelulares de VEGF en el tejido mamario normal de mujeres, sugiriendo que E2 juega un papel importante en la regulación de VEGF. Sin embargo, dicha correlación no ha sido observada en los tumores mamarios, lo que implica la necesidad de realizar más estudios que investiguen el papel de los esteroides sexuales, y especialmente de los estrógenos, en la mediación de los efectos del VEGF en el desarrollo y progresión del cáncer mama.

Respecto a la progesterona y sus derivados sintéticos en la angiogénesis y/o regulación de la expresión VEGF, la información de la que se dispone es escasa. Tan solo existen algunos estudios previos que han demostrado que, tanto la P4 natural como la P4 sintética, empleada en la terapia de reemplazo hormonal, inducen la expresión de VEGF en las células tumorales mamarias (Hyder *et al.*, 2001, Liang *et al.*, 2005). Además, hay evidencias de que las diferentes isoformas del RP son importantes factores en la inducción de VEGF en las células tumorales mamarias; estableciéndose que la isoforma PR-B es un inductor de VEGF más

potente que la isoforma PR-A, lo que sugiere que tumores con más PR-B crecen más que aquellos que predominantemente contienen PR-A (Wu *et al.*, 2004).

Por otro lado, no existen muchos estudios que hayan investigado específicamente la influencia de los andrógenos en la angiogénesis del cáncer mamario. Tan solo en un estudio realizado por Ruohola y colaboradores (1999) empleando una línea celular mamaria humana y otra murina, se determinó que la T estimula la expresión de ARNm de VEGF, pero de una forma más lenta que en el caso del E2, y, además dicha estimulación probablemente está mediada por el RA.

En el caso de la especie canina, no existen estudios previos que hayan determinado una posible regulación de la angiogénesis por parte de las hormonas esteroides.

A pesar de que el papel de las hormonas esteroides en la angiogénesis aún no ha sido completamente elucidado, el interés generado en los últimos años en la comunidad científica es de vital importancia, ya que podría ser esencial en la prevención de la progresión del cáncer de mama.



## **V. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---



Los tumores mamarios son las neoplasias más frecuentes en la perra. A pesar de su complejidad histológica, la mayoría de estas neoplasias son carcinomas o están constituidos por proliferaciones mioepiteliales fáciles de identificar por medio de técnicas rutinarias. Sin embargo, existen neoplasias mamarias que son poco frecuentes y de las que no se dispone de suficiente información acerca de muchos aspectos de su biología celular; entre ellas se incluyen, los tumores mamarios caninos de células fusiformes (CSCMT) y el cáncer inflamatorio mamario (CI).

Por ello, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral es, precisamente, el estudio de tumores mamarios caninos que, por ser poco frecuentes, no se conocen en profundidad ya que la metodología a emplear para su estudio requiere de una amplia casuística y/o el empleo de modelos experimentales establecidos.

Concretamente, los tumores mamarios caninos de células fusiformes (CSCMT) son neoplasias prácticamente desconocidas debido a su baja prevalencia y a la falta de estudios inmunohistoquímicos que permitan su correcta identificación. Por ello, podrían existir errores de diagnóstico y errores en cuanto a su comportamiento biológico y pronóstico.

En base a esto, uno de los **objetivos específicos** de la presente Tesis Doctoral fue determinar mediante histopatológica y técnicas inmunohistoquímicas los diferentes subtipos histológicos y grado de malignidad

de los CSCMT, además de su epidemiología, características clínicas, y de pronóstico en la especie canina.

Por otro lado, el cáncer inflamatorio mamario (CI), la neoplasia mamaria más agresiva y de peor pronóstico en la mujer (IBC) y en la especie canina (IMC), también es una neoplasia poco frecuente que se caracteriza por ser altamente angiogénica, linfangiogénica y angioinvasiva. Aunque en los últimos años, las terapias frente al cáncer de mama humano han avanzado, la eficacia de los tratamientos anti-angiogénicos en el tratamiento de esta enfermedad, y en particular, en el cáncer inflamatorio mamario humano (IBC) es limitada, y los mecanismos de resistencia involucrados frente a dichos tratamientos aún no han sido completamente elucidados. A pesar de que en las últimas décadas se ha demostrado que el cáncer de mama es una enfermedad endocrino-dependiente, se ha prestado poca atención al posible papel de las hormonas esteroides en el proceso de angiogénesis, por lo que éstas podrían estar involucradas en las respuestas moderadas a estos tratamientos y en el desarrollo de resistencia frente a estos.

De ahí, que otro **objetivo específico** de esta Tesis Doctoral, haya sido determinar la posible influencia de diferentes tratamientos anti-angiogénicos en la producción *in vitro* e *in vivo* de diferentes hormonas esteroides y factores angiogénicos, así como la posible influencia de estas hormonas en la angiogénesis tumoral, por medio del empleo de líneas celulares de cáncer inflamatorio mamario triple negativo, y los correspondientes ratones xenotransplantados.

En la actualidad existen evidencias que indican que cambios en la expresión y/o función de las moléculas de adhesión celular están involucrados en la diseminación tumoral y desarrollo de metástasis y, además juegan un importante papel en el fenómeno de transición epitelio-mesenquimatoso (EMT), siendo E-caderina una de las moléculas más estudiadas. De hecho, y contrariamente a lo que ocurre en otros tumores mamarios malignos, en el IBC esta molécula está sobreexpresada e involucrada en la formación de los émbolos tumorales y metástasis a distancia. Dado que el cáncer inflamatorio mamario canino (IMC) es considerado un buen modelo de estudio de la enfermedad en la mujer, ya que ambas neoplasias comparten numerosas características epidemiológicas, clínicas e histopatológicas; la expresión de E-caderina y otras moléculas de adhesión también podría estar alterada en el IMC de forma similar a lo que ocurre en el IBC y contribuir al fenotipo “inflamatorio” en la especie canina. Por tanto, otro **objetivo específico** fue investigar la expresión de E-caderina y otra molécula de adhesión, CADM-1, en tumores IMC respecto a tumores mamarios no-IMC de grado III de malignidad, y determinar si la sobreexpresión de estas moléculas está relacionada con el “fenotipo inflamatorio” por medio del establecimiento de su posible relación con varios factores angiogénicos y linfangiogénicos comúnmente sobreexpresados en el IBC e IMC.



# **CAPÍTULO 1**

---

## **Estudio de tumores mamarios caninos de células fusiformes (CSCMT)**



-Título del trabajo: **Canine Spindle Cell Mammary Tumor: A retrospective study of 67 cases.** DOI: [0.1177/0300985819829522](https://doi.org/10.1177/0300985819829522).

-Autores: **Alonso-Diez, Ángela; Ramos, Antonio; Roccabianca, Paola; Barreno, Lucía, Pérez-Alenza, M<sup>a</sup> Dolores; Tecilla, Marco; Avallone, Giancarlo; Gama, Adelina; Peña, Laura.**

-Revista, volumen y páginas: **Vet Pathol. 2019 Jul; 56(4): 526-535.**

-Índice de impacto: **2,010 (2019).**

-Posición de la revista en el JCR:

Categoría	Rango JCR	Cuartil JCR	Percentil JCR
Ciencias Veterinarias	28/141	Q1	80,50



## **1. Resumen**

Como ya se ha mencionado previamente, el diagnóstico de los TMC es una difícil tarea debido a su gran complejidad histológica, y aunque en la mayor parte de las ocasiones se tratan de neoplasias de origen epitelial o carcinomas, existe un grupo de tumores mamarios a los que hemos denominado “Tumores mamarios de células fusiformes (CSCMT), que son poco frecuentes.

Estos subtipos histológicos representan un gran desafío diagnóstico tanto para anatomopatólogos como para clínicos ya que existe una escasa información acerca de cómo diferenciarlos y el conocimiento acerca de su comportamiento biológico es limitado. Además, debido a su baja prevalencia, no se dispone de ningún tipo de información específica acerca de su epidemiología, morfología, características inmunohistoquímicas y de comportamiento biológico. Por ejemplo, podría ocurrir que alguno de estos CSCMT diagnosticados por medio de H&E como mioepiteliomas malignos realmente se traten de neoplasias mamarias de origen vascular o neural, es decir, PWT o PNST, no habiéndose demostrado la existencia de estos últimos en la perra. Por ello, los objetivos del presente estudio fueron:

-Recopilar retrospectivamente un número fiable de casos de CSCMT mediante la participación de tres instituciones veterinarias diferentes: 1) el Hospital Clínico Veterinario, Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) (España), 2) el Departamento de Medicina Veterinaria (DIMEVET), Universidad de Milán (Italia), 3) el

Centro de Investigación Animal y Veterinario (CECAV), Universidad de Tras-os-Montes y Alto Duoro (UTAD) (Vila Real, Portugal).

-Determinar mediante histopatología y técnicas inmunohistoquímicas los diferentes subtipos histológicos, el origen y grado de malignidad histológica de estas neoplasias mamarias.

-Establecer mediante la realización de un análisis retrospectivo, la epidemiología, características clínicas y de pronóstico de las pacientes con CSCMT, en aquellos casos en los que sea posible.

Para ello, los tumores mamarios remitidos para su diagnóstico histopatológico entre 1998 y 2013 (13 años) compatibles con CSCMT, fueron retrospectivamente seleccionados. Dichos tumores fueron histológicamente revisados y se determinó su origen probable (mamario, cutáneo o desconocido). Además, los tumores mamarios malignos fueron clasificados empleando el grado histológico de malignidad para sarcomas y para tumores mamarios caninos y se determinó su diagnóstico definitivo por medio de inmunohistoquímica (IHQ).

El estudio reveló que los CSCMT son tumores mamarios de baja prevalencia (1% de todos los tumores mamarios). De todos los CSCMT incluidos en el estudio, 3 CSCMT fueron benignos (1 angioma y 2 mioepiteliomas benignos) y 67 CSCMT fueron malignos, los cuáles, tras la realización de la IHQ fueron diagnosticados como mioepitelioma maligno (64%), carcinoma y mioepitelioma maligno (19%), hemangiosarcoma (8%), sarcoma indiferenciado

(5%), tumor de la vaina nerviosa (PNST) (3%) y fibrosarcoma (2%). Además, el diagnóstico de revisión con H&E cambió en un 75% de los CSCMT malignos tras la realización de la IHQ. La mayoría de los CSCMT malignos fueron tumores solitarios (57%), de gran tamaño ( $6,42 \pm 3,92$  cm), y generalmente de baja agresividad (rara afectación de linfonódulos regionales y/o presencia de metástasis a distancia, y elevada tasa de supervivencia). De acuerdo con el grado histológico de malignidad para sarcomas, los CSCMT con mayor grado de malignidad o grado III estaban asociados con una edad avanzada ( $P = 0,034$ ) y un gran tamaño ( $P = 0,037$ ). En resumen, los CSCMT malignos son neoplasias mamarias que deben ser evaluadas por medio del empleo de técnicas IHQ con objeto de poder determinar su histotipo y poder valorar comportamiento biológico benigno, a pesar de su gran tamaño.

## **2. Diseño experimental**

Al tratarse de tumores prácticamente desconocidos de los que apenas se dispone de información, para la obtención de información relativa a los mismos en la especie canina, se llevó a cabo:

- Selección retrospectiva (1998-2013, 18 años) de tumores mamarios caninos remitidos para su diagnóstico histopatológico compatibles con CSCMT.
- Revisión de las secciones de H&E archivadas de los CSCMT seleccionados y modificación del diagnóstico histopatológico en aquellos casos en los que fue necesario, de acuerdo con la clasificación histológica establecida por Goldschmidt y colaboradores (2011).
- Determinación del origen probable (mamario, cutáneo o desconocido) a partir de las secciones teñidas con H&E, así como el grado de malignidad histológica mediante el empleo de dos sistemas de clasificación; por un lado, el grado histológico de malignidad para sarcomas y, por otro lado, el grado histológico de malignidad para tumores mamarios.
- Determinación del grado de colagenización del estroma tumoral y la presencia de membranas PAS positivas por medio de las técnicas Tricómico de Masson y tinción de Schiff (PAS), respectivamente.
- Establecimiento del fenotipo tumoral mediante el análisis de la expresión de diversos marcadores inmunohistoquímicos (AE1/AE3, CK-14, p63, calp, vim, CD-31, S-100, desmina, GFAP, SMA, miosina y Ki-67) de los CSCMT seleccionados.

- Análisis estadístico de las diferentes variables categóricas y numéricas estudiadas.



# Canine Spindle Cell Mammary Tumor: A Retrospective Study of 67 Cases

Veterinary Pathology  
2019, Vol. 56(4) 526-535  
© The Author(s) 2019  
Article reuse guidelines:  
sagepub.com/journals-permissions  
DOI: 10.1177/0300985819829522  
journals.sagepub.com/home/vet



Ángela Alonso-Diez<sup>1</sup>, Antonio Ramos<sup>2</sup>, Paola Roccabianca<sup>3</sup> ,  
Lucía Barreno<sup>1</sup>, M<sup>a</sup> Dolores Pérez-Alenza<sup>1</sup>, Marco Tecilla<sup>3</sup>,  
Giancarlo Avallone<sup>4</sup> , Adelina Gama<sup>2</sup>, and Laura Peña<sup>1</sup> 

## Abstract

Canine spindle cell mammary tumor (CSCMT) is an infrequent canine mammary tumor (CMT) composed of spindle or fusiform cells, which represents a challenge for pathologists and clinicians. Mammary tumors submitted for histopathology from 1998 to 2013 and compatible with CSCMTs were retrospectively selected. The tumors were diagnosed based on the hematoxylin and eosin (HE)-stained section; malignant tumors were graded using a canine soft tissue sarcoma grading scheme and a canine mammary tumor grading scheme, and they were further assigned a diagnosis based on immunohistochemistry (IHC) for pan-cytokeratin, cytokeratin 14, p63, calponin, vimentin, Ki-67, CD31, desmin, myosin, smooth muscle actin, glial fibrillary acidic protein, and S-100. The origin of the tumors was assessed as mammary, skin, or unknown. The prevalence of CSCMT was 1% of all CMTs. CSCMTs included 3 benign tumors (1 angioma and 2 benign myoepitheliomas) and 67 malignant tumors that after IHC were diagnosed as malignant myoepithelioma (64%), carcinoma and malignant myoepithelioma (19%), hemangiosarcoma (8%), undifferentiated sarcoma (5%), peripheral nerve sheath tumor (3%), and fibrosarcoma (2%). The diagnosis based on the HE-stained section differed from the diagnosis after IHC in 75% of the malignant cases. The majority of malignant CSCMTs were solitary (57%) large tumors ( $6.42 \pm 3.92$  cm) with low metastatic potential and high survival rate (8% tumor-related mortality). Higher sarcoma grade was associated with older age ( $P = .034$ ) and greater tumor size ( $P = .037$ ). Malignant CSCMTs need to be evaluated by IHC to ensure the histotype and the relatively benign clinical behavior, despite their large size.

## Keywords

canine mammary tumor, spindle cell, grading, immunophenotype, prognosis

Canine mammary tumor (CMT) is the most prevalent neoplasm in female dogs, representing between 25% and 50% of all tumors,<sup>15</sup> and is malignant in 30% to 50% of cases.<sup>7,12,15</sup> The histological diagnosis of CMTs is difficult due to their histological complexity, since they can be of epithelial, myoepithelial, or mesenchymal origin and may develop from multiple combinations of the listed cell types.<sup>7</sup> The most frequent types of CMTs are complex adenoma, benign mixed tumor, complex carcinoma, and solid carcinoma.<sup>7,12</sup> There is an infrequent group of CMTs, composed of spindle cells, that have a similar appearance with routine techniques (hematoxylin and eosin [HE]) and therefore need further immunophenotyping to be properly diagnosed.<sup>11</sup> They represent a diagnostic challenge for veterinary pathologists and clinicians, since there is scarce information on how to differentiate these histological types, and the knowledge of their biological behavior is limited or absent.<sup>7</sup> The authors of this study have used the term *canine spindle cell mammary tumors* (CSCMTs) to encompass these neoplasms. Their common histological feature is that they are composed of spindle or fusiform cells. Following the current histologic classification of CMTs,<sup>7</sup> several histological

subtypes are included under this term: carcinoma and malignant myoepithelioma (with minimal epithelial proliferation), benign and malignant myoepithelioma, squamous cell carcinoma–spindle cell variant, spindle cell carcinoma, fibrosarcoma, and hemangiosarcoma. That is, CSCMTs comprise carcinomas (epithelial and/or myoepithelial origin) and sarcomas of uncertain origin that are indistinguishable on a morphological basis.

<sup>1</sup>Department Animal Medicine, Surgery and Pathology, Veterinary Medicine School, Complutense University of Madrid (UCM), Madrid, Spain

<sup>2</sup>Animal and Veterinary Research Centre (CECAV), University of Trás-os-Montes and Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal

<sup>3</sup>DIMEVET, University of Milano, Milano, Italy

<sup>4</sup>DIMEVET, University of Bologna, Ozzano dell'Emilia, Italy

## Corresponding Author:

Laura Peña, Department Animal Medicine, Surgery and Pathology, Veterinary Medicine School, Complutense University of Madrid (UCM), Facultad de Veterinaria, Avda Puerta de Hierro s/n, Madrid 28040, Spain.  
Email: laurape@ucm.es

## **CAPÍTULO 2**

---

**Interacción de tratamientos  
anti-angiogénicos en la secreción de  
hormonas esteroideas en líneas  
celulares triple negativo de cáncer  
inflamatorio mamario**



-Título del trabajo: **Anti-Angiogenic Treatments Interact with Steroid Secretion in Inflammatory Breast Cancer Triple Negative Cell Lines.** DOI:

**10.3390/cancers13153668.**

-Autores: **Alonso-Diez, Ángela; Cáceres, Sara; Peña, Laura; Crespo, Belén; Illera Juan Carlos.**

-Revista, volumen y páginas: **Cancers (Basel). 2021 Jul 21; 13 (15):3668.**

-Índice de impacto: **6,639 (2020).**

-Posición de la revista en el JCR:

Categoría	Rango JCR	Cuartil JCR	Percentil JCR
Oncología	51/242	Q1	79,13



## **1. Resumen**

La angiogénesis tumoral, o formación de nuevos vasos sanguíneos, es un paso importante en el desarrollo, invasión y diseminación de los tumores sólidos, y por ello, representa una diana terapéutica importante. La hipótesis establecida por Judah Folkman (Folkman, 1971) de que los tumores dependen de la formación de nuevos vasos sanguíneos para lograr un crecimiento más allá de un mínimo tamaño, determinó que la prevención de la angiogénesis tumoral podía ser una estrategia antitumoral eficaz. Esta consideración ha llevado a muchos laboratorios a desarrollar agentes anti-angiogénicos y probar su viabilidad como tratamientos frente al cáncer. Sin embargo, aunque muchos de estos fármacos han demostrado ser eficaces en modelos preclínicos, como los ratones xenotransplantados, en muchos casos estas terapias no han conseguido las expectativas esperadas ya que, en la mayoría de los ensayos clínicos, el beneficio en términos de supervivencia ha sido modesto. De hecho, muchos tumores son capaces de escapar de la acción de estas terapias y volver a crecer, lo que implica un fracaso en el cumplimiento del objetivo original de estos tratamientos que es mantener a los tumores en una especie de estado de latencia (Folkman, 1971).

Teniendo en cuenta que el IBC es un tumor altamente angiogénico, linfangiogénico y angioinvasivo, estos tratamientos anti-angiogénicos han sido evaluados en diferentes ensayos clínicos, sin embargo, la falta de beneficios substanciales en la supervivencia total de las pacientes con IBC todavía sigue siendo un importante desafío (Arias-Pulido *et al.*, 2012). Esto implica una urgente

necesidad de comprender porque la mayoría de los pacientes dejan de responder o no responden en absoluto a dichos tratamientos (Ebos y Kerbel, 2011). De hecho, en los últimos años se ha propuesto la existencia de numerosos mecanismos involucrados en la resistencia frente a estas terapias.

En la actualidad existen claras evidencias clínicas y experimentales que indican que las hormonas esteroides (estrógenos y andrógenos), están involucradas en el desarrollo y progresión del cáncer de mama, y recientemente, se ha sugerido que también pueden estar involucradas en el proceso de angiogénesis (Hyder, 2006, Botelho *et al.*, 2015). Por ello, los objetivos específicos del presente capítulo fueron:

-Determinar la posible influencia de diferentes terapias anti-angiogénicas en la producción *in vitro* e *in vivo* de diferentes hormonas esteroides y factores angiogénicos empleando dos líneas celulares de cáncer inflamatorio mamario triple negativo de origen humano (SUM149) y de origen canino (IPC-366), así como en los correspondientes ratones xenotransplantados.

-Determinar la posible influencia de dichas hormonas esteroides en la angiogénesis tumoral.

Para ello, ambas líneas celulares y los correspondientes ratones xenotransplantados fueron tratados con diferentes concentraciones de los tratamientos anti-angiogénicos SU546, bevacizumab, celecoxib, además de

VEGF. Posteriormente, las concentraciones de las hormonas esteroides, progesterona (P4), dehidroepiandrosterona (DHEA), androstenediona (A4), testosterona (T), dihidrotestosterona (DHT), sulfato de estrona (E1SO4) y 17 $\beta$ -estradiol (E2), y los factores de crecimiento angiogénicos VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D e IL-8, fueron determinadas en los medios de cultivo, homogeneizados tumorales y suero por medio del empleo de la técnica de EIA.

Los resultados del estudio demostraron que en condiciones *in vitro*, la progesterona (P4) y el estradiol (E2) inducen la producción de VEGF y por ello, promueven la proliferación celular, mientras que los andrógenos están involucrados en la formación *in vitro* de estructuras de tipo vascular. Por otro lado, las elevadas concentraciones intratumorales de testosterona (T) encontradas tras la inoculación de los tratamientos anti-angiogénicos, bevacizumab y celecoxib, podrían estar asociadas con una menor tasa metastásica y aparición de metástasis, mientras que en el caso del sulfato de estrona (E1SO4), elevadas concentraciones de esta hormona podrían promover la progresión tumoral tras el empleo de SU5416.

En resumen, las hormonas esteroides sexuales podrían estar involucradas en la producción de factores angiogénicos y la determinación de estas, así como de los factores angiogénicos en el medio donde son biológicamente activos podría ser especialmente útil en el desarrollo de estrategias preventivas y terapéuticas individualizadas.

## **2. Diseño experimental**

Para poder llevar a cabo el establecimiento de los objetivos anteriormente mencionados se procedió:

- Determinación de la viabilidad celular de las líneas celulares SUM149 e IPC-366 en condiciones de crecimiento adherente tras la adición de los diferentes tratamientos anti-angiogénicos estudiados.
- Determinación de las concentraciones de hormonas esteroides (P4, DHEA, A4, DHT, T, E1SO4 y E2) y factores angiogénicos (VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D e IL-8) en los medios de cultivo de ambas líneas celulares tras la adición de dichos tratamientos.
- Establecimiento de la capacidad *in vitro* de ambas líneas celulares de formar estructuras de tipo vascular y estudio del efecto de los diferentes tratamientos anti-angiogénicos en la formación de dichas estructuras mediante el empleo del ensayo de formación de tubos (*Tube formation assay*).
- Determinación de los niveles de hormonas esteroides (P4, DHEA, A4, DHT, T, E1SO4 y E2) y factores angiogénicos (VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D e IL-8) en los medios de cultivo de los grupos control y grupos experimentales de ambas líneas celulares tras la realización del ensayo de formación de tubos.
- Determinación de parámetros de curvas de crecimiento tumoral y frecuencia de aparición de metástasis a distancia entre los ratones

xenotransplantados con ambas líneas celulares tratados con los diferentes tratamientos anti-angiogénicos respecto a los grupos control.

- Análisis estadístico de las diferencias encontradas en cuanto al crecimiento tumoral, aparición de metástasis a distancia y concentraciones de las diferentes hormonas esteroides y factores angiogénicos en el medio de cultivo, homogeneizado tumoral y suero entre los grupos experimentales y los grupos control, tras dichos tratamientos.



## Article

# Anti-Angiogenic Treatments Interact with Steroid Secretion in Inflammatory Breast Cancer Triple Negative Cell Lines

Ángela Alonso-Diez <sup>1</sup>, Sara Cáceres <sup>2,\*</sup> , Laura Peña <sup>1</sup> , Belén Crespo <sup>2</sup> and Juan Carlos Illera <sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Department Animal Medicine, Surgery and Pathology, Veterinary Medicine School, Complutense University of Madrid (UCM), 28040 Madrid, Spain; angalo02@ucm.es (Á.A.-D.); laurape@vet.ucm.es (L.P.)

<sup>2</sup> Department Animal Physiology, Veterinary Medicine School, Complutense University of Madrid (UCM), 28040 Madrid, Spain; belencre@ucm.es (B.C.); jcillera@ucm.es (J.C.I.)

\* Correspondence: sacacere@ucm.es; Tel.: +34-653-675-149

**Simple Summary:** Inflammatory breast cancer (IBC) is the most aggressive breast cancer and is associated with poor prognosis. Exacerbated angiogenesis, lymphangiogenesis and lymphangiotropism are hallmarks of this tumour. Current antiangiogenic therapies have minimal effects on overall survival in IBC patients. Furthermore, it is well established that steroid hormones are strongly related to tumour development and progression, angiogenesis regulation and metastasis. We investigated the effect of different antiangiogenic therapies on steroid and angiogenic growth factor production using two inflammatory breast cancer cell lines. We reported that sex steroid hormones could regulate the production of angiogenic factors, since after the results, P4 and E2 were involved in VEGF production and androgens in the formation of vascular-like structures. Moreover, we reported that elevated intratumoural concentrations of T and E1SO4 could be associated with decreased metastatic rates and the promotion of tumour progression, respectively, and thus the measurement of sex steroids and growth factors may be useful to develop preventive and individualised therapeutic strategies.



**Citation:** Alonso-Diez, Á.; Cáceres, S.; Peña, L.; Crespo, B.; Illera, J.C. Anti-Angiogenic Treatments Interact with Steroid Secretion in Inflammatory Breast Cancer Triple Negative Cell Lines. *Cancers* **2021**, *13*, 3668. <https://doi.org/10.3390/cancers13153668>

Academic Editor: Claudio Luparello

Received: 14 June 2021

Accepted: 16 July 2021

Published: 21 July 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Human inflammatory breast cancer (IBC) is a highly angiogenic disease for which antiangiogenic therapy has demonstrated only a modest response, and the reason for this remains unknown. Thus, the purpose of this study was to determine the influence of different antiangiogenic therapies on in vitro and in vivo steroid hormone and angiogenic growth factor production using canine and human inflammatory breast carcinoma cell lines as well as the possible involvement of sex steroid hormones in angiogenesis. IPC-366 and SUM149 cell lines and xenotransplanted mice were treated with different concentrations of VEGF, SU5416, bevacizumab and celecoxib. Steroid hormone (progesterone, dehydroepiandrosterone, androstenedione, testosterone, dihydrotestosterone, estrone sulphate and 17 $\beta$ -oestradiol), angiogenic growth factors (VEGF-A, VEGF-C and VEGF-D) and IL-8 determinations in culture media, tumour homogenate and serum samples were assayed by EIA. In vitro, progesterone- and 17 $\beta$ -oestradiol-induced VEGF production promoting cell proliferation and androgens are involved in the formation of vascular-like structures. In vivo, intratumoural testosterone concentrations were augmented and possibly associated with decreased metastatic rates, whereas elevated E1SO4 concentrations could promote tumour progression after antiangiogenic therapies. In conclusion, sex steroid hormones could regulate the production of angiogenic factors. The intratumoural measurement of sex steroids and growth factors may be useful to develop preventive and individualized therapeutic strategies.

**Keywords:** anti-angiogenic therapies; inflammatory breast cancer; IMC; IBC; steroid hormones

## 1. Introduction

Normal and neoplastic mammary glands are considered endocrine tissues due to the local biosynthesis of steroid hormones [1–4]. Oestrogens are essential for breast development and maintenance by binding to receptors: oestrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) and

oestrogen receptor beta (ER $\beta$ ) [5]. Several studies have demonstrated a strong association between elevated levels of circulating oestrogens and their metabolites with an increased risk of breast cancer development [6–10]. Moreover, experimental data support that oestrogen signalling by ER $\alpha$  in breast cancer results in DNA damage, cellular proliferation and decreased apoptosis [11,12].

On the other hand, the role of androgens and their receptors in breast cancer development and progression is a debated topic. Prospective epidemiologic studies have shown that circulating androgens in postmenopausal women are positively associated with breast cancer, based on their role as oestrogenic precursors [13,14]. However, data from in vitro and in vivo studies suggest that they may also exert an antiproliferative and apoptotic effect [13,15].

In order to grow and metastasise, tumours require an adequate blood supply of oxygen and nutrients. Thus, angiogenesis, the formation of new blood vessels from pre-existing ones, is critical in the development, progression, and metastasis of tumours [16,17]. The angiogenic process (sprouting angiogenesis) is relatively complex and characterised by an angiogenic switch in the dynamic balance between proangiogenic and antiangiogenic factors, shifted towards an irreversible proangiogenic state, leading to the recruitment of a new vascular supply [17]. Among the proangiogenic factors, the vascular endothelial growth factor family (VEGF) and their receptors (VEGFRs) stand out [18] playing critical roles in initiating and promoting angiogenesis [19].

However, apart from these angiogenic factors, data on the effects of sex steroid hormones on this angiogenic switch is emerging in the literature. Although a clear picture is not still available, several recent investigations suggest that both oestrogen and progesterone are involved in the process of angiogenesis by their regulatory effects on VEGF and its receptors [20,21].

Since angiogenesis has become an important target, there has been intensive research in order to determine the proteins or mediators involved in prompting angiogenesis and finding effective antiangiogenic drugs that can decrease the release of pro-angiogenic factors, prevent their binding to receptors or inhibit their actions [17,22]. Specifically, antiangiogenic therapies against the VEGF family block either the ligands or the receptors [23]. The most widely studied antiangiogenic therapeutic is bevacizumab, a humanised monoclonal antibody that binds with high affinity to VEGF-A preventing its binding to its receptor, thus inhibiting tumour vascular endothelial cell proliferation and angiogenesis, reducing vascular permeability, and promoting tumour blood vessel degradation [24]. Small-molecule tyrosine kinase inhibitors (TKIs) that block the VEGF family receptors have also been developed. For instance, SU5416 is a small molecule inhibitor of VEGFR-2 and other several tyrosine kinase receptors (TKRs), including VEGFR-1, c-Kit and Flt-3 [25], that exerts an antiproliferative effect on cultured endothelial cells, and inhibits tumour growth and decreases vascular density in xenograft models [26,27].

Moreover, over the past two decades, researchers have identified some molecular changes that also play important roles in breast cancer, such as COX-2, becoming a potential chemoprevention target for breast cancer. Therefore, selective COX-2 inhibitors, such as celecoxib, emerged as promising anticancer drugs in the treatment and prevention of breast cancer due their multiple potential antitumour mechanisms, including the inhibition of proliferation, induction of apoptosis and antiangiogenic effects among others [28–36].

Inflammatory breast cancer (IBC) is the most lethal and aggressive spontaneous form of locally advanced breast cancer with a high rate of metastases [35,37] and is characteristically highly angiogenic and angioinvasive [38]. Furthermore, IBC is associated with abnormal mRNA VEGF levels, high circulating VEGF and stromal VEGF expression [35,39], and it has been established that high COX-2 expression correlates with worse overall survival (OS) and higher nuclear grade in IBC patients [35]. For this special type of breast cancer, these current antiangiogenic therapies have minimal effects on overall survival in IBC patients, and the reason for this remains unknown.

Several studies have revealed that canine inflammatory mammary cancer (IMC) is a good spontaneous animal model for the study of IBC [3,40,41]. IPC-366, a uniquely established canine IMC cell line [42], has demonstrated to be a good model in comparison with its human counterpart SUM149 [15]. Exacerbated angiogenesis, lymphangiogenesis, lymphangiogenesis and vasculogenic mimicry (VM) have been similarly observed in both cell lines [42], so they represent interesting models for the study of angiogenesis in this special type of tumour [43].

Since antiangiogenic therapies have shown limited results and the production of steroid hormones is strongly related to tumour development, progression and angiogenesis regulation, the aim of the present study was to determine the influence of different antiangiogenic therapies on *in vitro* and *in vivo* steroid production using the IBC and IMC cancer cell lines to improve current knowledge of this type of breast tumour and the possible influence of sex steroid hormones on the modest responses of these therapies.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Cell Line Culture

The triple-negative canine IMC cell line, IPC-366, was obtained from the Department of Animal Physiology of Veterinary Medicine School of the Complutense University of Madrid, Spain, and was cultured in Dulbecco's modified Eagle medium nutrient mixture F-12 Ham (DMEM/F12; Sigma Aldrich, D6421) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA, F7524), 1% penicillin–streptomycin solution (Sigma Aldrich, P0781) and 1% L-glutamine (Sigma Aldrich, G7513).

The SUM149 triple-negative human IBC cell line was originally obtained from Asterand, Plc. (Detroit, MI, USA) and was grown in Ham's F-12 medium (Invitrogen, 21765029) supplemented with 5% FBS (Sigma Aldrich, 12103C), 1 µg/mL hydrocortisone (Sigma Aldrich, H4001), 5 µg/mL insulin (Sigma Aldrich, I9278) and 1% penicillin–streptomycin solution (Sigma Aldrich, P0781).

Both cell lines were cultured in 25 cm<sup>2</sup> culture flasks and maintained in a humidified 5% carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) atmosphere at 37 °C. The cell cultures were observed daily by phase-contrast microscopy (Optika XDS-2 Inverted Microscope, Euromicroscopes, S.L., Barcelona, Spain) to check cell viability and growth.

### 2.2. In Vitro Treatments

VEGF (specifically, VEGF165 isoform, which shares amino acid sequences between human and canine species [44]), a key mediator of angiogenesis; the RTK inhibitor SU5416; and the selective COX-2 inhibitor, celecoxib, were obtained from Sigma Aldrich (Madrid, Spain). The anti-VEGF drug, bevacizumab, was kindly supported by Genentech Inc. (San Francisco, USA).

All drugs were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), stored at –20 °C and diluted in the corresponding fresh culture medium immediately before use.

Cultured IPC-366 and SUM149 cells were divided into a control group, treated with DMSO (final concentration, <0.1%), and four experimental groups, in which different concentrations of the different drugs tested were added to the culture medium.

To determine the sensitivity of IPC-366 and SUM149 cells to the effects of VEGF, SU5416, bevacizumab and celecoxib, different concentrations were used to determine the critical final concentrations to be used in the MTS assay.

For *in vitro* treatments, IPC-366 and SUM149 cells were exposed to 0.62, 1.25 and 2.5 µM concentrations of VEGF. SU5416, bevacizumab and celecoxib at 1.5, 3 and 6 µM final concentrations were added to the culture medium.

### 2.3. Cell Viability Assay (MTS Assay)

To evaluate cell viability, IPC-366 and SUM149 were assayed using the CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, according to manufacturer's instructions (Promega, Madrid, Spain). Briefly, a total of  $1 \times 10^6$  IPC-366 and SUM149 cells per well

were seeded in 96-well plates, and the different concentrations of all studied drugs were added. After 24, 48 and 72 h, the media were removed, and 100  $\mu$ L of media containing 20  $\mu$ L of MTS was added to each well and incubated at 37 °C for 3 h in a humidified, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Absorbance was recorded at 490 nm using a 96-well SpectraMax 190UV/Vis plate reader. Untreated cells were considered to represent 100% proliferation, and all drug-treated cells were expressed relative to this. Each experiment was performed in quadruplicate and repeated at least three times.

The culture supernatants of untreated and treated cells removed at 24, 48 and 72 h were collected and frozen at –20 °C until hormone analysis.

#### 2.4. Tube Formation Assay

Tube formation assays were performed as described by Guo et al. [45]. Briefly, growth factor-reduced Matrigel (Sigma Aldrich, E6909) was plated on the bottom of a 24-well plate (Corning Costars TC-treated Multiple Well Plates, Ref 353047) and left at 37 °C for 30 min for solidification. Thereafter, a total of  $5 \times 10^4$  IPC-366 and SUM149 cells were seeded on previously coated matrigel wells with their corresponding culture media containing 0.25% BSA. Both IPC-366 and SUM149 cells were divided into a control group and 4 experimental groups, treated with a final concentration of 1.5  $\mu$ M for VEGF, SU5416, bevacizumab and celecoxib, respectively. Plates were incubated at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> conditions for 12 h. Optical images of the wells were taken at 6 h at 10 $\times$  magnification with a phase-contrast microscopy (Optika XDS-2 Inverted Microscope, Euromicroscopes, S.L, Barcelona, Spain). Incomplete networks were excluded, and vessel-like structures were quantified by counting vessel-like tubes in each well using the ImageJ Angiogenesis Analyzer software. The experiments were repeated two times, each time with duplicate wells. At the end of the assay, the corresponding culture media of untreated and treated cells of both cell lines were collected and stored at –20 °C until hormone analysis.

#### 2.5. Experimental Animals and Treatments

In total, 130 female Balb/SCID mice were obtained from Harlem Laboratories Models, SL (Barcelona, Spain), early in the morning with dams to minimize shipping stress and adapted for 7 days in the Animal Facility (Animal Physiology Department, Veterinary Medicine School, Complutense University of Madrid (UCM)). The mice were housed in polycarbonate cages (one to two animals per cage) in a room with controlled environmental conditions (temperature:  $23 \pm 2$  °C; relative humidity:  $50 \pm 10\%$ ; 10–15 air changes per hour; and 12:12 h light:dark cycle). Soy-free pellet food (Dyets, Inc, Bethlehem, Pennsylvania) and water, previously sterilised, were provided *ad libitum*. The required sample size needed to simultaneously compare the normal means of the five experimental groups was determined using the sample size determination module of the statistical package Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, Virginia) resulting in a total of five mice per group studied. Experimental protocols of this study were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Complutense University of Madrid, Spain (number: Proex 31/15). All procedures were completed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and conformed to the relevant EU Directive.

A suspension of  $10^6$  IPC-366 and SUM149 cells in 200  $\mu$ L of phosphate-buffered saline (PBS) was subcutaneously inoculated in the left ventral region of 6–8-week-old female Balb/SCID mice with a 21-gauge syringe. Mice were inspected twice weekly for the development of the tumours until a volume of 0.5 cm<sup>3</sup> was reached. Once the previous volume was reached, mice were divided into five experimental groups: a control group ( $n = 10$  mice, five mice of IPC-366 and five mice of SUM149), injected with DMSO, and four experimental groups ( $n = 15$  mice per group, five mice per dosage), injected with the corresponding dosage of each treatment. The dosages employed per treatment were established as low, medium and high for VEGF (0.2, 0.4 and 1 mg/kg), SU5416 and

bevacizumab (1, 5 and 10 mg/kg) and celecoxib (0.5, 2.5 and 5 mg/kg), respectively, and were chosen based on the literature [46–49].

For treatment administration, mice were intraperitoneally injected in the right ventral region with a 21-gauge syringe every three days for a total of 15 days. The tumour volumes were assessed every three days by measuring the length and width with callipers and estimated using the following formula: volume = (width)/2 × (length)/2, where the width is the smaller of the two dimensions [50].

When tumours reached a volume of 1.5 cm<sup>3</sup> (end-point) or at the end of treatment, blood samples were obtained intracardially using a 1 mL syringe with a 25-gauge needle and collected in heparin-coated tubes (S-Monovette<sup>®</sup> Lithium-Heparin Gel+, Sarstedt, Spain). Prior to this procedure, animals were anaesthetised with isoflurane (IsoVet) at 4% for induction and 1.5% for maintaining sedation, supplied at a fresh gas flow rate of 0.5 L of oxygen/minute. After blood collection, animals were euthanised by a lethal dose of isoflurane and tumours and organs were harvested at necropsy for subsequent analysis.

### 2.6. Histological Examination

To assess tumour invasion to distant organs and metastatic ability, lungs and livers were collected and fixed in 10% buffered formalin solution (pH 7.4) for 24 h. Then, samples were trimmed, embedded in paraffin wax, sectioned at 3 µm thickness and stained with haematoxylin and eosin (H&E) for light microscopic examination. As no visible metastatic nodules were found, micrometastases were scored in haematoxylin and eosin (H&E)-stained sections of paraffin-embedded tissues. Specifically, the micrometastases were verified at ×10 magnification and counted at ×40 magnification. Mean scores of lungs and liver micrometastasis were based on five mice per group, with each score acquired from counts of all pulmonary and hepatic lobes. As no specific marker was used for tumour cells, metastasis at the single cell level or as small cell clusters could not be accurately determined, unless cancer cells appeared as overt colonies. Both pulmonary and hepatic metastases were scored by two independent trained pathologists (A.A.D and L.P).

### 2.7. Steroid Determinations in Culture Media, Serum and Tumour Homogenates

For tumour homogenates, a total of 0.5 gr of tumour collected at necropsy was homogenised in phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2), and centrifugated at 1200× g, for 20 min at 4 °C. Supernatants were collected, aliquoted individually and frozen at −80 °C until hormones were assayed. Blood samples were centrifugated at 1200× g and 4 °C for 20 min, and the serum was separated and stored frozen at −20 °C until assayed.

The hormones evaluated and antibodies used are summarised in Table 1. The assayed steroid hormones were progesterone (P4), dehydroepiandrosterone (DHEA), androstenedione (A4), testosterone (T), dihydrotestosterone (DHT), oestrone sulphate (E1SO4) and 17beta-oestradiol (E2). Moreover, the angiogenic factors determined were VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D and IL-8. Steroid hormone determinations (P4, A4, T, E1SO4 and E2) in tumour homogenates were assayed by previously validated competitive enzyme-immunoassay (EIA) [51], whereas these determinations in culture media and serum samples were assayed by a competitive amplified EIA previously validated in our laboratory [43]. Briefly, 96-well flat-bottom medium binding polystyrene microplates (Biohit, Finland) were coated overnight at 4° C with the appropriate purified antibody dilutions. Afterwards, plates were washed, and conjugate working solutions (CWS) were prepared. For competitive EIA, standards and tumour homogenate samples were diluted in CWS, analysed in duplicate and incubated at room temperature for 2 h to achieve a competitive reaction. For amplified EIA, standards as well as culture and serum samples were added in duplicate to the plate and incubated overnight at 4° C. After that, CWS was added to each well and incubated for 4 more hours at room temperature. For both EIAs, after conjugate incubation plates were washed, and to evaluate the amount of labelled steroid hormones, Enhance K-Blue TMB substrate (Neogen, Lexington, KY, USA) was added to each well and incubated for an additional 15 min at room temperature. Finally, the colorimetric reaction was stopped

by the addition of 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to each well. Absorbance was read at 450 nm using a 96-well SpectraMax 190UV/Vis automatic plate reader. Hormone concentrations were calculated by means of software developed for this technique (ELISA AID, Eurogenetics, Belgium). A standard dose–response curve was constructed by plotting the binding percent (B/B<sub>0</sub> × 100) against each steroid hormone standard concentrations. The validation technique parameters: percentage of cross-reactivity of polyclonal antibodies against related steroids, recovery rates, sensitivity, intra- and interassay coefficients of variation and parallelism were assayed as previously reported by Illera et al. [43]. P4, A4, T, E1SO4 and E2 antibodies with specificity against human and canine steroids were developed by the Department of Animal Physiology, Veterinary Medicine School, Complutense University of Madrid (UCM), Spain. On the other hand, DHT, DHEA, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D and IL-8 determinations were performed using a commercially available EIA kit with confirmed cross reactivity to canine and human steroids and proteins, according to the manufacturer’s recommendations (Table 1).

All hormone concentrations were expressed in ng/g for tumour homogenates, and ng/mL in the case of serum samples and culture media, except for DHT culture media hormone concentrations, which were expressed in pg/mL.

**Table 1.** Evaluated hormones and antibodies used for EIA determinations.

Primary Antibody	Abbreviation	Reference
Progesterone	P4	C6E91
Androstenedione	A4	C9111
Oestrone sulphate	E1SO4	R522-2
Testosterone	T	R156
17β-oestradiol	E2	C6E91
Dehydroepiandrosterone	DHEA	DEH3344
Dihydrotestosterone	DHT	DE2330
Vascular endothelial growth factor A	VEGF-A	RAB0107-1KT
Vascular endothelial growth factor C	VEGF-C	RAB0313-1KT
Vascular endothelial growth factor D	VEGF-D	RAB0390-1KT
Interleukin-8	IL-8/CXCL8	RAB0319-1KT

## 2.8. Statistics

The Kolmogorov–Smirnov test was used to assess the goodness-of-fit distribution of the hormonal data, growth factors and foci of metastasis. Since hormones and growth factor data were noted to be non-parametric, the Kruskal–Wallis test was used to compare data. For comparison between control and treatment group results of both cell lines, we used a non-parametric test Wilcoxon’s rank sum test with SAS 9.4. Data are shown as the mean ± standard error (SE). For tumour growth, differences between the experimental group means were analysed by one-way analysis of variance (ANOVA). Foci of metastasis among control and treated groups were compared through an Unpaired Student’s *t*-test when the distribution of data was normal, and by the Mann–Whitney U test when the distribution was non-parametric. In all statistical comparisons, *p* values < 0.05 were considered statistically significant.

## 3. Results

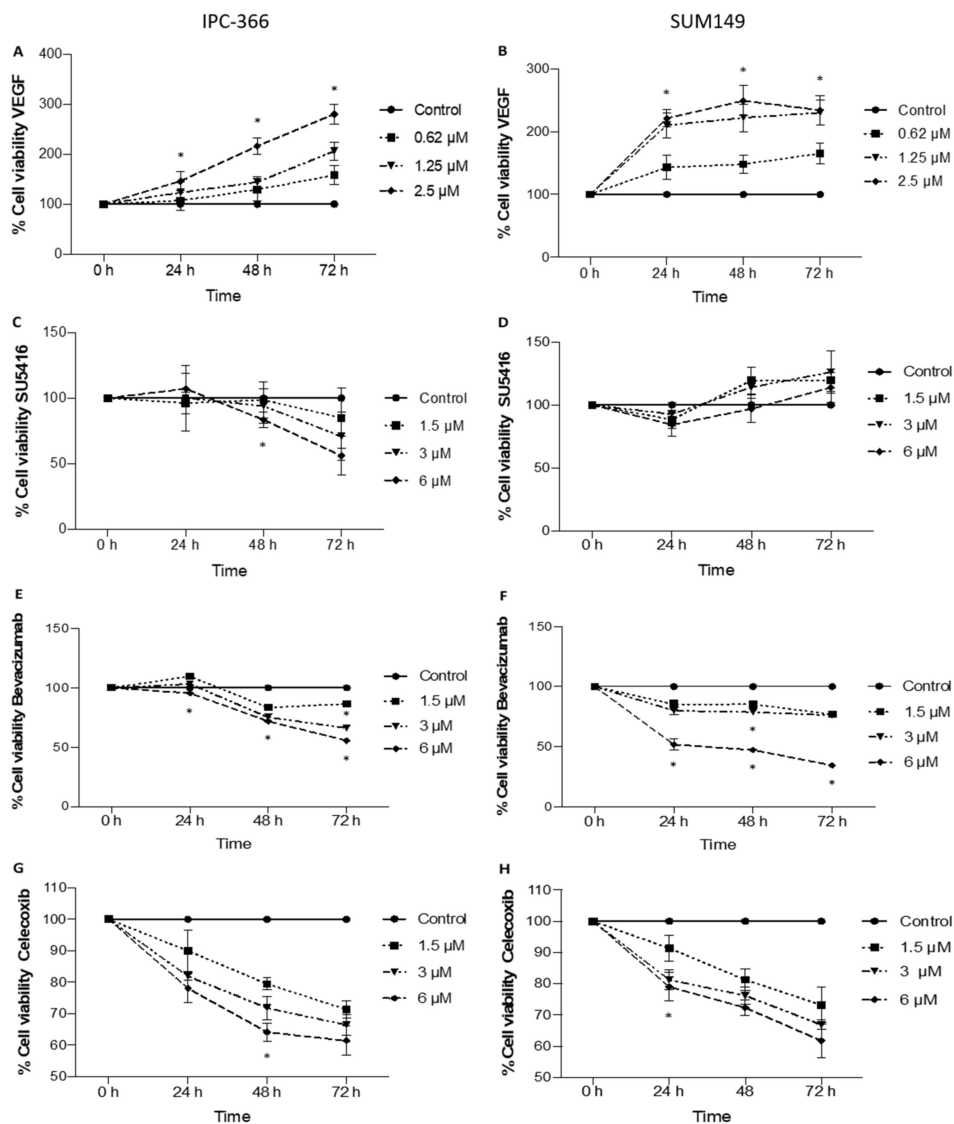
### 3.1. Anti-Proliferative Effect on In Vitro Cell Viability with the Addition of Anti-Angiogenic Treatments

The effects of the addition of the antiangiogenic treatments into the culture medium, demonstrated that VEGF and SU5416 promote increased cell viability; however, celecoxib and bevacizumab decrease it.

Specifically, the addition of VEGF to the culture medium of IPC-366 and SUM149 significantly augmented (*p* < 0.05) cell viability in all studied dosages, increasing with the dose and time post-treatment in IPC-366; however, in SUM149, after 24 h, cell viability was maintained (Figure 1A,B).

On the other hand, as in IPC-366 cells there was a reduction in the viability percentage in all studied dosages after SU5416 addition; in SUM-149, the percentage of viable cells

increased, although these differences were not statistically significant (Figure 1C,D). Regarding bevacizumab and celecoxib results in both cell lines, the percentage of viability diminished in all studied dosages, with the most reduction observed for the highest dose (Figure 1E–H).

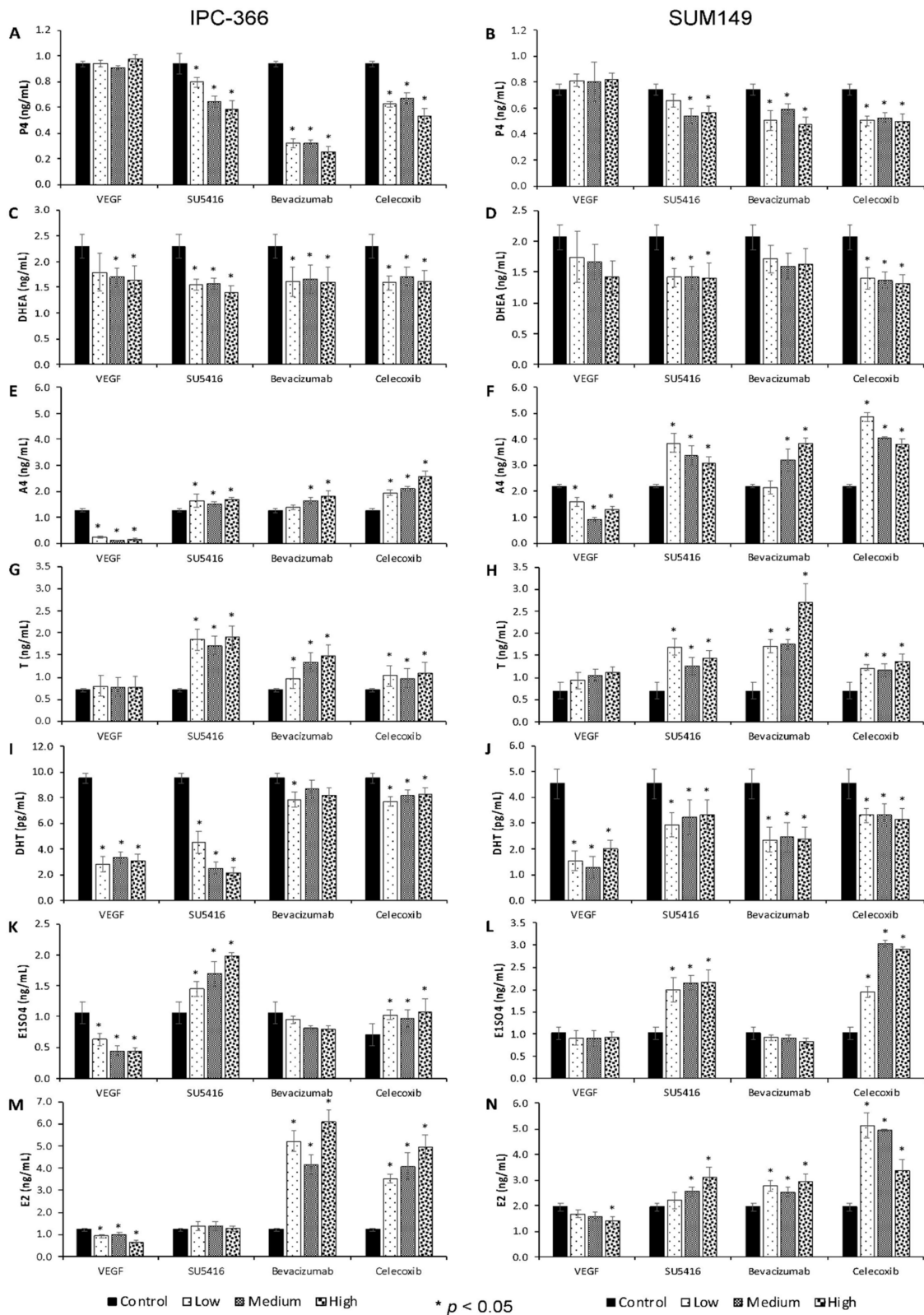


**Figure 1.** In vitro VEGF (0.62, 1.25, 2.5 μM), SU5416, bevacizumab and celecoxib (1.5, 3, 6 μM) effects on cell viability after 24 h, 48 h and 72 h post-treatment in IPC-366 and SUM149 cell lines measured by MTS assay. Cell viability increases after VEGF addition in both cell lines (A,B). Cell viability decreased after SU5416 treatment in IPC-366 cells and increased in SUM149-treated cells (C,D). Decreased cell viability in IPC-366- and SUM149 treated cells after bevacizumab (E,F) and celecoxib (G,H) addition. Data are shown as means ± SEM. \* Significant differences between control and treated groups ( $p < 0.05$ ).

### 3.2. Anti-Angiogenic Treatments Alter In Vitro Steroid Hormone Secretion

The steroid hormone (P4, DHEA, A4, T, DHT, E1SO4 and E2) concentrations of IPC-366 and SUM149 were measured in the cultured media of treated and untreated cells (Figure 2; Table S1).

Similar secretion patterns were found among both cell lines. Results showed that the addition of antiangiogenic treatments (SU5416, bevacizumab and celecoxib) decreased P4 secreted levels with respect to the control group.

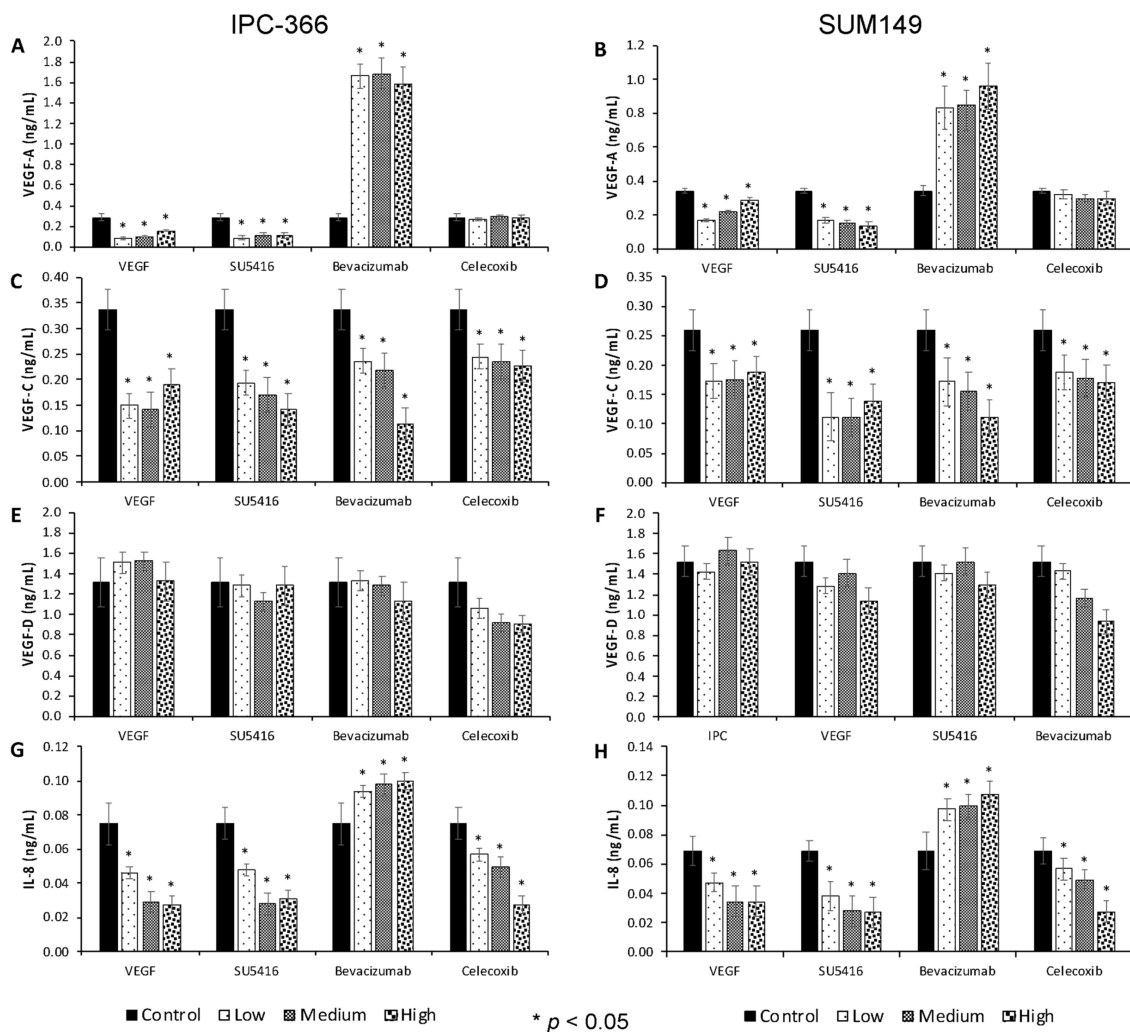


**Figure 2.** Sex steroid hormone concentrations in culture media of control and treated IPC-366 and SUM-149 cells at 72 h after the addition of low, medium, and high concentrations of VEGF (0.62 uM, 1.25 uM and 2.5 uM); SU5416, bevacizumab and celecoxib (1.5 uM, 3 uM and 6 uM). (A,B) Progesterone (P4). (C,D) Dehydroepiandrosterone (DHEA). (E,F) Androstenedione (A4). (G,H) Testosterone (T). (I,J) Dihydrotestosterone (DHT). (K,L) Estrone sulphate (E1SO4). (M,N) Estradiol (E2). Bar represents means  $\pm$  SEM. \* Significant differences between control and treatment groups ( $p < 0.05$ ).

Regarding the steroid precursors (DHEA and A4) and androgens (T and DHT), the results demonstrated that DHEA and DHT levels were significantly decreased ( $p < 0.05$ ) in all treatments in both cell lines. With regard to A4 and T concentrations, a significant increase ( $p < 0.05$ ) was found after SU5416, bevacizumab and celecoxib treatments; meanwhile, VEGF addition provoked a decrease in only A4 levels.

On the other hand, the levels of both steroid oestrogens, E1SO4 and E2, were significantly augmented ( $p < 0.05$ ) in SU5416 and celecoxib; however, after bevacizumab and celecoxib addition, only E2 concentrations were significantly increased ( $p < 0.05$ ).

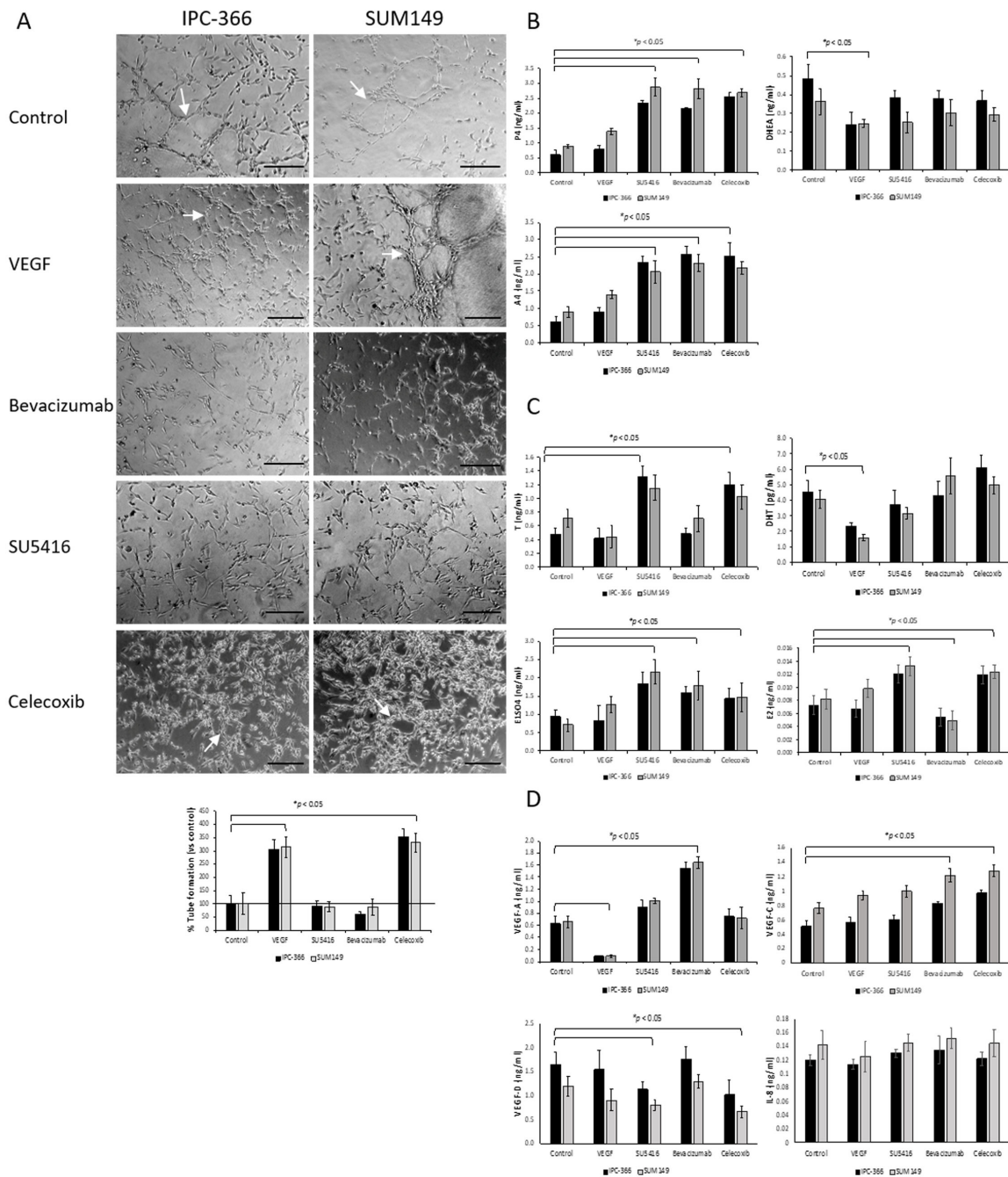
The addition of the antiangiogenic treatments and VEGF also altered the secretion of the angiogenic growth factors and IL-8 (Figure 3, Table S1). Specifically, our results showed a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in VEGF-A levels in cells treated with VEGF and SU5416; however, these concentrations were significantly augmented ( $p < 0.05$ ) in cells treated with bevacizumab. With regard to VEGF-C, the concentrations were decreased in all treatments. On the other hand, while the addition of VEGF, SU5416 and bevacizumab did not exert any effect on VEGF-D levels, these levels were significantly decreased ( $p < 0.05$ ) with celecoxib. Finally, IL-8 levels were decreased ( $p < 0.05$ ) in VEGF, SU5416 and celecoxib-treated cells, whereas with bevacizumab, the concentrations significantly increased ( $p < 0.05$ ).



**Figure 3.** Angiogenic growth factors and interleukin IL-8 concentrations in culture media of control and treated IPC-366 and SUM-149 cells at 72 h after the addition of low, medium and high concentrations of VEGF (0.62  $\mu$ M; 1.25  $\mu$ M and 2.5  $\mu$ M); SU5416, bevacizumab and celecoxib (1.5  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, and 6  $\mu$ M). (A,B) Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A). (C,D) Vascular endothelial growth factor C (VEGF-C). (E,F) Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D). (G,H) Interleukin-8 (IL-8). Bar represents means  $\pm$  SEM. \* Significant differences between control and treatment groups ( $p < 0.05$ ).

### 3.3. Effect of Anti-Angiogenic Compounds and VEGF in Tube Formation

To further characterize the role of the different antiangiogenic treatments, we focused on another phenotypic characteristic of angiogenesis in vitro, namely, the formation of vascular-like structures by neoplastic cells by conducting a tube formation assay. As shown in Figure 4, VEGF and celecoxib significantly increased ( $p < 0.05$ ) the number of tubular-like structures with respect to the control group. However, treatment with bevacizumab and SU5416 resulted in a slight decrease in tube formation.



**Figure 4.** Tube formation results. (A) Images  $\times 10$  of IPC-366 and SUM149 vascular-like structures (arrows) formed in control and treated groups treated with a final concentration of 1.5  $\mu\text{M}$  for VEGF, SU5416, bevacizumab and celecoxib. Bar graph represents percentage of number of tubes formed at 6 h respect to control group. (B) Steroid precursor (P4, DHEA, A4); (C) sexual steroids (T, DHT, E2, E1SO4) and (D) angiogenic growth factors (VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, IL-8) in culture media of IPC-366 (black) and SUM149 (grey) after tube formation assay. \* Denoted significant differences ( $p < 0.05$ ) between control and treated groups. Scale bar 200  $\mu\text{M}$ .

After the tube formation assay, steroid hormone concentrations (P4, DHEA, A4, T, DHT, E1SO4 and E2), angiogenic growth factors (VEGF-A, VEGF-C and VEGF-D) and IL-8 concentrations were also evaluated to determine the possible impact on the cell tube formation (Figure 4).

Steroid precursor P4 concentrations were significantly higher ( $p < 0.05$ ) in cells treated with SU5416, bevacizumab and celecoxib with respect to the control group. However, a significant reduction in DHEA and DHT secreted levels ( $p < 0.05$ ) was found after VEGF addition. Regarding A4 and T levels, results demonstrated significantly higher ( $p < 0.05$ ) concentrations in SU5416- and celecoxib-treated cells with respect to the control group. Oestrogen levels (E1SO4 and E2) were significantly increased ( $p < 0.05$ ) after SU5416 and celecoxib; however, after bevacizumab addition, E1SO4 levels increased and E2 levels decreased.

Regarding angiogenic growth factors and IL-8 secretion, the results revealed that VEGF significantly diminished ( $p < 0.05$ ) VEGF-A concentrations. However, these VEGF-A levels were significantly higher ( $p < 0.05$ ) after bevacizumab addition. Moreover, VEGF-C secreted concentrations were significantly augmented ( $p < 0.05$ ) after bevacizumab and celecoxib; meanwhile, VEGF-D levels diminished ( $p < 0.05$ ) after SU5416 and celecoxib treatment.

#### 3.4. VEGF, SU5416, Bevacizumab and Celecoxib Effects on Tumour Progression and Metastasis

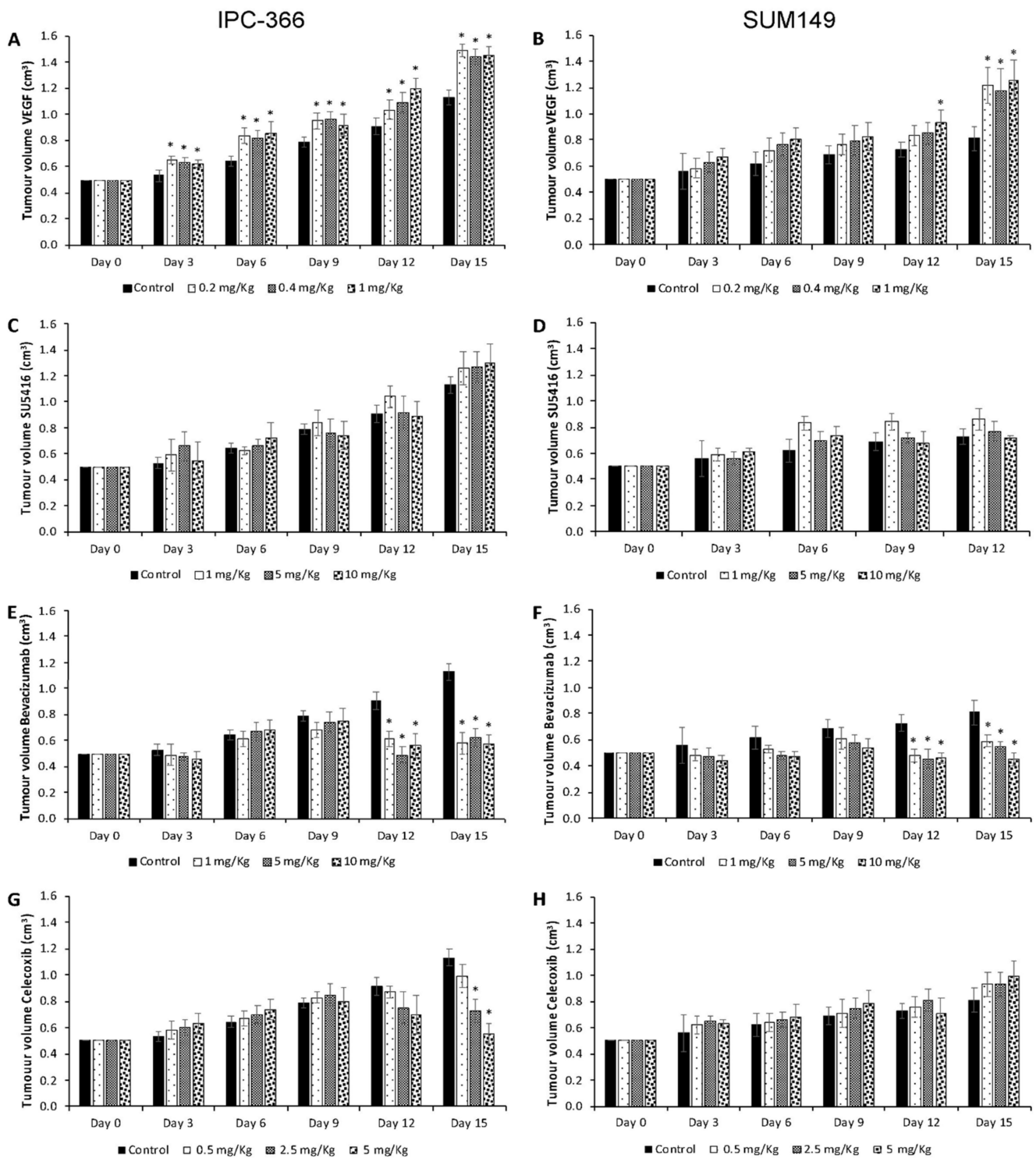
Figure 5 and Supplementary Figures S1 and S2 represent the effect of the different treatments on tumour growth in xenotransplanted mice with IPC-366 and SUM149 (Figure 6).

Comparing the effects of the different antiangiogenic therapies and VEGF in xenotransplanted mice, our results revealed that bevacizumab was the only treatment that significantly decreased ( $p < 0.05$ ) tumour growth in IPC-366 and SUM149 xenografts. On the contrary, VEGF administration significantly increased ( $p < 0.05$ ) tumour growth in both cell line-xenografted mice.

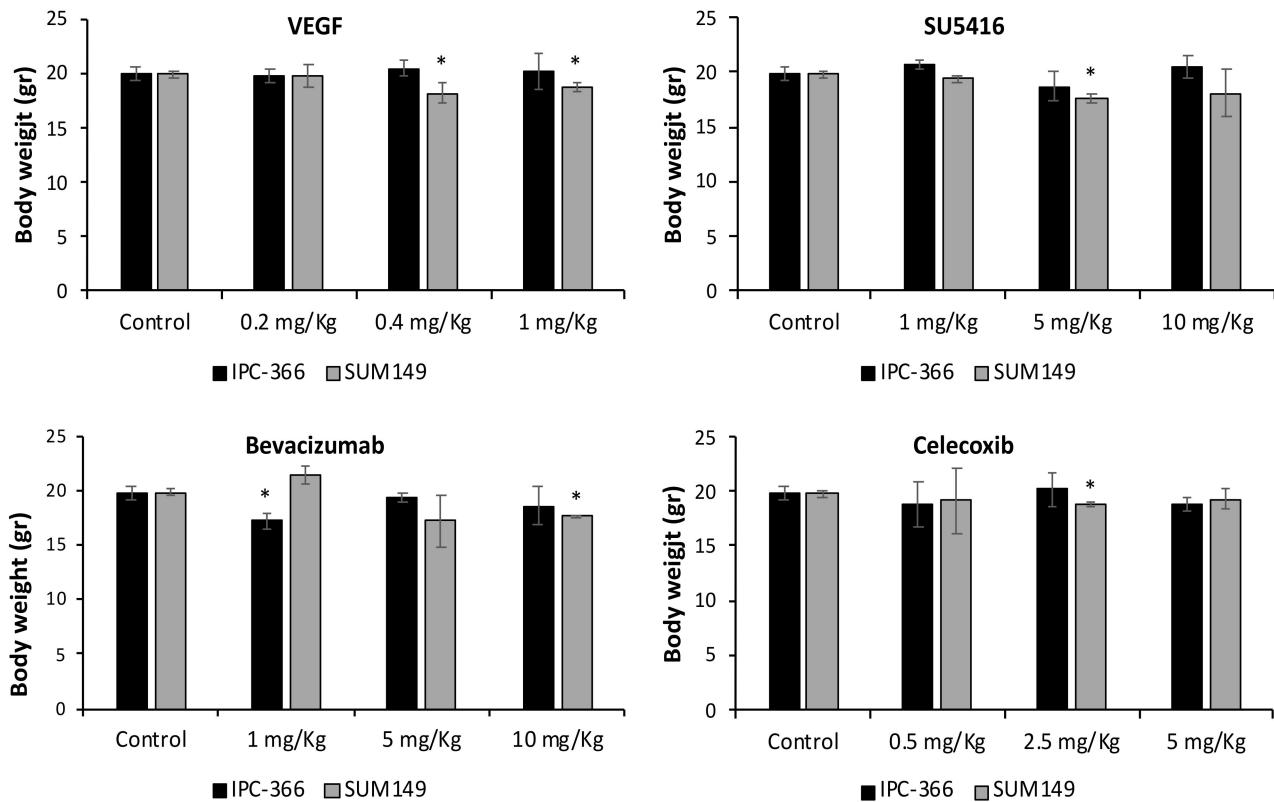
No significant differences were found after SU5416 and celecoxib treatment with respect to the control group, except in IPC-366 xenotransplanted mice treated with medium and high dosages of celecoxib, in which tumour progression decreased significantly ( $p < 0.05$ ) from day 12.

Regarding metastasis (Table 2, Figure 7), VEGF augmented the number of metastatic foci in the lungs and liver with respect to the control group in both xenotransplanted mice; these differences were only statistically significant for the high dosage.

After SU5416 inoculation, the number of metastatic foci found in lungs and liver was slightly lower for IPC-366-xenotransplanted mice but slightly higher in the case of SUM149 mice compared to the control group. Regarding bevacizumab and celecoxib, the number of metastatic foci in both organs was decreased for both treatments. Specifically, no pulmonary and hepatic metastatic foci were found for the high dosage of bevacizumab in IPC-366 xenotransplanted and medium and high dosages in SUM149 mice (Table 2). In the case of celecoxib, no hepatic foci of metastasis were found for medium and high dosages in IPC-366 mice and for any of the dosages in the case of SUM149-xenotransplanted mice.



**Figure 5.** In vivo effect of VEGF, SU5416, bevacizumab and celecoxib on tumour growth in xenotransplanted mice of (A,C,E,G) IPC-366 and (B,D,F,H) SUM149. Bar represents means  $\pm$  SEM. \* Significant differences between control and treatment groups ( $p < 0.05$ ).

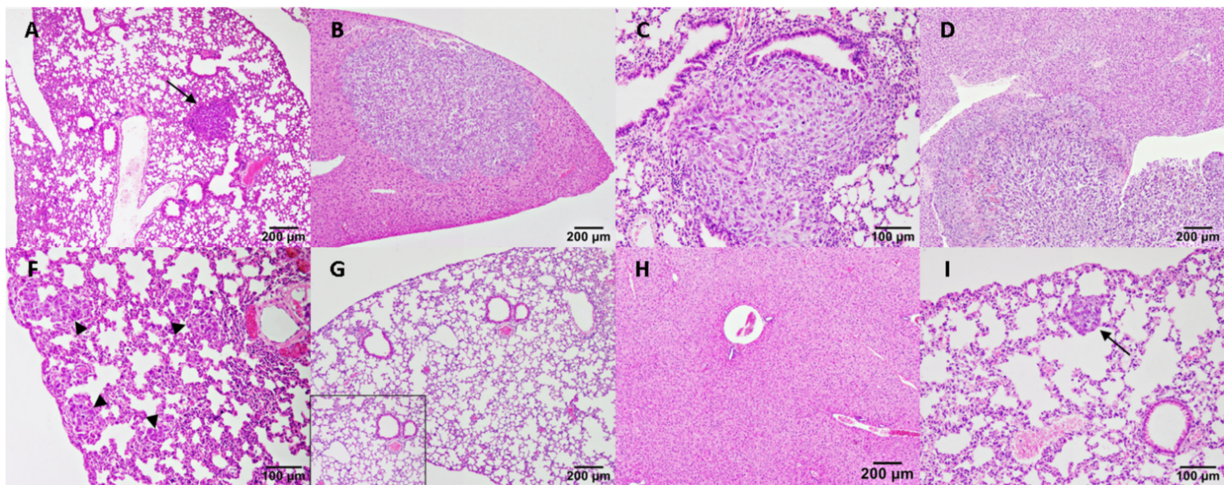


**Figure 6.** Body weight from xenotransplanted mice. Bar represents means  $\pm$  SEM. \* Significant differences between control and treatment groups ( $p < 0.05$ ).

**Table 2.** Foci of pulmonary and hepatic metastasis in control and experimental groups of IPC-366 and SUM149.

Treatments	Dosage <sup>a</sup>	IPC-366		SUM149	
		Foci of Pulmonary Metastasis (Mean $\pm$ SD)	Foci of Hepatic Metastasis (Mean $\pm$ SD)	Foci of Pulmonary Metastasis (Mean $\pm$ SD)	Foci of Hepatic Metastasis (Mean $\pm$ SD)
Control		13.20 $\pm$ 2.17	0.90 $\pm$ 0.60	10.40 $\pm$ 1.77	0.40 $\pm$ 0.19
VEGF	0.2 mg/kg	13.40 $\pm$ 3.05	0.40 $\pm$ 0.15	16.40 $\pm$ 2.07	0.60 $\pm$ 0.29
	0.4 mg/kg	14.20 $\pm$ 1.92	0.60 $\pm$ 0.89	16.60 $\pm$ 2.30	2.20 $\pm$ 1.10 *
	1 mg/kg	25.00 $\pm$ 4.85 *	3.40 $\pm$ 1.19	50.60 $\pm$ 6.95 *	4.33 $\pm$ 1.06 *
SU5416	1 mg/kg	11.80 $\pm$ 1.48	0.40 $\pm$ 0.15	13.00 $\pm$ 5.00	1.00 $\pm$ 0.35
	5 mg/kg	10.20 $\pm$ 3.96	0.40 $\pm$ 0.15	13.00 $\pm$ 2.83	0.40 $\pm$ 0.15
	10 mg/kg	10.40 $\pm$ 2.30	0.20 $\pm$ 0.10	12.40 $\pm$ 2.70	0.00 $\pm$ 0.00 *
Bevacizumab	1 mg/kg	6.80 $\pm$ 3.79 *	0.40 $\pm$ 0.15	7.40 $\pm$ 2.58	0.00 $\pm$ 0.00 *
	5 mg/kg	1.20 $\pm$ 2.17 *	1.00 $\pm$ 0.41	0.00 $\pm$ 0.00 *	0.00 $\pm$ 0.00 *
	10 mg/kg	0.00 $\pm$ 0.00 *	0.00 $\pm$ 0.00 *	0.00 $\pm$ 0.00 *	0.00 $\pm$ 0.00 *
Celecoxib	0.5 mg/kg	10.40 $\pm$ 2.88	0.40 $\pm$ 0.15	6.80 $\pm$ 1.82	0.00 $\pm$ 0.00 *
	2.5 mg/kg	7.00 $\pm$ 2.21	0.00 $\pm$ 0.00 *	7.40 $\pm$ 2.84	0.00 $\pm$ 0.00 *
	5 mg/kg	5.80 $\pm$ 3.10 *	0.00 $\pm$ 0.00 *	3.20 $\pm$ 1.44	0.00 $\pm$ 0.00 *

\* Denoted significant differences ( $p < 0.05$ ) between control and drug-treated groups. <sup>a</sup> Control and treated groups are composed of a total of 5 xenotransplanted mice per dosage.



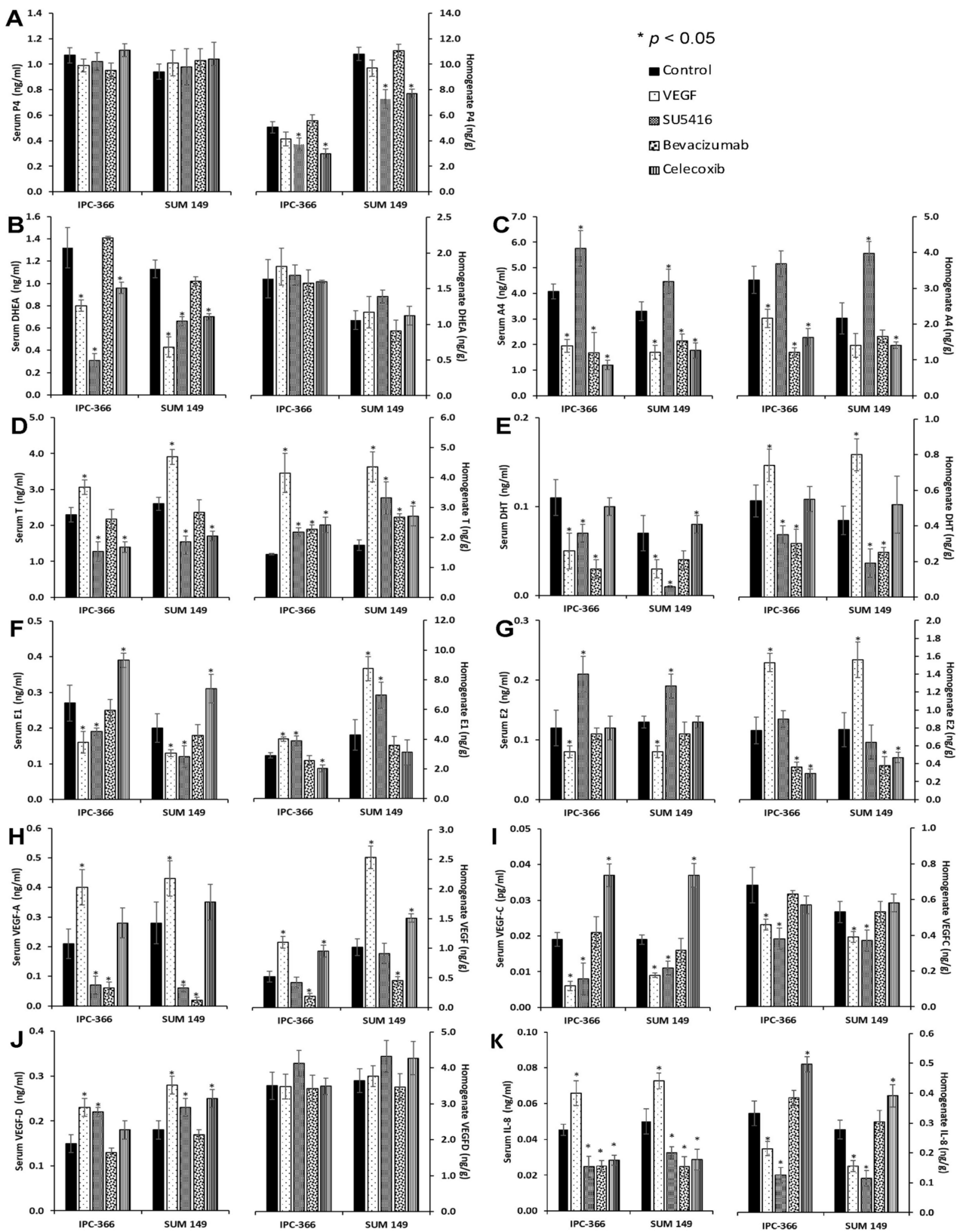
**Figure 7.** Metastatic foci in lungs and liver after VEGF, SU5416, bevacizumab and celecoxib treatment in IPC-366 and SUM149 xenotransplanted mice. (A) SUM149 control mice lung with metastatic focus. (B) IPC-336 control mice liver with large metastatic focus. (C,D). Foci of metastases in lung and liver after VEGF inoculation in IPC-366- (c) and SUM149- (d) xenotransplanted mice. (F) Multiple small foci of metastasis in the lung of SUM-149 mice treated with 5 mg/kg of SU5416. (G,H). Absence of metastatic foci after bevacizumab treatment in IPC-366 xenografted mice. (I) Small foci of metastasis after inoculation (0.5 mg/kg) of celecoxib.

### 3.5. Steroid Determinations in Tumour Homogenates and Serum Samples

The results from tumour homogenates and serum steroid concentrations of IPC-366 and SUM149 (Figure 8 and Table S2) revealed that both cell lines follow the same pattern.

Antiangiogenic treatments and VEGF inoculation did not alter P4 serum production. However, P4 tumour homogenate levels showed a significant decrease ( $p < 0.05$ ) when both mice xenografts were treated with SU5416 and celecoxib. Regarding precursor steroids (DHEA and A4), the results showed that only serum DHEA concentrations were decreased ( $p < 0.05$ ) after VEGF, SU5416 and celecoxib, whereas serum and tumour homogenate A4 concentrations significantly decreased ( $p < 0.05$ ) after VEGF, bevacizumab and celecoxib. Serum T levels significantly decreased ( $p < 0.05$ ) after SU5416 and celecoxib inoculation, but tumour homogenate concentrations were higher ( $p < 0.05$ ) after all treatments. Regarding DHT levels, SU5416 and bevacizumab significantly decreased ( $p < 0.05$ ) DHT serum and tumour homogenate concentrations. On the other hand, the results revealed that VEGF significantly diminished ( $p < 0.05$ ) oestrogen circulating levels (E1SO4 and E2) and augmented tumour production; however, only celecoxib and bevacizumab significantly reduced ( $p < 0.05$ ) E2 tumour homogenate concentrations.

Regarding VEGF-A levels, VEGF inoculation augmented ( $p < 0.05$ ) serum and tumour homogenate VEGF-A concentrations, but only bevacizumab significantly reduced ( $p < 0.05$ ) both serum and tumour levels. Moreover, the antiangiogenic treatments also altered VEGF-C and VEGF-D concentrations. Specifically, after celecoxib, both serum VEGF-C and VEGF-D levels were augmented ( $p < 0.05$ ); meanwhile, VEGF-D levels were increased after VEGF and SU5416 inoculation, VEGF-C decreased after both treatments, and no significant differences were found after bevacizumab. With regard to tumour homogenate VEGF-C and VEGF-D concentrations, only a significant decrease in VEGF-C concentrations ( $p < 0.05$ ) was found after VEGF and SU5416. Finally, serum IL-8 levels were significantly ( $p < 0.05$ ) decreased after SU5416, bevacizumab and celecoxib, whereas its tumour levels were diminished ( $p < 0.05$ ) after VEGF and SU5416 and significantly increased ( $p < 0.05$ ) after celecoxib.



**Figure 8.** In vivo tumour homogenate and serum sex steroid hormones, angiogenic growth factors and IL-8 concentrations in IPC-366- and SUM149 xenotransplanted mice after inoculation of the high dosage of VEGF (1 mg/kg), SU5416 (10 mg/kg), bevacizumab (10 mg/kg) and celecoxib treatment (5 mg/kg). Bar represents means  $\pm$  SEM. \* Significant differences between control and treatment groups ( $p < 0.05$ ). (A) Serum P4 levels were no altered but its intratumoral concentrations

decreased after SU5416 and celecoxib. (B) Serum DHEA levels decreased after VEGF, SU5416 and celecoxib and no changes in its intratumoral concentrations were found after all treatments. (C) Serum and intratumoral A4 levels decreased after VEGF, bevacizumab and celecoxib. (D) Serum T levels decreased after SU5416 and celecoxib, but tumour homogenate levels were higher after all treatments. (E) Both serum and intratumoral DHT levels decreased after SU5416 and bevacizumab. (F) VEGF and SU5416 inoculation diminished circulating E1SO4 levels but augmented its intratumoral concentrations. (G) Serum E2 levels decreased after VEGF but augmented after SU5416, however, tumour homogenate concentrations were higher after VEGF but decreased after bevacizumab and celecoxib (H) Circulating and intratumoral VEGF-A levels augmented after VEGF inoculation, but these concentrations decreased only after bevacizumab. (I) VEGF and SU5416 treatments decreased circulating VEGF-C levels and celecoxib augmented them, however, only VEGF and SU5416 decreased intratumoral concentrations. (J) Only serum VEGF-D levels were augmented after VEGF and SU5416 treatments. (K) Serum IL-8 levels decreased after the inoculation of SU5416, bevacizumab and celecoxib, whereas its tumour levels decreased after VEGF and SU5416 but augmented after celecoxib.

#### 4. Discussion

The biological rationale behind antiangiogenic therapy use in clinical trials is based on the theory that blocking new blood vessel formation in tumours will stop or slow their growth [52]. However, the lack of substantial benefits with current antiangiogenic therapies, in terms of increased overall survival in IBC patients, remains an ongoing challenge. This study aimed to determine the effects of different antiangiogenic therapies in cell proliferation, tumour progression and tube formation in IPC-366 and SUM149 cell lines to provide new insights into the biological mechanisms involved in angiogenesis in IBC.

It has been suggested that the combination of bevacizumab and neoadjuvant regimens may have a potential benefit in patients with IBC [53]. In the present study, *in vitro* results showed that bevacizumab and celecoxib suppressed cell proliferation in both cell lines, as previously reported for other breast cancer cell lines [54,55]. However, after the *in vivo* experiments, only bevacizumab reduced tumour growth by approximately 40%, in accordance with other studies [56,57]. Therefore, our results also support the idea that bevacizumab may be a good therapeutic strategy in combination with other therapies for patients with triple negative IBC.

It is clearly established that the action of sex steroid hormones (oestrogens and androgens) is crucial in the development and progression of breast cancers [58,59], and recent evidence suggests that they might be involved in the process of angiogenesis [21]. Given the importance of sex steroids and angiogenesis in the onset, progression and metastasis of this disease, the concentrations of different steroid hormones as well as angiogenic factors were also determined to improve the knowledge of their possible role in tumour angiogenesis.

The complex microenvironment of solid tumours implies that tumour cells receive signals from multiple sources, and, conversely, they also influence the function of neighbouring cells. Apart from these paracrine signalling mechanisms, tumour cells can also acquire a certain degree of self-sufficiency by elaborating autocrine signalling pathways that facilitate key functions of growth, invasion and survival [16].

In this study, *in vitro* secreted P4 concentrations decreased after the addition of antiangiogenic therapies, contrary to the effect of VEGF, which did not alter the secretion of this hormone. Some authors have postulated that P4 has a role in angiogenesis through the induction of VEGF [20,21,60]. Our results are in line with these previous reports, since the inhibition of VEGF by bevacizumab decreased P4 concentrations, denoting that the cells are using P4 to induce VEGF production to survive and proliferate. Moreover, our results revealed that VEGF does not promote P4 production since no significant changes in P4 secretion were observed after the addition of VEGF to cells, supporting the idea that P4 can be a determining factor for VEGF production and cell proliferation.

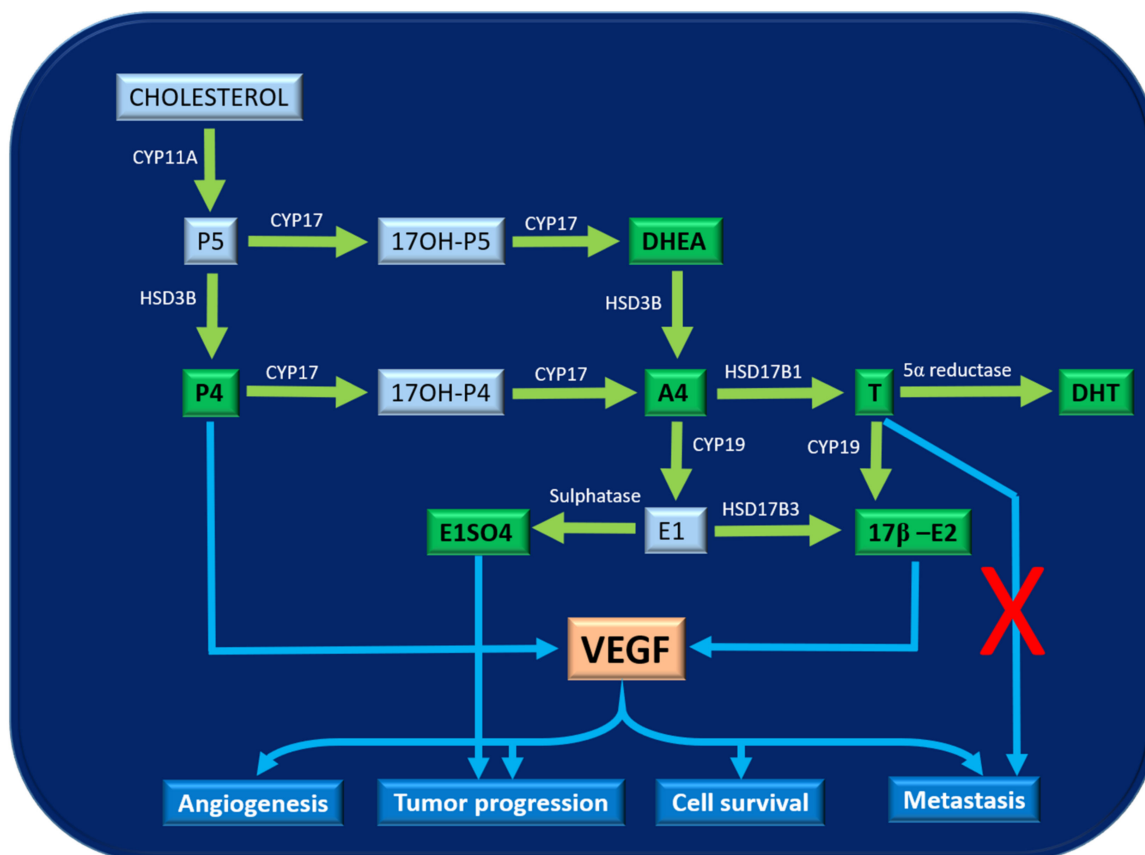
On the other hand, the high secretion of T and E2 observed in the treated cells compared to the control may lead to the conclusion that these treatments do not suppress aromatase activity [61], meaning that the cells can continue to synthesise oestrogens.

Although VEGF was originally described as a pro-angiogenic factor, there is evidence of additional functions. VEGF promotes cell survival by stimulating autocrine signalling in response to extracellular stimuli [62–64], and also contributes to tumour migration and progression towards gradients of chemoattractants [62]. In this study, IPC-366 and SUM149 cells showed reduced levels of secreted VEGF-A after the addition of VEGF. In contrast, these VEGF-A concentrations increased significantly after the addition of bevacizumab. These results suggest that in the presence of high extracellular levels of VEGF-A, tumour cells do not secrete autocrine VEGF-A, but instead use extracellular VEGF-A to proliferate and survive.

On the other hand, the increase in E2 and VEGF-A concentrations together after treatment with bevacizumab in both cell lines could correspond to the autocrine secretion of VEGF-A by E2-induced tumour cells [65], and to an extent, this VEGF-A could act as a survival factor for tumour cells to counteract the effect of bevacizumab. Therefore, therapies with bevacizumab as a single agent do not have satisfactory results [66].

Angiogenesis is also regulated by the local activity of a variety of other angiogenic factors, such as IL-8/CXCL8, a chemokine recognised as an angiogenic factor in several cancers and promoter of tumour growth, motility and metastasis [67,68]. Moreover, IL-8 controls the expression of VEGF in endothelial cells by promoting the activation of VEGF receptors in an autocrine manner [69]. In this study, secreted IL-8 concentrations after bevacizumab were augmented, so they might exert a possible influence on the secretion of VEGF-A.

Therefore, our results revealed that under in vitro conditions, VEGF secretion by neoplastic cells could be regulated by P4, E2 and IL-8 concentrations. (Figure 9).



**Figure 9.** Scheme of the steroidogenic cascade. Hormones within the green box are the ones measured in this study. It can be observed that P4 and E2 induce the production of VEGF which will promote the processes of angiogenesis, tumour progression, cell survival and metastasis. Likewise, elevated E1SO4 can also promote tumour progression itself. However, an increase in T could be related to a lower risk of metastasis.

The main purpose of the use of antiangiogenic therapies is to reduce angiogenesis and thus control the tumour progression and development of metastasis since cancer growth depends on the expansion of the host vasculature. There is evidence that cancer cells can promote the formation of tubes by endothelial cells [70], but it has also been observed that cancer cells themselves are capable of forming vascular-like structures in vitro [71]. Our study has demonstrated that IPC-366 and SUM149 are capable of forming these vascular-like structures in vitro, showing their aggressiveness. Moreover, it has shown that the antiangiogenic therapies studied did not completely inhibit the formation of these structures, demonstrating that angiogenesis processes could be regulated by other factors that should be considered.

The formation of vascular structures is known to be a complex system in which the members of the VEGF family, both ligands and receptors, are involved [17]. Nevertheless, our results suggest that, apart from these proangiogenic factors, steroid hormones are also involved in tube formation, as previously observed by other authors [72]. It has been shown that the addition of androgens increases the formation of vascular-like structures [73]. Our results support this hypothesis, since the concentrations of DHEA and DHT in the culture medium decreased following the addition of VEGF to neoplastic cells, which suggests that the cells consume these androgens to increase the formation of tubular-like structures. In accordance with this, when observing the effect of bevacizumab on the number of vascular-like structures and DHT and DHEA levels, no significant differences were found, denoting that DHEA and DHT are involved in the formation of vascular-like structures.

Contrary to previously reported results [54], the results presented here clearly showed that celecoxib treatment does not inhibit the formation of vascular-like structures in vitro, and they also differ morphologically from those found in the control group. Moreover, VEGF-C concentrations were also augmented, whereas VEGF-D concentrations were reduced. VEGF-C and VEGF-D are considered lymphangiogenic factors [74]. Accordingly, celecoxib could promote lymphangiogenic processes, not only through the induction of VEGF-C but also through VEGF-D synthesis.

Moreover, after treatment with SU5416, the secreted VEGF-D concentrations were significantly decreased. SU5416 was developed as a promising selective synthetic inhibitor of the VEGFR-2/Flk-1 [75]. As VEGF-D is a ligand not only for VEGFR-2/Flk-1 but also VEGFR-3/Flk-4 [76], our data suggest that VEGF-D is possibly bound to VEGFR-3/Flk-4 as VEGFR-2/Flk-1 is inhibited by SU5416 action.

The tumour microenvironment and its hormonal secretion plays a crucial role in tumour progression. It is known that steroid hormones, such oestrogens, are involved in tumour development and progression and regulate the expression of growth factors and its receptors in breast cancer [6,21]. However, many aspects regarding the role of androgens remain unclear.

On the one hand, high urinary levels of T have been associated with worse outcomes, and an increased rate of progression has been observed in postmenopausal patients with high circulating levels of T [77]. On the other hand, there is evidence that androgens also exert an antiproliferative and apoptotic effect in breast cancer [78,79], and recently, it has been postulated that high levels of T could be associated with a lower percentage of metastasis in male mice with IMC and IBC tumours [15].

In the present study, after bevacizumab and celecoxib treatment, as intratumoural T levels were increased, oestrogen concentrations were decreased. Moreover, tumour growth rates and metastasis were reduced after both treatments in xenotransplanted mice. In the case of VEGF treatment, not only androgens but also oestrogens were significantly augmented with respect to the control group, thus promoting cell proliferation, tumour growth and metastasis. Consistent with this, our data suggest that high intratumoural T concentrations in the setting of decreased oestrogens have a role in the prevention of metastasis after both treatments.

After SU5416 treatment, E1SO4 intratumoural concentrations and tumour growth and metastasis development were augmented, although E2 concentrations were decreased. It

has been postulated that E1SO4 could act as a reservoir of oestrogens for cells, and thus could promote tumour progression [80]. Moreover, some authors have associated the expression of E1SO4 with lymph node metastases and relapse free survival rate in breast cancer patients [81]. Accordingly, our data suggest that elevated E1SO4 concentrations after SU5416 treatment could promote tumour progression and the appearance of metastasis.

Although celecoxib has been reported as an antiangiogenic therapy as it inhibits prostaglandin-E2-dependent VEGF production [35], subsequently reducing microvessel density, tube formation and serum VEGF levels, several studies suggest that it may have contradictory effects on tumour responsiveness and angiogenesis [82,83]. Specifically, Ueno et al. found that VEGF levels were increased during celecoxib treatment in breast cancer patients [84]. Our findings are in line with this study, as tumour homogenate VEGF concentrations were higher after celecoxib treatment.

On the other hand, NSAIDs such as celecoxib have been reported to reduce the risk of developing cancer by suppressing the expression of inducible inflammatory cytokines, such as IL-8, by cancer cells [67]. However, the concentrations of tumour homogenate IL-8 after celecoxib were augmented in the present study. In several cancer forms, it has been demonstrated that VEGF and IL-8 are interconnected due to the upregulation of IL-8 by VEGF and vice versa [85,86]. Therefore, in view of the abovementioned findings, IL-8 could promote VEGF action, and thus, tumour progression could be encouraged.

Comparing the results of sex steroid hormone concentrations and vascular growth factors, after VEGF and bevacizumab treatments, both tumour homogenate E2 and VEGF levels appear to be positively associated, as both were significantly augmented in xenotransplanted mice treated with VEGF and significantly lower in those treated with bevacizumab. These results are in line with previous studies supporting the role of E2 as a potent regulator of VEGF in normal breast tissue [87,88] and breast cancer cell lines [89].

It has been suggested that serum hormone levels and growth factors reflect intratumoural concentrations [89]. In this study, intratumoural concentrations were higher than serum levels, which suggests that the hormones and factors are produced locally in the tissues where they act, and only a small proportion of them is released into the bloodstream.

Considering this information, the direct measurement of tumour regulators, such as VEGF and E2, locally in the tumour would be more accurate for determining the total amount of extracellular and bioactive proteins released by the tumour. Today, breast cancer is diagnosed by the histology of biopsies, mammography and gene expression levels. However, gene expression levels and intracellular protein levels are not always indicative of biological active extracellular proteins, so breast cancer patients can be over- or undertreated. Therefore, studies of the different tumour regulators and sex steroids in their bioactive compartment would substantially improve knowledge of the biological characteristics of the tumour and would provide a detailed hormone profile before treatments to predict the hormonal sensitivity of the tumour so that optimal individualised treatment could be achieved.

This study has limitations, since immunohistochemistry for angiogenesis and steroidogenic enzymes involved in these processes was not performed. While the reported changes in sex steroid and angiogenic factors provided a view of their effects on anti-angiogenic therapies, changes in the sex steroid enzymes, hormone receptors and COX-2 expression will provide a better understanding of the mechanisms involved in these treatments. Therefore, further studies are required to assess their expression.

## 5. Conclusions

This study provided evidence that steroid hormones could regulate angiogenic factors to promote tumour progression and angiogenesis. However, further studies are needed to elucidate the mechanisms by which steroid hormones could induce the production of angiogenic factors. On the other hand, considering that mammary cancer in dogs occurs spontaneously and shares clinical and pathophysiological characteristics with human

cancers, this study provides new insights for further investigations for the use of these treatments as adjuvant therapy in this species. The intratumoural measurement of steroid hormones and growth factors would improve the knowledge on the biological characteristics of the tumour with the aim to develop novel preventive and individualised therapeutic strategies, as well as provide follow-up biological information regarding the effectiveness of treatments.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers13153668/s1>, Table S1: Steroid (P4, DHEA, A4, T, DHT, E1SO4 and E2) concentrations, angiogenic growth factors (VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D) and IL-8 concentrations in culture media of IPC-366 and SUM149 cell lines treated with (a) VEGF, (b) SU5416, (c) bevacizumab and (d) celecoxib, Table S2: Steroid concentrations (P4, DHEA, A4, T, DHT, SO1E4 and E2), angiogenic growth factors (VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D) and IL-8 concentrations in tumour homogenate (H) and serum (S) in IPC-366- and SUM149 xenografted mice after (a) VEGF, (b) SU5416, (c) bevacizumab and (d) celecoxib treatments. Figure S1: In vivo effect of different dosages of VEGF, SU5416, bevacizumab and celecoxib on tumour growth in each individual IPC-366 xenotransplanted mice ( $n = 5$  mice per dosage of treatment). Figure S2: In vivo effect of different dosages of VEGF, SU5416, bevacizumab and celecoxib on tumour growth in each individual SUM149 xenotransplanted mice ( $n = 5$  mice per dosage of treatment).

**Author Contributions:** Conceptualization Á.A.-D., S.C. and J.C.I.; methodology Á.A.-D., S.C., B.C. and L.P.; animal experiments Á.A.-D. and S.C.; writing-original draft preparation, Á.A.-D.; writing-review and editing Á.A.-D., S.C. and J.C.I.; supervision S.C. and J.C.I. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was supported by Ministerio de Ciencias, Innovación y Universidades. Instituto de Salud Carlos III. (research project PI19/00149). The funding body did not contribute in any of the following: design of the study, data collection, data analysis, interpretation of data, or in writing the manuscript.

**Institutional Review Board Statement:** Animals were housed and bred at the animal Animal Facility (Department of Animal Physiology, Veterinary Medicine School, Complutense University of Madrid (UCM), Spain). Experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Complutense University of Madrid, Spain (number: Proex 31/15). All procedures were completed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and conformed to the relevant EU Directive.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data is contained within the article or supplementary material.

**Acknowledgments:** The authors thank Carmen García-Velasco for her technical and animal care.

**Conflicts of Interest:** The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship and/or publication of this article.

## References

1. Abul-Hajj, Y. Aromatization of androgens by human breast cancer. *Steroids* **1979**, *33*, 205–222. [[CrossRef](#)]
2. Blankenstein, M.; Van De Ven, J.; Maitimu-Smeele, L.; Donker, G.; De Jong, P.; Daroszewski, J.; Szymczak, J.; Milewicz, A.; Thijssen, J. Intratumoral levels of estrogens in breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1999**, *69*, 293–297. [[CrossRef](#)]
3. Peña, L.; Silván, G.; Pérez-Alenza, M.D.; Nieto, A.; Illera, J.C.; Peña, L.; Silván, G.; Pérez-Alenza, M.D.; Nieto, A.; Illera, J.C. Steroid hormone profile of canine inflammatory mammary carcinoma: A preliminary study. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2003**, *84*, 211–216. [[CrossRef](#)]
4. McNamara, K.M.; Sasano, H. The intracrinology of breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2015**, *145*, 172–178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Capper, C.P.; Rae, J.M.; Auchus, R.J.; Capper, C.P.; Rae, J.M.; Auchus, R.J. The Metabolism, Analysis, and Targeting of Steroid Hormones in Breast and Prostate Cancer. *Horm. Cancer* **2016**, *7*, 149–164. [[CrossRef](#)]
6. Yager, J.D.; Davidson, N.E. Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *354*, 270–282. [[CrossRef](#)]
7. Chang, M.-S. Dual roles of estrogen metabolism in mammary carcinogenesis. *BMB Rep.* **2011**, *44*, 423–434. [[CrossRef](#)]
8. Fuhrman, B.J.; Schairer, C.; Gail, M.H.; Boyd-Morin, J.; Xu, X.; Sue, L.Y.; Buys, S.S.; Isaacs, C.; Keefer, L.K.; Veenstra, T.D.; et al. Estrogen Metabolism and Risk of Breast Cancer in Postmenopausal Women. *J. Natl. Cancer Inst.* **2012**, *104*, 326–339. [[CrossRef](#)]

9. Falk, R.T.; A Brinton, L.; Dorgan, J.F.; Fuhrman, B.J.; Veenstra, T.D.; Xu, X.; Gierach, G.L. Relationship of serum estrogens and estrogen metabolites to postmenopausal breast cancer risk: A nested case-control study. *Breast Cancer Res.* **2013**, *15*, R34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Jerry, D.J.; Shull, J.D.; Hadsell, D.L.; Rijnkels, M.; Dunphy, K.A.; Schneider, S.S.; Vandenberg, L.N.; Majhi, P.D.; Byrne, C.; Trentham-Dietz, A. Genetic variation in sensitivity to estrogens and breast cancer risk. *Mamm. Genome* **2018**, *29*, 24–37. [[CrossRef](#)]
11. Brown, S.B.; E Hankinson, S. Endogenous estrogens and the risk of breast, endometrial, and ovarian cancers. *Steroids* **2015**, *99*, 8–10. [[CrossRef](#)]
12. Hilborn, E.; Stål, O.; Jansson, A. Estrogen and androgen-converting enzymes 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and their involvement in cancer: With a special focus on 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, 2, and breast cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 30552–30562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Baglietto, L.; Severi, G.; English, D.; Krishnan, K.; Hopper, J.L.; McLean, C.; Morris, H.A.; Tilley, W.; Giles, G. Circulating Steroid Hormone Levels and Risk of Breast Cancer for Postmenopausal Women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2010**, *19*, 492–502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Zeleniuch-Jacquotte, A.; Afanasyeva, Y.; Kaaks, R.; Rinaldi, S.; Scarmo, S.; Liu, M.; A Arslan, A.; Toniolo, P.; E Shore, R.; Koenig, K.L. Premenopausal serum androgens and breast cancer risk: A nested case-control study. *Breast Cancer Res.* **2012**, *14*, R32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Caceres, S.; Peña, L.; Silvan, G.; Illera, M.J.; Woodward, W.; Reuben, J.M.; Illera, J.C. Steroid Tumor Environment in Male and Female Mice Model of Canine and Human Inflammatory Breast Cancer. *BioMed Res. Int.* **2016**, *2016*, 8909878. [[CrossRef](#)]
16. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Madu, C.O.; Wang, S.; Madu, C.O.; Lu, Y. Angiogenesis in Breast Cancer Progression, Diagnosis, and Treatment. *J. Cancer* **2020**, *11*, 4474–4494. [[CrossRef](#)]
18. Goussia, A.; Simou, N.; Zagouri, F.; Manousou, K.; Lazaridis, G.; Gogas, H.; Koutras, A.; Sotiropoulou, M.; Pentheroudakis, G.; Bafaloukos, D.; et al. Associations of angiogenesis-related proteins with specific prognostic factors, breast cancer subtypes and survival outcome in early-stage breast cancer patients. A Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG) trial. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0200302. [[CrossRef](#)]
19. Ramjiawan, R.R.; Griffioen, A.W.; Duda, D.G. Anti-angiogenesis for cancer revisited: Is there a role for combinations with immunotherapy? *Angiogenesis* **2017**, *20*, 185–204. [[CrossRef](#)]
20. Hyder, S.M. Sex-steroid regulation of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* **2006**, *13*, 667–687. [[CrossRef](#)]
21. Botelho, M.C.; Soares, R.; Alves, H. Progesterone in Breast Cancer Angiogenesis. *SM J. Reprod. Heal. Infertil.* **2015**, *1*, 1001.
22. Petrovic, N. Targeting Angiogenesis in Cancer Treatments: Where do we Stand? *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2016**, *19*, 226–238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ranieri, G.; Patruno, R.; Ruggieri, E.; Montemurro, S.; Valerio, P.; Ribatti, D. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) as a Target of Bevacizumab in Cancer: From the Biology to the Clinic. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 1845–1857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Li, Q.; Yan, H.; Zhao, P.; Yang, Y.; Cao, B. Efficacy and Safety of Bevacizumab Combined with Chemotherapy for Managing Metastatic Breast Cancer: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 15746. [[CrossRef](#)]
25. Grailer, J.J.; Steeber, U.A. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Inhibitor SU5416 Suppresses Lymphocyte Generation and Immune Responses in Mice by Increasing Plasma Corticosterone. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e75390. [[CrossRef](#)]
26. Vajkoczy, P.; Menger, M.D.; Vollmar, B.; Schilling, L.; Schmiedek, P.; Hirth, K.P.; Ullrich, A.; Fong, T.T. Inhibition of Tumor Growth, Angiogenesis, and Microcirculation by the Novel Flk-1 Inhibitor SU5416 as Assessed by Intravital Multi-fluorescence Videomicroscopy. *Neoplasia* **1999**, *1*, 31–41. [[CrossRef](#)]
27. O'Donnell, A.; Padhani, A.; Hayes, C.; Kakkar, A.J.; Leach, M.; Trigo, J.M.; Scurr, M.; Raynaud, F.; Phillips, S.; Aherne, W.; et al. A Phase I study of the angiogenesis inhibitor SU5416 (semaxanib) in solid tumours, incorporating dynamic contrast MR pharmacodynamic end points. *Br. J. Cancer* **2005**, *93*, 876–883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. McCarthy, K.; Bustin, S.; Ogunkolade, B.; Khalaf, S.; Laban, C.; McVittie, C.; Carpenter, R.; Jenkins, P. Cyclo-oxygenase-2 (COX-2) mRNA expression and hormone receptor status in breast cancer. *Eur. J. Surg. Oncol. (EJSO)* **2006**, *32*, 707–709. [[CrossRef](#)]
29. Hamy, A.-S.; Tury, S.; Wang, X.; Gao, J.; Pierga, J.-Y.; Giacchetti, S.; Brain, E.; Pistilli, B.; Marty, M.; Espié, M.; et al. Celecoxib With Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer Might Worsen Outcomes Differentially by COX-2 Expression and ER Status: Exploratory Analysis of the REMAGUS02 Trial. *J. Clin. Oncol.* **2019**, *37*, 624–635. [[CrossRef](#)]
30. Harris, R.E. Cyclooxygenase-2 (cox-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung. *Inflammopharmacology* **2009**, *17*, 55–67. [[CrossRef](#)]
31. Stasinopoulos, I.; Shah, T.; Penet, M.-F.; Krishnamachary, B.; Bhujwala, Z.M. COX-2 in cancer: Gordian knot or Achilles heel? *Front. Pharmacol.* **2013**, *4*, 34. [[CrossRef](#)]
32. Vosooghi, M.; Amini, M. The discovery and development of cyclooxygenase-2 inhibitors as potential anticancer therapies. *Expert Opin. Drug Discov.* **2014**, *9*, 255–267. [[CrossRef](#)]
33. Suri, A.; Sheng, X.; Schuler, K.M.; Zhong, Y.; Han, X.; Jones, H.M.; Gehrig, P.A.; Zhou, C.; Bae-Jump, V.L. The effect of celecoxib on tumor growth in ovarian cancer cells and a genetically engineered mouse model of serous ovarian cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 39582–39594. [[CrossRef](#)]

34. Wang, Q.; Wu, X. Primary and acquired resistance to PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment. *Int. Immunopharmacol.* **2017**, *46*, 210–219. [[CrossRef](#)]
35. Wang, X.; Semba, T.; Phi, L.T.H.; Chaititkun, S.; Iwase, T.; Lim, B.; Ueno, N.T. Targeting Signaling Pathways in Inflammatory Breast Cancer. *Cancers* **2020**, *12*, 2479. [[CrossRef](#)]
36. Li, J.; Hao, Q.; Cao, W.; Vadgama, J.V.; Wu, Y. Celecoxib in breast cancer prevention and therapy. *Cancer Manag. Res.* **2018**, *10*, 4653–4667. [[CrossRef](#)]
37. Yamauchi, H.; Ueno, N.T. Targeted therapy in inflammatory breast cancer. *Cancer* **2010**, *116*, 2758–2759. [[CrossRef](#)]
38. Van Der Auwera, I.; Van Laere, S.; Eynden, G.G.V.D.; Benoy, I.; Van Dam, P.; Colpaert, C.G.; Fox, S.; Turley, H.; Harris, A.; Van Marck, E.A.; et al. Increased Angiogenesis and Lymphangiogenesis in Inflammatory versus Noninflammatory Breast Cancer by Real-Time Reverse Transcriptase-PCR Gene Expression Quantification. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 7965–7971. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Arias-Pulido, H.; Chaher, N.; Gong, Y.; Qualls, C.; Vargas, J.; Royce, M. Tumor stromal vascular endothelial growth factor A is predictive of poor outcome in inflammatory breast cancer. *BMC Cancer* **2012**, *12*, 298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Clemente, M.; Pérez-Alenza, M.D.; Illera, J.C.; Peña, L. Histological, Immunohistological, and Ultrastructural Description of Vasculogenic Mimicry in Canine Mammary Cancer. *Veter. Pathol.* **2009**, *47*, 265–274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Clemente, M.; Pérez-Alenza, M.; Pena, L. Metastasis of Canine Inflammatory versus Non-Inflammatory Mammary Tumours. *J. Comp. Pathol.* **2010**, *143*, 157–163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Caceres, S.; Peña, L.; De Andres, P.J.; Illera, M.J.; Lopez, M.S.; Woodward, W.; Reuben, J.M.; Illera, J.C. Establishment and Characterization of a New Cell Line of Canine Inflammatory Mammary Cancer: IPC-366. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0122277. [[CrossRef](#)]
43. Illera, J.C.; Caceres, S.; Peña, L.; De Andres, P.J.; Monsalve, B.; Illera, M.J.; Woodward, W.; Reuben, J.M.; Silvan, G. Steroid hormone secretion in inflammatory breast cancer cell lines. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **2015**, *24*, 137–145. [[CrossRef](#)]
44. Millanta, F.; Caneschi, V.; Ressel, L.; Citi, S.; Poli, A. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Canine Inflammatory and Non-inflammatory Mammary Carcinoma. *J. Comp. Pathol.* **2010**, *142*, 36–42. [[CrossRef](#)]
45. Guo, S.; Lok, J.; Liu, Y.; Hayakawa, K.; Leung, W.; Xing, C.; Ji, X.; Lo, E.H. Assays to Examine Endothelial Cell Migration, Tube Formation, and Gene Expression Profiles. *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1135*, 393–402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Kaneko, M.; Kaneko, S.; Suzuki, K. Prolonged low-dose administration of the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib enhances the antitumor activity of irinotecan against neuroblastoma xenografts. *Cancer Sci.* **2009**, *100*, 2193–2201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Adamcic, U.; Skowronski, K.; Peters, C.; Morrison, J.; Coomber, B.L. The Effect of Bevacizumab on Human Malignant Melanoma Cells with Functional VEGF/VEGFR2 Autocrine and Intracrine Signaling Loops. *Neoplasia* **2012**, *14*, 612–623. [[CrossRef](#)]
48. Wang, J.; Fu, X.; Jiang, C.; Yu, L.; Wang, M.; Han, W.; Liu, L.; Wang, J. Bone marrow mononuclear cell transplantation promotes therapeutic angiogenesis via upregulation of the VEGF-VEGFR2 signaling pathway in a rat model of vascular dementia. *Behav. Brain Res.* **2014**, *265*, 171–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Zhao, Z.-X.; Li, X.; Liu, W.-D.; Liu, X.-Z.; Wu, S.-J.; Hu, X.-H. Inhibition of Growth and Metastasis of Tumor in Nude Mice after Intraperitoneal Injection of Bevacizumab. *Orthop. Surg.* **2016**, *8*, 234–240. [[CrossRef](#)]
50. Hather, G.; Liu, R.; Bandi, S.; Mettetal, J.; Manfredi, M.; Shyu, W.-C.; Donelan, J.; Chakravarty, A. Growth Rate Analysis and Efficient Experimental Design for Tumor Xenograft Studies. *Cancer Inform.* **2014**, *13s4*, 65–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Queiroga, F.; Pérez-Alenza, M.; Silvan, G.; Peña, L.; Lopes, C.; Illera, J. Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2005**, *94*, 181–187. [[CrossRef](#)]
52. Ebos, J.M.L.; Kerbel, R.S. Antiangiogenic therapy: Impact on invasion, disease progression, and metastasis. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2011**, *8*, 210–221. [[CrossRef](#)]
53. Palazzo, A.; Dellapasqua, S.; Munzone, E.; Bagnardi, V.; Mazza, M.; Canello, G.; Ghisini, R.; Iorfida, M.; Montagna, E.; Goldhirsch, A.; et al. Phase II Trial of Bevacizumab Plus Weekly Paclitaxel, Carboplatin, and Metronomic Cyclophosphamide With or Without Trastuzumab and Endocrine Therapy as Preoperative Treatment of Inflammatory Breast Cancer. *Clin. Breast Cancer* **2018**, *18*, 328–335. [[CrossRef](#)]
54. Basu, G.D.; Pathangey, L.B.; Tinder, T.L.; Gendler, S.J.; Mukherjee, P.; Basu, G.D.; Pathangey, L.B.; Tinder, T.L.; Gendler, S.J.; Mukherjee, P. Mechanisms underlying the growth inhibitory effects of the cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* **2005**, *7*, R422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Emlet, D.R.; Brown, K.A.; Kociban, D.L.; Pollice, A.A.; Smith, C.A.; Ong, B.B.L.; Shackney, S.E. Response to trastuzumab, erlotinib, and bevacizumab, alone and in combination, is correlated with the level of human epidermal growth factor receptor-2 expression in human breast cancer cell lines. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 2664–2674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Higgins, B.; Kolinsky, K.; Linn, M.; Adames, V.; Zhang, Y.E.; Moisa, C.; Dugan, U.; Heimbrook, D.; Packman, K. Antitumor activity of capecitabine and bevacizumab combination in a human estrogen receptor-negative breast adenocarcinoma xeno-graft model. *Anticancer Res* **2007**, *27*, 2279–2287. [[PubMed](#)]
57. Gui, X.; Li, H.; Song, G.; Shao, B.; Jiang, H. Long term use of bevacizumab in the treatment of triple negative breast cancer with giant tumor in chest wall. *Medicine* **2018**, *97*, e13410. [[CrossRef](#)]
58. Duggan, C.; Stanczyk, F.; Campbell, K.; Neuhaus, M.L.; Baumgartner, R.N.; Baumgartner, K.B.; Bernstein, L.; Ballard, R.; McTiernan, A. Associations of sex steroid hormones with mortality in women with breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2016**, *155*, 559–567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

59. Kensler, K.H.; Eliassen, A.H.; Rosner, B.A.; Hankinson, S.E.; Brown, M.; Tamimi, R.M. Pre-diagnostic sex hormone levels and survival among breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **2019**, *174*, 749–758. [[CrossRef](#)]
60. Wu, J.; Richer, J.; Horwitz, K.B.; Hyder, S.M. Progesterin-Dependent Induction of Vascular Endothelial Growth Factor in Human Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 2238–2244. [[CrossRef](#)]
61. Banerjee, S.; Zvelebil, M.; Furet, P.; Mueller-Vieira, U.; Evans, D.B.; Dowsett, M.; Martin, L.-A. The Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Inhibitor PTK787/ZK222584 Inhibits Aromatase. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 4716–4723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. E Bachelder, R.; Crago, A.; Chung, J.; A Wendt, M.; Shaw, L.M.; Robinson, G.; Mercurio, A.M. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 5736–5740.
63. Harmey, J.H.; Bouchier-Hayes, D. Vascular endothelial growth factor (VEGF), a survival factor for tumour cells: Implications for anti-angiogenic therapy. *BioEssays* **2002**, *24*, 280–283. [[CrossRef](#)]
64. Bates, R.C.; Goldsmith, J.D.; Bachelder, R.E.; Brown, C.; Shibuya, M.; Oettgen, P.; Mercurio, A.M. Flt-1-Dependent Survival Characterizes the Epithelial-Mesenchymal Transition of Colonic Organoids. *Curr. Biol.* **2003**, *13*, 1721–1727. [[CrossRef](#)]
65. Zhang, L.; Xiong, W.; Xiong, Y.; Liu, H.; Liu, Y. 17  $\beta$ -Estradiol promotes vascular endothelial growth factor expression via the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway during the pathogenesis of endometriosis. *Mol. Hum. Reprod.* **2016**, *22*, 526–535. [[CrossRef](#)]
66. Sasich, L.D.; Sukkari, S.R. The US FDAs withdrawal of the breast cancer indication for Avastin (bevacizumab). *Saudi Pharm. J.* **2012**, *20*, 381–385. [[CrossRef](#)]
67. Chen, J.J.; Yao, P.-L.; Yuan, A.; Hong, T.-M.; Shun, C.-T.; Kuo, M.-L.; Lee, Y.-C.; Yang, P.-C. Up-regulation of tumor interleukin-8 expression by infiltrating macrophages: Its correlation with tumor angiogenesis and patient survival in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 729–737.
68. Al-Khalaf, H.H.; Al-Harbi, B.; Al-Sayed, A.; Arafah, M.; Tulbah, A.; Jarman, A.; Al-Mohanna, F.; Aboussekhra, A. Interleukin-8 Activates Breast Cancer-Associated Adipocytes and Promotes Their Angiogenesis- and Tumorigenesis-Promoting Effects. *Mol. Cell. Biol.* **2019**, *39*, e00332-18. [[CrossRef](#)]
69. Martin, D.; Galisteo, R.; Gutkind, J.S. CXCL8/IL8 Stimulates Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression and the Autocrine Activation of VEGFR2 in Endothelial Cells by Activating NF $\kappa$ B through the CBM (Carma3/Bcl10/Malt1) Complex. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 6038–6042. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Lee, H.; Kang, K.-T. Differential Angiogenic Responses of Human Endothelial Colony-Forming Cells to Different Molecular Subtypes of Breast Cancer Cells. *J. Lipid Atheroscler.* **2021**, *10*, 111–122. [[CrossRef](#)]
71. Iii, R.A.F.; Faibish, M.; Shao, R. A Matrigel-Based Tube Formation Assay to Assess the Vasculogenic Activity of Tumor Cells. *J. Vis. Exp.* **2011**, *55*, e3040. [[CrossRef](#)]
72. Lansink, M.; Koolwijk, P.; van Hinsbergh, V.; Kooistra, T. Effect of steroid hormones and retinoids on the formation of capillary-like tubular structures of human microvascular endothelial cells in fibrin matrices is related to urokinase expression. *Blood* **1998**, *92*, 927–938. [[CrossRef](#)]
73. Liu, P.; Li, X.; Song, F.; Li, P.; Wei, J.; Yan, Q.; Xu, X.; Yang, J.; Li, C.; Fu, X. Testosterone promotes tube formation of endothelial cells isolated from veins via activation of Smad1 protein. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2017**, *446*, 21–31. [[CrossRef](#)]
74. Stacker, S.A.; Achen, M.G. Emerging Roles for VEGF-D in Human Disease. *Biomolecules* **2018**, *8*, 1. [[CrossRef](#)]
75. Haddad, J.J. The immunopharmacologic potential of Semaxanib and new generation directed therapeutic drugs: Receptor tyrosine kinase regulation with anti-tumorigenesis/angiogenesis properties. *Saudi Pharm. J.* **2012**, *20*, 103–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Sullivan, L.A.; Brekken, R.A. The VEGF family in cancer and antibody-based strategies for their inhibition. *mAbs* **2010**, *2*, 165–175. [[CrossRef](#)]
77. Venturelli, E.; Orenti, A.; Fabricio, A.S.C.; Garrone, G.; Agresti, R.; Paolini, B.; Bonini, C.; Gion, M.; Berrino, F.; Desmedt, C.; et al. Observational study on the prognostic value of testosterone and adiposity in postmenopausal estrogen receptor positive breast cancer patients. *BMC Cancer* **2018**, *18*, 651. [[CrossRef](#)]
78. Somboonporn, W.; Davis, S.R. Testosterone Effects on the Breast: Implications for Testosterone Therapy for Women. *Endocr. Rev.* **2004**, *25*, 374–388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Von Schoultz, B. Androgens and the breast. *Matur.* **2007**, *57*, 47–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Caceres, S.; Monsalve, B.; Peña, L.; De Andres, P.J.; Alonso-Diez, A.; Illera, M.J.; Woodward, W.; Reuben, J.M.; Silvan, G.; Illera, J.C. In vitro and in vivo effect of flutamide on steroid hormone secretion in canine and human inflammatory breast cancer cell lines. *Veter. Comp. Oncol.* **2017**, *16*, 148–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Kristensen, V.N.; Børresen-Dale, A.L. Molecular epidemiology of breast cancer: Genetic variation in steroid hormone metabolism. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **2000**, *462*, 323–333. [[CrossRef](#)]
82. Eibl, G.; Takata, Y.; Boros, L.G.; Liu, J.; Okada, Y.; A Reber, H.; Hines, O.J. Growth stimulation of COX-2-negative pancreatic cancer by a selective COX-2 inhibitor. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 982–990. [[PubMed](#)]
83. Xu, K.; Gao, H.; Shu, H.-K.G. Celecoxib Can Induce Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Tumor Angiogenesis. *Mol. Cancer Ther.* **2011**, *10*, 138–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Ueno, T.; Chow, L.; Toi, M. Increases in circulating VEGF levels during COX-2 inhibitor treatment in breast cancer patients. *Biomed. Pharmacother.* **2006**, *60*, 277–279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

85. Li, M.; Zhang, Y.; Feurino, L.W.; Wang, H.; Fisher, W.E.; Brunicardi, F.C.; Chen, C.; Yao, Q. Interleukin-8 increases vascular endothelial growth factor and neuropilin expression and stimulates ERK activation in human pancreatic cancer. *Cancer Sci.* **2008**, *99*, 733–737. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Dore-Savard, L.; Lee, E.; Kakkad, S.; Popel, A.S.; Bhujwala, Z.M. The Angiogenic Secretome in VEGF overexpressing Breast Cancer Xenografts. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 39460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Gupta, P.B.; Kuperwasser, C. Contributions of estrogen to ER-negative breast tumor growth. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2006**, *102*, 71–78. [[CrossRef](#)]
88. Zhang, H.-T.; A E Scott, P.; Morbidelli, L.; Peak, S.; Moore, J.; Turley, H.; Harris, A.; Ziche, M.; Bicknell, R. The 121 amino acid isoform of vascular endothelial growth factor is more strongly tumorigenic than other splice variants in vivo. *Br. J. Cancer* **2000**, *83*, 63–68. [[CrossRef](#)]
89. Garvin, S.; Nilsson, U.W.; Dabrosin, C. Effects of oestradiol and tamoxifen on VEGF, soluble VEGFR-1, and VEGFR-2 in breast cancer and endothelial cells. *Br. J. Cancer* **2005**, *93*, 1005–1010. [[CrossRef](#)]

## **CAPÍTULO 3**

---

### **Estudio de la expresión de E-caderina y CADM1 en el cáncer inflamatorio mamario canino (IMC)**



- Título del trabajo: **E-cadherin and CADM1 as a signature of the “inflammatory phenotype” in canine inflammatory mammary cancer.**

-Autores: **Alonso-Diez, Angela; Affolter, Verena K; Sevane, N; Dunner, Susana; Valdivia, Guillermo; Clemente, Monica; de Andrés, Paloma J; Illera, Juan Carlos; Perez-Alenza, M<sup>a</sup> Dolores; Peña, Laura.**

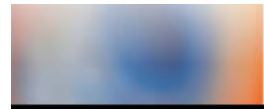
-Revista, volumen y páginas: **Res Vet Sci (en revisión)**

-Índice de impacto: **2,534.**

-Posición de la revista en el JCR:

Categoría	Rango JCR	Cuartil JCR	Percentil JCR
Ciencias Veterinarias	30/1446	Q1	79,79





Role:

Username: laurape@vet.ucm.es

**Submissions Being Processed for Author Laura Peña**

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display  results per page.

+ Action ▲▼	Manuscript Number ▲▼	Title ▲▼	Initial Date Submitted ▲▼	Status Date ▲▼	Current Status ▲▼
<a href="#">Action Links</a>	RVSC-D-21-01306	E-Cadherin and CADM1 overexpression as signature of the "inflammatory phenotype" in canine inflammatory mammary cancer	Nov 11, 2021	Nov 12, 2021	With Editor

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display  results per page.

[<< Author Main Menu](#)





## **1. Resumen**

La diseminación metastásica de las células neoplásicas es la principal causa de muerte en pacientes con cáncer (Cavallaro y Christofori, 2004). De hecho, estudios previos han determinado que todas las mujeres que padecen IBC tienen afectación de los linfonódulos regionales y aproximadamente el 40% tiene metástasis a distancia en el momento del diagnóstico (van Uden *et al.*, 2017, Fayanju *et al.*, 2020). Por otro parte, la supervivencia media en perras con IMC es de aproximadamente de un mes tras el diagnóstico sino se les administra tratamiento (Pérez Alenza *et al.*, 2001, Peña *et al.*, 2003a). De ahí que, elucidar los mecanismos moleculares que subyacen a este proceso represente uno de los mayores desafíos en la investigación del cáncer.

La observación de que las células tumorales abandonan el tumor primario para diseminar a órganos distantes y que, además, dichas células muestran cambios en sus interacciones con los componentes de la matriz extracelular y las células vecinas, ha llevado a la conclusión de que los cambios en la adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular mediados por la expresión y/o función de diferentes moléculas de adhesión están involucrados en la progresión tumoral. Recientemente, resultados experimentales han indicado que, además de mediar estas interacciones, estas moléculas también modulan directamente diferentes vías de señalización. Por tanto, cambios en la expresión o la función de estas, pueden contribuir a la progresión tumoral al alterar el estado de adhesión de la célula, así como su señalización celular (Cavallaro y Christofori, 2004).

Al contrario de lo que ocurre en otros tumores mamarios malignos, se ha demostrado que la E-caderina está sobreexpresada en el IBC y además circunferencialmente distribuida alrededor de la membrana celular (Ye *et al.*, 2010). De hecho, esta localización parece estar involucrada en la formación de los émbolos linfovascuales, los cuáles también sobreexpresan dicha molécula.

Asimismo, evidencias recientes han demostrado que la alteración de las interacciones mediadas por otras moléculas de adhesión, como por ejemplo CADM1, y que no han sido estudiadas tan en profundidad en el cáncer mamario en general, también pueden estar implicadas en la progresión tumoral.

Por ello, considerando que la E-caderina podía estar sobreexpresada en el IMC canino, el cuál comparte muchas características con el IBC humano; (incluyendo numerosas características epidemiológicas, fisio-patológicas, su biología molecular, diagnóstico, tratamiento y pronóstico), además de su relevancia en el proceso metastásico y los mecanismos angiogénicos y linfangiogénicos especiales del IBC e IMC (“fenotipo inflamatorio), los objetivos del presente capítulo fueron:

- Investigar la expresión de E-caderina y CADM1 en tumores IMC respecto a tumores mamarios no inflamatorios de grado III de malignidad (no-IMC).
- Investigar si la sobreexpresión de estas moléculas de adhesión está asociada con el “fenotipo inflamatorio”, por medio de la determinación de su posible asociación con factores angiogénicos y linfangiogénicos

involucrados en la angiogénesis, linfangiogénesis y linfangiotropismo exacerbado del IBC e IMC canino donde habitualmente se encuentran sobreexpresados.

Para la consecución de los objetivos anteriormente mencionados, aquellos tumores IMC y tumores no-IMC de grado III remitidos para su diagnóstico histopatológico fueron retrospectivamente seleccionados. Ambos grupos (IMC y no-IMC) fueron revisados histológicamente (H&E), se determinó su grado de malignidad histológica y se realizó el estudio inmunohistoquímico de E-caderina y CADM-1, así como de diferentes factores angiogénicos y linfangiogénicos (COX-2, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-D). Asimismo, por medio de técnicas moleculares se analizó la expresión de los genes de las moléculas de adhesión objeto de estudio y se realizó su validación por medio de qRT-PCR.

Los resultados demostraron que la expresión de E-cad y CADM1 fue mayor en los tumores IMC ( $P < 0,001$  y  $P = 0,008$ , respectivamente). Además, la inmunotinción citoplasmática de E-cad fue más frecuente ( $P = 0,035$ ) en los tumores IMC y se asoció con la expresión de los factores angiogénicos y linfangiogénicos; COX-2 ( $P = 0,009$ ), VEGF-A ( $P = 0,031$ ) y VEGF-D ( $P = 0,008$ ) respectivamente. Asimismo, la sobreexpresión de CADM1 también fue mayor en los tumores IMC ( $P = 0,008$ ) respecto a los tumores no-IMC, siendo su inmunotinción fundamentalmente citoplasmática. Por otro lado, al contrario de los resultados observados tras la realización de la IHQ, el estudio transcriptómico

demonstró que no existen diferencias en la expresión del gen de E-cad (CDH1) entre los tumores IMC y no-IMC, mientras que en el caso de CADM1, su expresión fue siete veces mayor en los tumores IMC. Por lo tanto, de la misma manera que ocurre en el IBC, existe una asociación positiva entre la expresión de E-cad y el “fenotipo inflamatorio” en el IMC. Además, la sobreexpresión de la proteína E-cad y su asociación con diferentes factores angiogénicos y linfangiogénicos sugiere que esta molécula podría estar involucrada en la regulación de la angiogénesis y linfangiogénesis características de este tipo de neoplasia tan agresiva en la perra. Por otro lado, la expresión diferencial de CADM1 y otras moléculas de adhesión en los tumores IMC, sugiere que estas moléculas también podrían estar involucradas en el “fenotipo inflamatorio” en el IMC. En resumen, estos resultados apoyan el valor del IMC canino como modelo de estudio del IBC humano.

## **2. Diseño experimental**

Para poder determinar la posible expresión de E-caderina y CADM-1 en el IMC canino y su posible papel en el “fenotipo inflamatorio”, en el presente estudio se llevó a cabo:

- Selección retrospectiva de tumores IMC caracterizados por la presencia de émbolos tumorales en los vasos linfáticos de dermis superficial y tumores no-IMC altamente malignos (grado III) con invasión linfovascular y/o presencia de metástasis en linfonódulos regionales.
- Revisión de las secciones teñidas con H&E y modificación del diagnóstico histopatológico inicial en aquellos casos en los que fue necesario; de acuerdo con la actual clasificación internacional de tumores mamarios caninos establecida (Zappulli *et al.*, 2019), y determinación del grado histológico de malignidad de dichos tumores mediante el uso del sistema destinado a determinar el grado histológico de malignidad de tumores mamarios caninos.
- Evaluación inmunohistoquímica (IHQ) de las moléculas de adhesión, E-caderina y CADM1, y los factores angiogénicos y linfangiogénicos; VEGF-A, VEGF-D, VEGFR-3 y COX-2, tanto en los tumores IMC como tumores no-IMC, y determinación de la posible asociación entre dichas moléculas de adhesión con los factores angiogénicos y linfangiogénicos anteriormente mencionados.
- Análisis de la expresión de los genes de las moléculas de adhesión a estudiar en ambos grupos (IMC y no-IMC) por medio del empleo de

tecnología *microarray*, y posterior validación de dicha expresión por medio del empleo de qRT-PCR.

- Análisis estadístico de las diferentes variables categóricas y numéricas estudiadas.

## Research in Veterinary Science

# E-Cadherin and CADM1 overexpression as signature of the “inflammatory phenotype” in canine inflammatory mammary cancer

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Article Type:</b>	Research Paper
<b>Section/Category:</b>	Pathology
<b>Keywords:</b>	Inflammatory breast cancer; canine mammary cancer; E-cadherin; CADM1
<b>Corresponding Author:</b>	Laura Peña SPAIN
<b>First Author:</b>	Ángela Alonso-Diez
<b>Order of Authors:</b>	Ángela Alonso-Diez Verena K. Affolter Natalia Sevane Susana Dunner Guillermo Valdivia Monica Clemente Paloma Jimena De Andrés Juan Carlos Illera María Dolores Pérez-Alenza Laura Peña
<b>Abstract:</b>	<p>Human inflammatory breast cancer (IBC) and canine inflammatory mammary cancer (IMC) are the most aggressive and lethal types of mammary tumors with specific characteristics such as exacerbated angiogenesis, lymphangiogenesis and lymphangiotropism. E-cadherin overexpression is another specific feature of IBC not previously studied in canine IMC. In this study, the expression of E-cadherin and CADM1 (Cell Adhesion molecule 1) and their possible role as key molecules involved in the “inflammatory phenotype” were immunohistochemically analyzed in 19 canine IMC and 16 grade III non-IMC cases. E-cadherin and CADM1 expression was higher in IMC cases (<math>p &lt; 0.001</math>, <math>p = 0.008</math>, respectively). In the IMC group, E-cadherin cytoplasmic immunolabelling was more frequent (<math>p = 0.035</math>) and it was associated to the expression of the angiogenic and lymphangiogenic factors COX-2 (<math>p = 0.009</math>), VEGF-A (<math>p = 0,031</math>) and VEGF-D (<math>p = 0.008</math>). The differential mRNA expression between IMC and non-IMC was studied by microarray analysis. In contrast with the protein overexpression, E-cadherin gene (CDH1) was not up-regulated in IMC cases at a transcriptional level although CADM1 was 7-fold upregulated. The overexpression of E-cadherin protein in IMC suggests a possible role of E-cadherin in the characteristic exacerbated angiogenesis and lymphangiogenesis and further support IMC as a natural model for the study of human IBC. Future studies in IBC and IMC including a broad panel of adhesion molecules are necessary to elucidate their role in the metastatic process and angiogenesis.</p>
<b>Suggested Reviewers:</b>	<p>Giuseppe Sarli giuseppe.sarli@unibo.it Prof. Sarli is author of one of the few studies published in E-cadherin and canine mammary tumors and a very well reputed scientist in the field of canine mammary tumors</p> <p>Adelina Gama agama@utad.pt Prof. Gama is an expert in canine mammary tumors who has published an original</p>

research on E-cadherin in canine mammary tumors

Michael Goldschmidt  
goldsch@upenn.edu  
Prof. Goldshmidt is an internationally recognized expert on canine mammary tumors

## **Highlights**

-IBC and IMC the most lethal mammary tumors have distinct clinicopathological features

-Changes in cell adhesion molecules contribute to tumor dissemination and metastasis

-E-cadherin overexpression is a specific feature of human inflammatory breast cancer

-As human disease, E-cadherin is associated with “canine inflammatory phenotype”

-Other cell adhesion molecules as CADM1 may be involved in the inflammatory phenotype

# **E-Cadherin and CADM1 overexpression as signature of the “inflammatory phenotype” in canine inflammatory mammary cancer**

A. Alonso-Diez\*, V.K. Affolter†, N. Sevane‡, S. Dunner‡, G. Valdivia\*, M.

Clemente\*<sup>2</sup>, P.J. De Andrés\*, J.C. Illera§, M.D. Pérez-Alenza\* and L. Peña\*

*\*Department of Animal Medicine, Surgery and Pathology, Veterinary Medicine School, Complutense University of Madrid (UCM), Spain,<sup>2</sup> Present address: British Veterinary Center (BVC), Abu Dhabi, United Arab Emirates (UAE).*

*†Department of Pathology, Microbiology, Immunology, School of Veterinary Medicine, University California Davis, United States,*

*‡Department of Animal Production, Veterinary Medicine School, Complutense University of Madrid (UCM), Spain.*

*§Department of Animal Physiology, Veterinary Medicine School, Complutense University of Madrid (UCM), Spain*

*Corresponding Author: Laura Peña. [laurape@ucm.es](mailto:laurape@ucm.es) Tel: +34913943740  
Facultad de Veterinaria, Avda Puerta de Hierro s/n, 28040, Madrid, Spain.*

## **Abstract**

Human inflammatory breast cancer (IBC) and canine inflammatory mammary cancer (IMC) are the most aggressive and lethal types of mammary tumors with specific characteristics such as exacerbated angiogenesis, lymphangiogenesis and lymphangiotropism. E-cadherin overexpression is another specific feature of IBC not previously studied in canine IMC. In this study, the expression of E-cadherin and CADM1 (Cell Adhesion molecule 1) and their possible role as key molecules involved in the “inflammatory phenotype” were immunohistochemically analyzed in 19 canine IMC and 16 grade III non-IMC cases. E-cadherin and CADM1 expression was higher in IMC cases ( $p < 0.001$ ,  $p = 0.008$ , respectively). In the IMC group, E-cadherin cytoplasmic immunolabeling was more frequent ( $p = 0.035$ ) and it was associated to the expression of the angiogenic and lymphangiogenic factors COX-2 ( $p = 0.009$ ), VEGF-A ( $p = 0,031$ ) and VEGF-D ( $p = 0.008$ ). The differential mRNA expression between IMC and non-IMC was

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32 studied by microarray analysis. In contrast with the protein overexpression, E-  
33 cadherin gene (CDH1) was not up-regulated in IMC cases at a transcriptional  
34 level although CADM1 was 7-fold upregulated. The overexpression of E-cadherin  
35 protein in IMC suggests a possible role of E-cadherin in the characteristic  
36 exacerbated angiogenesis and lymphangiogenesis and further support IMC as a  
37 natural model for the study of human IBC. Future studies in IBC and IMC  
38 including a broad panel of adhesion molecules are necessary to elucidate their  
39 role in the metastatic process and angiogenesis.

40

41

42 **Keywords:** Inflammatory breast cancer, canine mammary cancer, E-cadherin,  
43 CADM1

44

## 45 **1. Introduction**

46 Human inflammatory breast cancer (IBC) and its analogous disease in  
47 dogs, canine inflammatory mammary cancer (IMC), are the most aggressive and  
48 lethal types of mammary cancer. In the United States, IBC accounts for roughly  
49 2.5% of all newly diagnosed breast cancers in women (Goldner et al., 2014;  
50 Hance et al., 2005). In a study at the Complutense University of Madrid (Spain),  
51 the reported prevalence of IMC among dogs with mammary gland tumors  
52 (including dysplasias) was reported to be 7.6% (Pérez Alenza et al., 2001). Both  
53 IBC and IMC have unique molecular, pathological, and clinical features.  
54 Clinically, IBC (Dabi et al., 2017; van Uden et al., 2015; Woodward, 2015) and  
55 IMC (Clemente et al., 2010a; Peña et al., 2003; Pérez Alenza et al., 2001;  
56 Raposo et al., 2017) have a fulminant clinical course with rapid onset and are



## VI. DISCUSIÓN

---



Los tumores mamarios son las neoplasias más frecuentes en perras no castradas, y son conocidos por su gran heterogeneidad histomorfológica, caracterizada por una frecuente participación de diferentes poblaciones celulares, que incluyen componentes de origen epitelial, mioepitelial y mesenquimatoso (Canadas *et al.*, 2019). Aunque en los últimos años, la investigación ha contribuido enormemente a mejorar el conocimiento acerca de su biología celular, todavía existen tumores mamarios poco frecuentes que no se conocen en profundidad y de los que apenas se dispone información, o la información existente acerca de algunos de sus aspectos moleculares es aun escasa. Esto representa un gran desafío, ya que dificulta enormemente la realización de su correcto diagnóstico y, por consiguiente, el establecimiento de su pronóstico. Asimismo, la falta de conocimiento acerca de los mecanismos moleculares involucrados en su desarrollo y progresión impide el desarrollo de agentes terapéuticos eficaces destinados a la lucha frente a dichos tipos de tumores.

Por ello, en la presente Tesis Doctoral se han descrito 3 trabajos de investigación que pretenden contribuir a mejorar el conocimiento de aquellas neoplasias mamarias en la especie canina que son poco prevalentes; especialmente centrándose en los tumores mamarios caninos de células fusiformes (CSCMT) y el cáncer inflamatorio mamario (CI), y de los que aún se dispone de escasa información acerca de muchos aspectos involucrados en su biología celular. En estos estudios, además de establecer y caracterizar a los CSCMT por medio de su evaluación histomorfológica y la inmunexpresión de

marcadores de fenotipo tumoral específicos, también se ha analizado la influencia de diferentes terapias anti-angiogénicas en la producción *in vitro* e *in vivo* de diversas hormonas esteroides y factores angiogénicos así como, la posible influencia de dichas hormonas esteroides en la angiogénesis tumoral y en las modestas respuestas frente a estas terapias en el CI. Por último, dado que la sobreexpresión de E-caderina es una característica única del IBC respecto a otros tumores mamarios malignos, y juega un importante papel en el “fenotipo inflamatorio”, también se ha estudiado la expresión de diferentes moléculas de adhesión (E-caderina y CADM1) en tumores IMC respecto a tumores no-IMC de elevado grado de malignidad y su posible asociación con dicho “fenotipo inflamatorio”.

Como se ha mencionado a lo largo de la presente Tesis Doctoral, las referencias disponibles acerca de los CSCMT son escasas. Debido a su baja prevalencia, apenas se dispone de información acerca de cómo diferenciar los diferentes subtipos histológicos, y la información acerca de su comportamiento biológico es escasa o inexistente (Goldschmidt *et al.*, 2011).

Por ello en el primer capítulo de esta Tesis, se ha determinado la epidemiología, características clínicas e histopatológicas, y de comportamiento biológico de los CSCMT, siendo éste, el primer estudio realizado acerca de este tipo de neoplasias mamarias en la especie canina.

Debido a la baja prevalencia de este tipo de tumores, la realización de un estudio retrospectivo está más que justificada (Webster *et al.*, 2011); no obstante,

esto ha supuesto ciertas limitaciones, ya que la información relativa a los datos clínicos y de seguimiento de todos los pacientes incluidos en el estudio no pudo obtenerse completamente. Por ello, con objeto de conseguir un número representativo de casos, se realizó un estudio multicéntrico donde se recopilaron casos procedentes de 3 instituciones diferentes. Además, tan sólo se incluyeron aquellos casos constituidos predominantemente por células neoplásicas de morfología fusiforme o alargada, excluyendo aquellos casos con un patrón histológico compatible con tumor mixto, condrosarcoma y osteosarcoma, y el carcinoma y mioepitelioma maligno con evidente proliferación epitelial.

La clasificación histológica de los tumores mamarios en la mujer incluye varios subtipos histológicos de origen mesenquimatoso (Lokuhetty *et al.*, 2019). Al contrario de la sistemática establecida en Medicina Humana, dónde cualquier tumor que aparece en la región mamaria es considerando un tumor mamario independientemente de su origen, en el presente estudio, tan sólo aquellas neoplasias dónde se pudo demostrar el origen mamario fueron incluidas en el estudio. De tal manera que, tras excluir todos los casos de origen no mamario o aquellos de los que no se disponía de suficiente tejido para realizar tinciones complementarias, como la IHQ, 67 tumores mamarios procedentes de 67 perras fueron incluidos en el estudio, obteniéndose así un número de CSCMT malignos fiable y suficiente. Además, 3 CSCMT fueron benignos, concretamente, dos mioepiteliomas benignos y un angioma mamario, aunque estos no fueron considerados en el estudio.

Tras la realización de la IHQ de todos los CSCMT malignos incluidos, nuestros resultados demostraron que el mioepitelioma maligno y el carcinoma y mioepitelioma maligno son los subtipos histológicos más frecuentes, y sorprendentemente, ni el carcinoma de células fusiformes ni el carcinoma escamoso-variedad fusiforme están representados en esta serie de casos, por lo que los autores consideramos que si estos subtipos histológicos no han sido identificados tras recopilar casos procedentes de 3 instituciones diferentes durante un período de 16 años, puede deberse a que su existencia sea anecdótica y cuestionable, y que exista la posibilidad de que alguno de estos casos hayan sido diagnosticados como carcinomas (carcinoma de células fusiformes o carcinoma escamoso-variedad fusiforme) exclusivamente en base a sus características histomorfológicas (secciones teñidas con H&E) y sin haberse realizado técnicas complementarias necesarias como la IHQ. De hecho, el diagnóstico inicial de carcinoma de células fusiformes establecido en base a las características histomorfológicas (H&E), cambió a mioepitelioma maligno y carcinoma y mioepitelioma maligno tras la realización de IHQ.

Otro resultado sorprendente, fue la baja prevalencia de fibrosarcomas mamarios (n = 1) encontrada. De los 11 casos originalmente diagnosticados como fibrosarcomas de acuerdo con sus características histomorfológicas (H&E), tras la realización de la IHQ, su número se redujo a tan solo un único caso. Este resultado contrasta con la literatura actual, que define al fibrosarcoma como el subtipo de sarcoma mamario primario más prevalente (Dolka *et al.*, 2013), representando más del 16,7% de todos los tumores mamarios malignos y, además

siendo considerado el subtipo histológico de peor pronóstico (Hellmén *et al.*, 1993). Asimismo, contrariamente a lo establecido previamente, el único caso de fibrosarcoma confirmado (1% de los casos) en este estudio, fue clasificado como un tumor de grado III de malignidad de acuerdo con el grado de malignidad histológica para sarcomas y no presentó metástasis a distancia y/o en linfonódulos regionales, lo que podría indicar un comportamiento biológico no tan agresivo con se ha determinado hasta la fecha para este subtipo histológico. Desafortunadamente, no fue posible obtener información de seguimiento de este caso a los dos años tras la cirugía para confirmar dicha hipótesis. Sin embargo, al contrario de la baja prevalencia obtenida para los fibrosarcomas, nuestros resultados demostraron una gran frecuencia de hemangiosarcomas ( $n = 5/67$ , 7%).

Por otro lado, de acuerdo con las características histomorfológicas observadas por medio de H&E, inicialmente se identificaron 11 mioepiteliomas malignos. No obstante, dado que las células neoplásicas presentaban un patrón de crecimiento en forma de haces entrelazados o remolinos alrededor de una estructura central (nervio o vaso sanguíneo); disposición típica de los PNST/PWT, estos tumores fueron además clasificados como tumores compatibles con PNST/PWT por medio de H&E. Sin embargo, tras la realización de la IHQ, finalmente fueron reclasificados como mioepitelioma maligno ( $n = 5$ ), carcinoma y mioepitelioma maligno ( $n = 2$ ), PNST ( $n = 2$ ) y sarcoma indiferenciado ( $n = 2$ ).

Considerando que, en la especie canina, los tumores de la vaina nerviosa (PNST) son neoplasias que no solo ocurren en el sistema nervioso periférico, sino que también se desarrollan en los tejidos blandos y en varios órganos (Suzuki *et al.*, 2014), este es el primer estudio donde por primera vez se describe la existencia de PNST de origen mamario (n = 2). Además, ambos casos fueron tumores malignos, aunque dependiendo del sistema empleado para determinar el grado histológico de malignidad, su categorización fue diferente, siendo considerados tumores de grado I y II de malignidad, de acuerdo con el grado de malignidad para sarcomas, y de grado II de acuerdo con el grado de malignidad de tumores mamarios.

Al contrario de lo que ocurre en la mujer, en Medicina Veterinaria, la histogénesis de los PNST no ha sido completamente elucidada debido a las similitudes clínicas e histomorfológicas entre los diferentes subtipos que conforman este grupo de neoplasias. Además, su nomenclatura es confusa, de ahí que se continúe llamándoles genéricamente como PNST (Teixeira *et al.*, 2016). Concretamente, los PNST cutáneos son un grupo muy heterogéneo de neoplasias que se originan a partir de las células de la cresta neural, como las células de Schwann, las células perineurales o los fibroblastos. Estos tumores pueden tener un comportamiento biológico benigno o maligno y debido a que aún no se dispone de un marcador específico y sensible para su identificación, su diagnóstico se realiza fundamentalmente en base a una combinación de sus características histomorfológicas e inmunohistoquímicas (Teixeira *et al.*, 2016). De hecho, estas características histomorfológicas son muy similares a las de los PWT,

por lo que distinguir aquellos PNST de origen no nervioso de los PWT es difícil. Si, además, a esto le sumamos que en Medicina Veterinaria tanto los PNST como los PWT han sido siempre considerados sarcomas de tejidos blandos (del inglés, *Soft tissue sarcomas*, STS); nomenclatura bajo la que se incluyen otros subtipos histológicos constituidos por células fusiformes, como el fibrosarcoma, rabdomyosarcoma, leiomyosarcoma, mixosarcoma y mesenquimoma maligno (Suzuki *et al.*, 2014), dicha diferenciación aún resulta más compleja.

De acuerdo con esto, y a pesar de emplear un panel de marcadores inmunohistoquímicos para PNST/PWT (CD-31, miosina, SMA, S-100, GFAP) en aquellos casos diagnosticados como posibles PNST/PWT a partir de sus características histomorfológicas (H&E) finalmente no se identificó ningún PWT tras la IHQ. No obstante, a pesar de estos resultados, los autores consideramos que es posible que existan PWT mamarios teniendo en cuenta que las características histopatológicas observadas con H&E fueron compatibles con este subtipo histológico.

Finalmente, el diagnóstico histopatológico a partir de H&E cambió tras la realización de la IHQ en 50 de los 67 casos (75%) incluidos en el estudio, de ahí que como previamente se ha sugerido (Peña *et al.*, 2014), la IHQ sea esencial a la hora de establecer el fenotipo tumoral y, por tanto, realizar un correcto diagnóstico de este tipo de tumores. No obstante, de acuerdo con nuestros resultados, la técnica Tricrómico de Masson también podría ser de utilidad a la hora de diferenciar el fibrosarcoma (de cualquier origen) del mioepitelioma

maligno, representando así una alternativa más sencilla y barata a la IHQ en el diagnóstico rutinario de estos tumores.

Como ya se ha mencionado anteriormente, los subtipos histológicos más frecuentemente diagnosticados en este estudio fueron aquellos de origen mioepitelial, como el mioepitelioma maligno y el carcinoma y mioepitelioma maligno. Generalmente la proliferación de las células mioepiteliales en los TMC se ha asociado con un mejor pronóstico, sin embargo, algunos autores postulan que estas células pueden tener una doble función, actuando como supresores o promotores tumorales (Sánchez-Céspedes *et al.*, 2016). Por tanto, de acuerdo con esta teoría, las células mioepiteliales podrían tener un comportamiento diferente dependiendo de su grado de diferenciación; de tal manera que, las células mioepiteliales diferenciadas podrían estar asociadas con un mejor pronóstico, mientras que en los mioepiteliomas malignos, las células mioepiteliales indiferenciadas podrían estar asociadas a un peor pronóstico, favoreciendo así la progresión tumoral. En este estudio, tan solo dos mioepiteliomas malignos del total de casos confirmados con IHQ ( $n = 2/56$ ) mostraron un comportamiento maligno, lo que sugiere que este tipo de neoplasias son poco agresivas.

Para llevar a cabo la identificación de las células mioepiteliales, se ha propuesto el empleo de varios marcadores IHQ; entre ellos, marcadores de células basales como CK-14, marcadores de proteínas específicas de músculo liso como SMA y marcadores específicos de células mioepiteliales como p63 y calponina (Gama *et al.*, 2003, Beha *et al.*, 2012, Peña *et al.*, 2014, Yoshimura *et al.*, 2014, Sánchez-Céspedes *et al.*, 2016), los cuáles pueden perderse gradualmente

en las células mioepiteliales no basales. Atendiendo a esto, para asegurar una correcta identificación de estas células, es recomendable el uso de dos o más marcadores, ya que la negatividad a un solo marcador no debe considerarse como excluyente. En nuestros casos, fue poco frecuente que los mioepiteliomas malignos fueran positivos tanto a p63 como CK14, siendo más frecuente que tan solo expresaran uno de estos marcadores ( $P = 0,08$ ), lo que indica que se tratan de células mioepiteliales menos diferenciadas. Además, las diferencias encontradas en la expresión de marcadores mioepiteliales en el mioepitelioma maligno en respecto al carcinoma y mioepitelioma maligno, parecen indicar que se tratan de dos subtipos histológicos realmente diferentes, incluso cuando la proliferación de las células epiteliales en el carcinoma y mioepitelioma maligno es mínima. Por lo tanto, teniendo en cuenta esto, y considerando además, que ambos subtipos histológicos pueden diferir en su comportamiento maligno, es extremadamente recomendable llevar a cabo la identificación del carcinoma y mioepitelioma maligno con mínima proliferación epitelial por medio de IHQ.

El diagnóstico rutinario de los tumores se realiza de acuerdo con el patrón de diferenciación, es decir, en función de la morfología celular y la expresión antigénica observadas, y el origen celular normalmente se especula. Como se ha mencionado previamente, la mayor parte de los tumores de este estudio presentaban proliferaciones mioepiteliales en las secciones teñidas con H&E, que posteriormente no fueron identificadas inmunohistoquímicamente con marcadores mioepiteliales específicos. Además, también se identificaron otros subtipos histológicos como el hemangiosarcoma, el PNST y el sarcoma

indiferenciado, los cuales son considerados sarcomas y cuyo origen celular puede estar localizado en el estroma mamario. Si consideramos que estudios previos han determinado que las células mioepiteliales del tejido mamario tienen propiedades de células madre (Sánchez-Céspedes *et al.*, 2016) y una cierta plasticidad (Wensman *et al.*, 2008), podría ser perfectamente válido que la expresión de los marcadores inmunohistoquímicos de células mioepiteliales, así como las características histológicas, se pierdan a medida que las células mioepiteliales se desdiferencian y por tanto, estos sarcomas mamarios tengan un origen mioepitelial. No obstante, con objeto de confirmar o rebatir dicha hipótesis, es necesario la realización de estudios futuros que empleen cultivos de células mioepiteliales, aunque es digno de mención que todos los hemangiosarcomas del estudio fueron positivos a la calponina, marcador específico de células mioepiteliales.

Los sistemas empleados para determinar el grado de malignidad histológica son herramientas de pronóstico muy útiles, ya que facilitan la interpretación de los diagnósticos histopatológicos complicados y, además ofrecen criterios unificados para la evaluación de estas neoplasias (Peña *et al.*, 2013). Por ello, con objeto de caracterizar este tipo de tumores, en el presente estudio se emplearon dos sistemas diferentes; por un lado, el sistema para sarcomas y, por otro lado, el sistema destinado a los tumores mamarios caninos. En todos los casos incluidos en el estudio, dichos sistemas fueron aplicados antes de la realización de la IHQ, de tal manera que, el sistema destinado a los sarcomas se aplicó en todos los casos incluidos en el estudio, mientras que el sistema de

para tumores mamarios tan solo se usó en aquellos casos que de acuerdo con su histomorfología (H&E) fueron compatibles con mioepitelioma maligno o carcinoma y mioepitelioma maligno. En base a nuestros resultados, ninguno de los 2 sistemas pudo ser validado en términos de pronóstico ya que todos los CSCMT clasificados como tumores de grado II y III de malignidad por ambos sistemas, desarrollaron recurrencia y/o metástasis durante el período de seguimiento. Lo deseable habría sido que tan sólo los CSCMT de grado III hubieran demostrado dicho comportamiento maligno. Sin embargo, sí podemos indicar que el sistema para tumores mamarios caninos representó mucho mejor el bajo grado de malignidad de estos tumores, ya que la mayor parte de los casos fueron de grado II. Asimismo, todos los CSCMT malignos que tuvieron afectación ganglionar o metástasis a distancia a la presentación fueron categorizados como tumores de grado III de malignidad por ambos sistemas. De acuerdo con esto, los autores recomendamos que, en aquellos casos en los que se realice la IHQ y se alcance un diagnóstico definitivo, si el diagnóstico es de sarcoma mamario, tan solo se emplee el sistema destinado a los sarcomas; por el contrario, si el diagnóstico definitivo es de mioepitelioma maligno o carcinoma y mioepitelioma maligno tan solo debería emplear el sistema para tumores mamarios, ya que la aplicación de los criterios de un determinado sistema en aquellos subtipos histológicos donde no han sido validados previamente puede ser inapropiado.

Por otro lado, nuestros resultados revelaron que, clínicamente, los CSCMT son por lo general tumores solitarios, de gran tamaño, poco o nada agresivos y

que raramente afectan a los linfonódulos regionales u originan metástasis a distancia. Además, el hecho de que la mayor parte de las perras no estuvieran castradas, que algunos CSCMT malignos se desarrollaran simultáneamente con otros tumores mamarios (29/67, 43%); así como las asociaciones en términos de crecimiento (tamaño) y comportamiento biológico (benignidad y malignidad) encontradas entre los CSCMT y los otros tumores mamarios presentes en la mama de un mismo paciente, podría indicar la existencia de una posible influencia hormonal en el desarrollo de estas neoplasias. De hecho, en estudios previos (Hellmén *et al.*, 2000) realizados en líneas celulares derivadas de tumores mamarios de células fusiformes, se ha determinado la presencia de receptores de progesterona, aunque no la existencia de receptor de estrógenos, por ello, sería deseable la realización futuros estudios donde se trate de determinar la posible dependencia hormonal de este tipo de tumores.

Por otro lado, el cáncer inflamatorio mamario humano (IBC) y canino (IMC), también son entidades clínico-patológicas poco frecuentes que se caracterizan por ser altamente agresivas, de progresión extremadamente rápida y con mecanismos carcinogénicos específicos, incluyendo una exacerbada angiogénesis, linfangiogénesis y linfangiotropismo, que son poco conocidos (Pérez Alenza *et al.*, 2001, Peña *et al.*, 2003a, Robertson *et al.*, 2010, Woodward, 2015).

El crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis dependen de la angiogénesis, la cual durante los últimos años se ha convertido en una importante diana terapéutica (Qian *et al.*, 2016) frente a la cual se han

desarrollado multitud de agentes terapéuticos. Sin embargo, el inevitable desarrollo de resistencias frente a los mismos plantea la necesidad de identificar cuáles son los mecanismos involucrados en la misma. Teniendo en cuenta esto y en base a la hipótesis planteada acerca de la posible influencia de las hormonas esteroides en el proceso de angiogénesis, en el capítulo 2, se determinó el posible efecto de diferentes terapias anti-angiogénicas en la producción *in vitro* e *in vivo* de hormonas esteroides y factores angiogénicos, así como, el posible papel de estas hormonas esteroides en la angiogénesis tumoral.

Comenzado con los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*, nuestro estudio determinó que bevacizumab y celecoxib fueron los únicos tratamientos que redujeron la proliferación celular como se ha determinado previamente para otras líneas celulares (Basu *et al.*, 2005, Emler *et al.*, 2007). Sin embargo, *in vivo* tan solo bevacizumab redujo el crecimiento tumoral; siendo esta reducción de aproximadamente un 40%, al igual que lo descrito en estudios previos (Higgins *et al.*, 2007, Gui *et al.*, 2018). Por tanto, nuestros resultados apoyan la idea de que el bevacizumab puede ser una buena estrategia terapéutica en combinación con otras terapias en el tratamiento del IBC e IMC.

El complejo microambiente de los tumores sólidos implica que las células tumorales reciben señales procedentes de múltiples fuentes y, a la inversa, estas también envían señales que influyen en la función de las células vecinas. No obstante, aparte de estos mecanismos de señalización paracrina, las células tumorales también son capaces de adquirir un cierto grado de autosuficiencia por medio de la producción de vías de señalización autocrina que favorecen

funciones clave de crecimiento, invasión y supervivencia celular (Hanahan y Weinberg, 2011).

Si tenemos en cuenta lo anteriormente mencionado y nos centramos en los resultados obtenidos tras la realización de los ensayos *in vitro*, estos demostraron que, las concentraciones de P4 secretadas al medio disminuyeron tras la adición de los diferentes tratamientos anti-angiogénicos (SU5416, bevacizumab y celecoxib), mientras que la adición de VEGF no alteró la secreción de esta hormona. Aunque el papel de la P4 en la angiogénesis tumoral aún no ha sido completamente elucidado, existen algunos estudios donde se ha establecido que esta hormona puede estar involucrada en el proceso de angiogénesis al inducir la producción de VEGF (Wu *et al.*, 2004, Hyder, 2006, Botelho *et al.*, 2015). Nuestros resultados coinciden con los resultados observados en dichos estudios, ya que tras la inhibición del VEGF por acción del bevacizumab, las concentraciones de P4 también disminuyeron, lo que podría indicar que las células están empleando la P4 producida para tratar de inducir la producción de VEGF y así sobrevivir. Además, estos resultados también sugieren que, a la inversa, el VEGF no promueve la producción de P4, ya que no se observaron cambios significativos en la secreción de esta hormona tras la adición de VEGF, respaldando así la idea de que la P4 es un factor determinante en la producción de VEGF y la proliferación celular.

Aunque tras la adición de los diferentes tratamientos anti-angiogénicos la proliferación celular disminuyó en ambas líneas, tanto las concentraciones de T como de E2 aumentaron en los grupos de tratamiento respecto al grupo control,

por lo que no es posible descartar la posibilidad de que estos tratamientos no sean capaces de suprimir la actividad de la enzima aromatasa, como se ha demostrado para otros fármacos; como los inhibidores selectivos de RTK, (Banerjee *et al.*, 2009), y por ello, las células sean capaces de seguir sintetizando estrógenos, los cuales están involucrados en la proliferación celular.

Aunque inicialmente el VEGF fue descrito como un importante factor pro-angiogénico, evidencias científicas recientes han determinado que este factor tiene funciones adicionales. Concretamente, varios estudios han establecido que este factor promueve la supervivencia celular al estimular una señalización autocrina de supervivencia en respuesta a estímulos extracelulares (Bachelder *et al.*, 2001, Harmey y Bouchier-Hayes, 2002, Bates *et al.*, 2003), además de contribuir a la migración tumoral y la progresión hacia gradientes quimio-atrayentes (Bates *et al.*, 2003). En nuestro estudio, las concentraciones secretadas de VEGF-A disminuyeron significativamente tras la adición de VEGF al medio de cultivo; por el contrario, estas concentraciones fueron significativamente mayores tras la adición de bevacizumab. Esto sugiere que, en presencia de elevadas concentraciones extracelulares de VEGF-A, las células tumorales no secretan VEGF-A de forma autocrina, y en cambio, emplean el VEGF-A extracelular para proliferar y sobrevivir. Sin embargo, las elevadas concentraciones de VEGF-A encontradas tras el tratamiento con bevacizumab, unido a las elevadas concentraciones de E2, podrían corresponderse con una secreción autocrina de este factor angiogénico por parte de las células tumorales bajo la influencia de E2, y en cierta medida, este VEGF-A secretado al medio, podría estar actuando como

un factor de supervivencia con objeto de contrarrestar el efecto del bevacizumab. Esto podría explicar que, aquellas terapias en las que el bevacizumab se emplea como único agente terapéutico no obtengan resultados satisfactorios (Sasich y Sukkari, 2012).

Otro resultado obtenido en los ensayos *in vitro* digno de mención, fueron las elevadas concentraciones de IL-8 encontradas tras el tratamiento con bevacizumab. Recientemente, se ha demostrado que la angiogénesis tumoral es un proceso que está estrechamente regulado por la acción local de otros factores angiogénicos, además de los diferentes miembros de la familia del VEGF. Uno de esos factores es IL-8, interleucina reconocida como un promotor de la progresión tumoral por medio de la inducción del proceso EMT (Al-Khalaf *et al.*, 2019); y un potente factor angiogénico, al favorecer la expresión de VEGF en las células endoteliales e inducir la proliferación y supervivencia de estas tras la unión a sus receptores específicos (Todorović-Raković y Milovanović, 2013, Yehya *et al.*, 2018). Teniendo en cuenta estas observaciones, las elevadas concentraciones de IL-8 tras el tratamiento con bevacizumab encontradas en este estudio, podrían estar ejerciendo una posible influencia en la secreción de VEGF-A por parte de las células tumorales.

Por tanto, considerando todos estos hallazgos *in vitro* de manera conjunta, nuestro estudio sugiere que la secreción *in vitro* de VEGF-A por parte de las células neoplásicas podría estar estrechamente regulada por la acción de P4, E2 e IL-8.

Durante las últimas décadas, la realización del ensayo de formación de tubos mediante el uso de Matrigel, ha sido extensamente empleada con objeto de demostrar *in vitro* la capacidad angiogénica de las células endoteliales. Sin embargo, recientemente, este ensayo no solo se ha limitado a probar el comportamiento vascular de las células endoteliales, sino también la capacidad de las células tumorales de desarrollar un fenotipo vascular (Francescone *et al.*, 2011). Esta es la primera vez en la que se ha determinado que las líneas celulares de cáncer mamario inflamatorio, SUM149 e IPC-366, son capaces por sí mismas de formar estructuras de tipo vascular en condiciones *in vitro*, demostrándose así, su potencial angiogénico y su carácter agresivo. Además, por medio de este ensayo, hemos demostrado que las diferentes terapias anti-angiogénicas estudiadas no inhiben completamente la formación *in vitro* de estas estructuras como era de esperar, lo sugiere que la formación de estas es un proceso complejo donde no solo están involucrados factores angiogénicos, sino que otros posibles factores no estudiados tan en profundidad hasta la fecha, podrían ejercer una cierta influencia. De hecho, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que las hormonas esteroides también están íntimamente involucradas en la angiogénesis como previamente han descrito otros autores (Lansink *et al.*, 1998). Concretamente, tras la realización de este ensayo, las concentraciones de los andrógenos (DHEA y DHT) en el medio de cultivo de ambas líneas celulares disminuyeron significativamente tras la adición de VEGF, mientras que, tras el tratamiento con bevacizumab, dichas concentraciones fueron similares a las de los grupos control. Estudios previos han demostrado que la adición de

andrógenos al medio de cultivo de líneas celulares tumorales favorece la formación *in vitro* de estructuras de tipo vascular (Liu *et al.*, 2017), por lo que las bajas concentraciones de DHEA y DHT encontrados en nuestro estudio, sugieren que estos andrógenos podrían estar siendo consumidos por las células neoplásicas y, en parte, empleados en la formación *in vitro* de estas estructuras.

Contrariamente a lo establecido previamente por otros autores (Basu *et al.*, 2005) acerca de la capacidad del celecoxib de inhibir la formación *in vitro* de estructuras de tipo vascular en diferentes líneas celulares de cáncer mamario, nuestros resultados revelaron que este agente no inhibe la formación de estas estructuras y estas son, además, morfológicamente diferentes a las del grupo control. Asimismo, nuestros resultados mostraron que, tras la adición de dicho tratamiento, los niveles de VEGF-C aumentaron, mientras que las concentraciones de VEGF-D estaban significativamente disminuidas. En conjunto, todos estos resultados parecen indicar que el tratamiento con celecoxib puede promover el proceso de linfangiogénesis a través de la inducción de VEGF-C y el consumo de VEGF-D; ambos considerados importantes factores linfangiogénicos (Stacker y Achen, 2018).

También se observó una disminución significativa de las concentraciones de VEGF-D tras el tratamiento con SU5416. Si tenemos en cuenta que este agente se desarrolló como un prometedor inhibidor sintético selectivo del receptor VEGFR-2/Flk-1 (Haddad, 2012), y que VEGF-D es un ligando no sólo del receptor VEGFR-2/Flk-1 sino también de VEGFR-3/Flk-4 (Sullivan y Brekken, 2010), nuestros resultados sugieren que las bajas concentraciones de VEGF-D tras

este tratamiento, se deben posiblemente a que todo el VEGF-D secretado por las células está unido al receptor VEGFR-3/Flk-4 ya que el receptor VEGFR-2/Flk-1 está siendo inhibido por SU5416.

Como ya hemos indicado previamente, las hormonas esteroides, y especialmente, los estrógenos, están estrechamente involucrados en la carcinogénesis mamaria y, además, evidencias recientes sugieren que la angiogénesis tumoral puede estar regulada por dichas hormonas (Yager y Davidson, 2006, Botelho *et al.*, 2015). Al contrario de lo que ocurre con los estrógenos, el papel de los andrógenos en el cáncer de mama aún no está claro, existiendo dos claras vertientes acerca del efecto de estos en el riesgo de desarrollo de cáncer mamario. Mientras que algunos estudios han determinado que, elevadas concentraciones urinarias de T en mujeres postmenopáusicas están asociadas con peores resultados y mayores tasas de progresión (Venturelli *et al.*, 2018), otros estudios han determinado que los andrógenos ejercen efectos antiproliferativos y antiapoptóticos (Somboonporn y Davis, 2004, von Schoultz, 2007), e incluso, recientemente, se ha postulado que elevados niveles de T están asociados con un menor porcentaje de metástasis en ratones xenotransplantados con líneas celulares de cáncer inflamatorio mamario humano y canino (SUM149 e IPC-366) (Caceres *et al.*, 2016).

En este estudio hemos encontrado varias diferencias en cuanto a las concentraciones intratumorales de andrógenos tras la inoculación de los diferentes tratamientos anti-angiogénicos estudiados y su posible implicación en el crecimiento tumoral y desarrollo de metástasis en órganos distantes.

Específicamente, los resultados demostraron que tras la inoculación de bevacizumab y celecoxib, tan solo las concentraciones intratumorales de T aumentaron respecto a las del grupo control. Además, en ambos tratamientos la tasa de crecimiento tumoral y la presencia de metástasis fueron significativamente más bajas respecto a los grupos control. Considerando conjuntamente estos resultados, estos datos sugieren que las elevadas concentraciones intratumorales de T, en presencia de bajas concentraciones de estrógenos, pueden estar involucradas en la inhibición del crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis en estos dos tratamientos. Por otro lado, aunque los niveles intratumorales de T tras la inoculación de SU5416, también estaban elevados en los homogeneizados tumorales, en términos de crecimiento tumoral y metástasis dicho tratamiento mostró un efecto opuesto, ya que no inhibió el crecimiento tumoral ni la presencia de metástasis. Una posible explicación a estas diferencias encontradas entre los distintos tratamientos podría estar relacionada con las elevadas concentraciones intratumorales de E1SO4 encontradas. Estudios previos han determinado que el E1SO4 puede actuar con un importante reservorio de estrógenos para las células neoplásicas y, por tanto, promover la progresión tumoral (Caceres *et al.*, 2018). Además, algunos autores han asociado la expresión de E1SO4 con la presencia de metástasis en linfonódulos regionales y con tasas de recaída en la supervivencia libre de enfermedad en pacientes con cáncer de mama (Kristensen y Borresen-Dale, 2000). Por ello, estas elevadas concentraciones de E1SO4 encontradas, podrían estar involucradas en la

promoción de la progresión tumoral y la aparición de metástasis tras dicho tratamiento.

Aunque en los últimos años, la terapia con celecoxib ha atraído mucha atención por sus propiedades anti-tumorales, y especialmente por sus propiedades anti-angiogénicas al inhibir la producción de VEGF inducida por la acción de la prostaglandina E<sub>2</sub>, y por consiguiente, reducir la densidad microvascular, la formación de estructuras de tipo vascular *in vitro* y los niveles séricos de VEGF, varios estudios han sugerido que este agente puede tener efectos contradictorios en la respuesta tumoral y la angiogénesis (Eibl *et al.*, 2005, Xu *et al.*, 2011). Específicamente, Ueno y colaboradores (2006) encontraron que pacientes con cáncer de mama tratados con celecoxib, tenían elevadas concentraciones circulantes de VEGF. Los resultados del presente estudio coinciden con los anteriormente mencionados, ya que las concentraciones de VEGF en los homogeneizados tumorales de los ratones xenotransplantados aumentaron tras el tratamiento con celecoxib.

Por otro lado, también se ha demostrado previamente que los anti-inflamatorios no esteroideos como celecoxib, reducen el riesgo de desarrollo de cáncer mamario, al suprimir la expresión de citocinas pro-inflamatorias, como IL-8, por parte de las células tumorales (Chen *et al.*, 2003). Sin embargo, al contrario de lo establecido anteriormente, en este estudio las concentraciones intratumorales de IL-8 en los ratones xenotransplantados aumentaron tras el tratamiento con celecoxib. Dado que en varias formas de cáncer se ha demostrado que VEGF y e IL-8 están interconectados, es decir, la sobreexpresión de VEGF

induce la expresión de IL-8 y viceversa, no es posible descartar la posibilidad de que la IL-8 pueda estar promoviendo la acción de VEGF tras este tratamiento y por ello no se observase una disminución la progresión tumoral.

Tras comparar los resultados de las concentraciones de hormonas esteroides y factores angiogénicos tras la inoculación de VEGF y bevacizumab, estos demostraron que las concentraciones intratumorales de E2 y VEGF parecen estar positivamente asociadas, ya que ambas estaban significativamente aumentadas en los ratones xenotransplantados tratados con VEGF, y disminuidas en aquellos tratados con bevacizumab. Estos resultados coinciden con estudios previos que apoyan el papel del estradiol como un potente regulador de la expresión de VEGF en el tejido mamario normal y en diferentes líneas celulares de cáncer mamario (Zhang *et al.*, 2000, Garvin *et al.*, 2005, Gupta y Kuperwasser, 2006).

Por otro lado, las concentraciones séricas de VEGF y E2, las cuáles han sido propuestas por algunos autores como un reflejo de las concentraciones intratumorales (Dabrosin *et al.*, 2003), no se asociaron con las concentraciones de los homogeneizados tumorales, siendo estas últimas mayores que los niveles séricos. Esto sugiere que, tanto las hormonas como los diferentes factores angiogénicos involucrados en la angiogénesis, son producidos localmente en los tejidos donde actúan y tan sólo una pequeña proporción de estos es liberada al torrente sanguíneo, reflejando, por tanto, una pequeña proporción de los niveles intratumorales.

Considerando esta información, la medición de los diferentes reguladores del desarrollo tumoral, tales como VEGF-A y E2, localmente en el tumor, podría ser más adecuado para determinar la cantidad total de las proteínas bioactivas extracelulares liberadas por el tumor. Hoy en día, el cáncer mamario es diagnosticado por medio del estudio histopatológico a partir de biopsias, mamografía y la expresión de diferentes genes. Sin embargo, los niveles de expresión de dichos genes, así como de las proteínas intracelulares no siempre son indicativos de la cantidad de proteínas extracelulares biológicamente activas, y por lo tanto, los pacientes con cáncer de mama pueden estar recibiendo un tratamiento inadecuado. Por ello, los autores consideramos que la determinación de los diferentes reguladores (e.g. hormonas esteroides) involucrados en el desarrollo tumoral en el compartimento donde son biológicamente activos, mejoraría sustancialmente el conocimiento de las características del tumor y proporcionaría un perfil hormonal detallado antes del tratamiento para predecir la sensibilidad hormonal de dicho tumor, por lo que se podrían conseguir tratamientos individualizados más adecuados.

Continuando con el estudio de diversos aspectos aún desconocidos de la biología del IMC en la especie canina, en el capítulo 3 de la presente Tesis Doctoral se describen los resultados obtenidos respecto a la expresión de diversas moléculas de adhesión en dicha neoplasia mamaria y su posible influencia en el “fenotipo inflamatorio”.

El cáncer inflamatorio mamario humano (IBC) y canino (IMC) son neoplasias mamarias comparables ya que comparten numerosas características.

Además de la exacerbada angiogénesis, linfangiogénesis y linfangiotropismo característicos de ambos tumores, también existen otros mecanismos carcinogénicos que son específicos de este tipo especial de neoplasia. Específicamente, una sobreexpresión de E-cad, también ha sido identificada como una de estas características únicas en el IBC, ya que contrariamente a lo que ocurre en otros tumores mamarios altamente malignos, en el IBC las células neoplásicas sobreexpresan E-cad (Kleer *et al.*, 2001).

Dado que esta es la primera vez que la expresión de E-cad y otras moléculas de adhesión es evaluada en el IMC, este estudio proporciona una nueva visión acerca del papel de E-cad en la patogénesis y/o progresión del IMC, al demostrar, que su sobreexpresión es una característica específica del “fenotipo inflamatorio” en el IMC canino, de la misma manera que ocurre en el IBC (Alpaugh *et al.*, 1999, Kleer *et al.*, 2000, Colpaert *et al.*, 2003, Hoffmeyer *et al.*, 2005, Ye *et al.*, 2010)

Contrariamente, una menor expresión de E-cad ha sido descrita previamente en carcinomas mamarios no-IMC de grado III, donde dicha expresión se ha asociado con una menor diferenciación, una gran capacidad invasiva, un elevado índice de proliferación, la presencia de metástasis en linfonódulos regionales y un mal pronóstico (Matos *et al.*, 2006, Gama *et al.*, 2008b). Resultados similares han sido descritos en el cáncer mamario humano, donde una pérdida parcial o total de expresión de E-cad se ha correlacionado con una pérdida de diferenciación, la adquisición de capacidad invasiva y un mal pronóstico. (Berx y Van Roy, 2001). En los últimos años, un nuevo concepto

denominado plasticidad epitelio-mesenquimatosa, sugiere que el fenómeno de transición epitelio-mesenquimatosa (EMT) no es un “interruptor de encendido/apagado”, sino que se trata de un proceso constituido por cambios dinámicos entre los fenotipos epitelial y mesenquimatoso que proporcionan una mayor plasticidad para el desarrollo de metástasis (Nieto *et al.*, 2016, Simeone *et al.*, 2019, Williams *et al.*, 2019, Sun y Yang, 2020). Teniendo en cuenta esto y los resultados de estudios previos (Kleer *et al.*, 2000), la pérdida de expresión de E-cad podría ser un fenómeno transitorio que permite que las células neoplásicas invadan los vasos sanguíneos y tejidos circundantes y una vez en la circulación, estas células podrían re-expresar E-cad, favoreciendo así la unión intracelular de las células neoplásicas y, por tanto, la formación de grupos compactos de células neoplásicas o émbolos tumorales, los cuáles son extremadamente eficientes en la diseminación metastásica y extremadamente resistentes a la quimioterapia y radioterapia (Ye *et al.*, 2010, Rodriguez *et al.*, 2012).

En todos los tumores IMC incluidos en el estudio, la sobreexpresión de E-caderina no solo se observó en las células neoplásicas primarias, sino también en las células epiteliales invasivas con características mesenquimales (transición epitelio-mesenquimatosa) y en las células de los émbolos linfáticos. Esta expresión también ha sido descrita en las células de los émbolos linfáticos en el IBC (Kleer *et al.*, 2000, Ye *et al.*, 2010).

La expresión citoplasmática de E-cad encontrada en la mayor parte de los tumores IMC y algunos no-IMC de grado III del presente estudio, ha sido previamente descrita en tumores mamarios malignos caninos (Brunetti *et al.*,

2003, Dias Pereira y Gärtner, 2003, Sarli *et al.*, 2004, Gama *et al.*, 2008b, Raposo-Ferreira *et al.*, 2018) y en tumores mamarios felinos (Dias Pereira y Gärtner, 2003). Sin embargo, hasta la fecha, el significado de esta inmunotinción aberrante se desconoce, planteándose varias hipótesis al respecto: podría deberse a un fallo en la translocación o anclaje de E-cad a la membrana celular, o bien podría ser resultado de un defecto funcional de la cola citoplasmática de E-cad, de tal manera, que esta no puede establecer uniones con las cateninas intracelulares para formar el llamado complejo E-cad-catenina, resultando, por tanto, en una imposibilidad de formar uniones intercelulares (Restucci *et al.*, 1997, Sarli *et al.*, 2004).

Con el fin de comparar la relación de E-cad con el comportamiento invasivo y metastásico, este estudio se limitó a la evaluación de tumores IMC y tumores no-IMC de elevado grado de malignidad histológica (grado III). Esta selección de casos hace que este estudio sea único, y no pueda ser completamente comparable con estudios previos, donde tumores benignos y tumores no invasivos/metastásicos de baja malignidad han sido incluidos (Restucci *et al.*, 1997, Reis *et al.*, 2003, Sarli *et al.*, 2004, Matos *et al.*, 2006).

En este estudio, la E-cad estaba significativamente sobreexpresada en los carcinomas rico en lípidos, comedocarcinomas, carcinomas sólidos y carcinomas túbulo-papilares. Sin embargo, en comparación, estudios previos han determinado una mayor expresión de esta molécula en los carcinomas túbulo-papilares y una menor expresión en los carcinomas sólidos (Restucci *et al.*, 1997, Reis *et al.*, 2003, Matos *et al.*, 2006). Estas discrepancias entre los estudios pueden

explicarse por el hecho de que la mayor parte de los casos de nuestro estudio con marcada sobreexpresión de E-cad fueron IMC, así como por el empleo de sistemas de clasificación histológica previos donde subtipos histológicos, como el carcinoma rico en lípidos y el comedocarcinoma, no estaban incluidos, y los cuáles como posteriormente se ha demostrado (Peña *et al.*, 2003a), son más prevalentes en el IMC.

Por otro lado, nuestros resultados demostraron que la expresión citoplasmática de E-cad estaba significativamente asociada con la expresión de COX-2, VEGF-A y VEGF-D en los tumores IMC, pero no en los tumores no-IMC. Estos factores también están sobreexpresados y se sabe que participan en la exacerbada angiogénesis y linfangiogénesis en el IBC (Kleer *et al.*, 2000, Van der Auwera *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2020) e IMC (Clemente *et al.*, 2013). Por tanto, estos resultados apoyan lo establecido en estudios previos donde se indica la existencia de mecanismos angiogénicos diferentes en el IBC (Colpaert *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2020) e IMC (Clemente *et al.*, 2013), además de un posible papel de la E-cad en la angiogénesis y linfangiogénesis. De hecho, estudios realizados en la fibrosis oral submucosa; lesión premaligna del carcinoma escamoso oral, el cáncer colorectal metastásico, y varias líneas celulares de cáncer mamario humano (Ma *et al.*, 2010, Anura *et al.*, 2014, Bendardaf *et al.*, 2019), han demostrado que la E-cad regula la expresión de VEGF-A, promoviendo la angiogénesis tumoral a través de una cascada de señalización que conecta la E-cad con genes angiogénicos diana a través de la  $\beta$ -catenina (Zhang *et al.*, 2001, Easwaran *et al.*, 2003). En el caso del VEGF-D, aunque no existen estudios previos

que hayan establecido una asociación positiva entre E-cad y VEGF-D, su existencia en los tumores IMC de este estudio, sugiere que la E-cad podría estar involucrada también en la característica linfangiogénesis del IMC a través del VEGF-D.

En cuanto a la asociación encontrada entre la expresión de E-cad y COX-2, previamente se ha determinado que, en varias líneas celulares de cáncer mamario (MCF-7 y MDA-MD-231) (Bocca *et al.*, 2014) y en otros tumores no inflamatorios, como el cáncer de pulmón, próstata, glándula tiroides y carcinomas orales (Dohadwala *et al.*, 2006, Rao *et al.*, 2006, Erdem *et al.*, 2011, Santoro *et al.*, 2020), la COX-2 participa en la invasión y metástasis tumoral al disminuir la expresión de E-cad. Sin embargo, en el grupo de tumores IMC de este estudio, la correlación positiva entre la expresión de COX-2 y E-cad encontrada, refuerza la idea de que en el IMC existen mecanismos desconocidos únicos implicados en la agresividad y capacidad invasiva del IMC. Esto supone la necesidad de realizar estudios futuros que permitan determinar el papel colaborativo de COX-2 y E-cad en el característico “fenotipo inflamatorio” en el IBC e IMC.

En cuanto al estudio transcripcional, éste demostró que no se produjo una mayor transcripción del gen de E-cad (CDH1) en los tumores IMC respecto a los tumores no-IMC; resultados similares han sido descritos en el caso de IBC (Ye *et al.*, 2010). Esto sugiere que la sobreexpresión de E-cad podría en parte deberse a mecanismos post-transducciones que involucran a proteínas clave en la regulación del tráfico endosómico de esta molécula de adhesión (Ye *et al.*, 2010).

En las últimas décadas, se ha planteado la importancia del tráfico intracelular de E-cad como un mecanismo para regular las funciones de esta molécula, siendo transportada desde y hacia la superficie celular por vías exocíticas y endocíticas múltiples (Bryant y Stow, 2004). Por lo tanto, alternativamente la acumulación citoplasmática de E-cad podría deberse a una menor degradación lisosomal de la misma.

El tráfico endosómico de E-cad representa un mecanismo celular que puede afectar a la estabilidad de las uniones adherentes. En condiciones normales este proceso regulador del recambio (*turnover*) de E-cad, es responsable de mantener la dinámica de las monocapas epiteliales mediante la acción de numerosas moléculas y mecanismos endocíticos que determinan el destino de la E-cad internalizada; en otras palabras, son responsables de determinar si la E-cad internalizada es devuelta a la membrana plasmática a través de los endosomas de reciclaje para formar nuevas uniones celulares, o bien si es degradada en los lisosomas (Brüser y Bogdan, 2017). Sin embargo, durante la EMT, donde se produce una pérdida de la función de la E-Cad, y por tanto del fenotipo epitelial, y la adquisición de un fenotipo mesenquimatoso y móvil, este tráfico endosómico está marcadamente aumentado, postulándose además, que el aumento de la degradación lisosomal de E-cad es el mecanismo responsable de asegurar que las células no forman de nuevo sus uniones intercelulares y permanecen móviles. De hecho, para que dicha degradación lisosomal y la consiguiente pérdida de expresión de E-cad tenga lugar durante la EMT, es necesario que una serie de mecanismos de señalización, como la ubiquitinación de E-cad y su transporte a

través de la vía endocítica desde los endosomas tempranos a los endosomas tardíos y lisosomas, tenga lugar (Fujita *et al.*, 2002, Palacios *et al.*, 2005).

En este estudio, varios miembros de la familia de proteínas RAB presentaron niveles de expresión alterados; concretamente los niveles de expresión de RAB7a, RAB13 y RAB 31 fueron más altos mientras que otros, como geraniltransferasa y MYRIP, tuvieron menores niveles de expresión en los tumores IMC respecto a los no-IMC. Teniendo en cuenta que la familia de proteínas RAB regula el transporte de proteínas a lo largo de las vías endocíticas y exocíticas en todos los tipos celulares, nuestros resultados sugieren la posibilidad de que exista un mecanismo de transporte vesicular de E-cad y otras proteínas de adhesión diferente en el IMC respecto al no-IMC. En el caso del IBC, se ha determinado que alguno de estos reguladores del transporte endocítico; como RAB7 entre otros, presentan menores niveles de expresión en el IBC, y esto puede estar relacionado con una menor degradación lisosomal de E-cad y por tanto, con su sobreexpresión (Ye *et al.*, 2010). Sin embargo, los autores consideramos que es necesario realizar más estudios donde se determine la expresión molecular de E-cad y los mecanismos de tráfico intracelulares tanto en IBC como IMC.

En cuanto a CADM1, los resultados demostraron que, tanto la transcripción del gen como la expresión de la proteína fueron mayores en los tumores IMC respecto a los tumores no-IMC, además de observarse una inmunotinción citoplasmática en ambos grupos (IMC y no-IMC). De forma similar a lo que ocurre con E-cad, una pérdida de la expresión de CADM1 en el

cáncer mamario se ha correlacionado con la invasión local y linfovascular, la promoción de la capacidad metastásica de las células tumorales y un mal pronóstico (Takahashi *et al.*, 2012, Wikman *et al.*, 2014, Saito *et al.*, 2018). Por lo tanto, esta sobreexpresión encontrada en los tumores IMC, sugiere que la expresión de CADM1 podría ser parte del “fenotipo inflamatorio” en el IMC. En el caso del IBC su expresión no ha sido estudiada.

En este estudio otras dos moléculas de adhesión, ICAM2 (del inglés, *Intracellular cell adhesion molecule*) y NrCAM (del inglés, *Neuronal cell adhesion molecule*), glicoproteínas transmembrana miembros de la familia de Igs, también se encontraron diferencialmente expresadas a nivel transcripcional; concretamente, en el caso de ICAM2 su expresión fue 2 veces menor en el IMC en comparación con el no-IMC, mientras que los niveles de expresión de NrCAM fueron 13 veces más altos en IMC.

Existen muy poca información acerca del papel de estas dos moléculas en el cáncer de mama. Concretamente, ICAM2, esta fundamentalmente expresada en las células endoteliales, plaquetas, y linfocitos y juega un papel fundamental en la recirculación y tráfico linfocítico en la respuesta inmune antigénica, así como en otras interacciones celulares importantes en la inmunovigilancia y respuesta inmunitaria (Sasaki *et al.*, 2016). Varios estudios han determinado que funciona como un supresor tumoral (Sasaki *et al.*, 2016). Específicamente, se ha demostrado que en la carcinogénesis pancreática temprana, esta molécula facilita una respuesta inmunitaria antitumoral, al inducir la infiltración de células mieloides dendríticas (del inglés, *Dendritic cells*, DCs) y con ello promover la

susceptibilidad de las células tumorales a la citólisis mediada por linfocitos T citotóxicos (Hiraoka *et al.*, 2011). Además, estudios *in vitro* e *in vivo*, han indicado que su interacción con varias proteínas de citoesqueleto como  $\alpha$ -actina disminuye la capacidad metastásica de las células tumorales de neuroblastoma (Feduska *et al.*, 2013, Feduska *et al.*, 2015). Finalmente, niveles bajos de expresión de la misma se han relacionado con la progresión y metástasis de neuroblastoma (Yoon *et al.*, 2008) y con la migración y capacidad invasiva de las células tumorales (Sasaki *et al.*, 2016).

En cuanto a NrCAM, esta glicoproteína inicialmente fue descubierta y ampliamente estudiada en el sistema nervioso central y periférico, donde tiene un papel en la guía y crecimiento axonal (Grumet *et al.*, 1991). Posteriormente su expresión ha sido identificada en varios tumores, como tumores de cerebro (Sehgal *et al.*, 1998), páncreas (Dhodapkar *et al.*, 2001), próstata (Tsourlakis *et al.*, 2013), colon y recto (Chan *et al.*, 2011) y el tumor papilar tiroideo (Zhang *et al.*, 2019). Además, se ha sugerido un posible papel en la formación de capilares de tipo vascular y la angiogénesis (Aitkenhead *et al.*, 2002) y un estudio *in vitro*, ha demostrado que el gen de NrCAM se encuentra sobreexpresado en tumores RE+ pero no en tumores RE- (Yu *et al.*, 2017).

Por tanto, el escaso número de estudios sobre estas últimas moléculas supone la necesidad de realizar más estudios centrados en el posible papel de estas tanto en el IBC e IMC, como en el cáncer de mama en general.

En conclusión, los hallazgos obtenidos en la presente Tesis Doctoral esclarecen numerosos aspectos hasta la fecha desconocidos acerca de tumores mamarios caninos poco prevalentes, al determinar el comportamiento biológico de los CSCMT y aportar información de utilidad para anatomopatólogos y clínicos para su correcto diagnóstico. Asimismo, abre nuevas incógnitas y ofrece la posibilidad de realizar futuras investigaciones necesarias para continuar con el estudio de los mecanismos involucrados en la biología celular del CI tanto en la especie canina como en la mujer, al establecer la posible influencia de las hormonas esteroides en la exacerbada angiogénesis característica del CI y al determinar el papel de diversas moléculas de adhesión en el “fenotipo inflamatorio” y posiblemente en la angiogénesis y linfangiogénesis tumoral. Asimismo, apoyan el valor del IMC canino como un buen modelo de estudio de la enfermedad en la mujer.



## **VII. CONCLUSIONES**

---



**Conclusión 1.** Los CSCMT malignos (del inglés, *Canine spindle cell mammary tumors*) son neoplasias mamarias poco frecuentes, de tamaño grande, y generalmente de baja agresividad, que deben ser evaluadas por medio del empleo de técnicas inmunohistoquímicas para poder determinar el histotipo y poder valorar su comportamiento clínico, ya que el diagnóstico tan solo mediante H&E, conlleva una gran proporción de errores diagnósticos. Para su correcto diagnóstico se recomienda el empleo de un panel de marcadores IHQ que incluya, AE1/AE3, p63 y CK-14. Asimismo, en aquellos casos negativos a los marcadores anteriormente mencionados pero con características histomorfológicas (H&E) compatibles con hemangiosarcoma, PNST y PWT, se recomienda el empleo de CD-31, SMA y GFAP. Además, es recomendable emplear la técnica Tricrómico de Masson de forma rutinaria antes de la realización de inmunohistoquímica, ya que es una técnica fácil y barata que orienta de forma clara el diagnóstico de fibrosarcoma o mioepitelioma maligno.

Asimismo, es recomendable determinar histológicamente el posible origen de los tumores CSCMT, considerar el tamaño tumoral, así como la presencia o ausencia de otros tumores mamarios, ya que son características importantes que se relacionan con la agresividad biológica de los tumores.

**Conclusión 2.** Las hormonas esteroideas están involucradas en la regulación de los diferentes factores angiogénicos y por ello, en el proceso de angiogénesis y progresión tumoral en el cáncer de mama. La medición intratumoral de estas y

de los factores angiogénicos en el compartimento donde son biológicamente activos proporciona una valiosa información sobre las características biológicas del tumor con el objetivo de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas preventivas y tratamientos individualizados para cada paciente. Además, considerando que el cáncer de mama en perros ocurre de manera espontánea y comparte características clínicas y fisiopatológicas con el cáncer de mama humano, este estudio aporta nuevos conocimientos para la realización de investigaciones futuras acerca del uso de los tratamientos anti-angiogénicos como terapias adyuvantes en esta especie.

**Conclusión 3.** De la misma manera que ocurre en el IBC, existe una asociación positiva entre la expresión de E-caderina y el “fenotipo inflamatorio” en el IMC. Además, CADM1 y otras moléculas de adhesión también están expresadas diferencialmente en el IMC, lo que sugiere que tienen un importante papel en la adhesión celular y la invasión en el “fenotipo inflamatorio”. Es necesario que tanto en el IBC como en el IMC se realicen más estudios que incluyan un mayor número de moléculas de adhesión con objeto de poder elucidar su posible papel en el proceso metastásico y en la angiogénesis tumoral en este tipo de neoplasia mamaria tan agresiva.

Todos estos hallazgos apoyan el valor del IMC canino como un buen modelo de estudio de la enfermedad en humana y además brindan una nueva perspectiva sobre esta neoplasia mamaria tan poco frecuente en la perra.

## VIII. CONCLUSIONS

---



**Conclusion 1.** Malignant CSCMT are infrequent, large-sized mammary tumors, generally with low aggressiveness. These tumors must be evaluated by immunohistochemistry to determine the histotype and to indicate their clinical behavior since the diagnosis only by HE involves many misdiagnoses. A panel of IHC markers for routine diagnosis of CSCMT is recommended, including AE1/AE3, p63 and CK-14. Those cases which are negative for these previous IHC markers but suspicious for hemangiosarcoma, PNST or PWT on HE-stained sections, the use of CD-31, SMA and GFAP is also recommended in the routine diagnostic setting. Moreover, Masson's Trichrome stain should be used routinely, prior to IHC, to help the definitive diagnosis, since it is an easy and cheap technique to discriminate between fibrosarcomas and malignant myoepithelioma.

Furthermore, it is recommended to histologically ensure the mammary origin of the neoplasm and to consider the tumor size and the presence or absence of other mammary tumors as important clinical features in relation with the histological malignancy.

**Conclusion 2.** Steroid hormones could regulate angiogenic factors to promote tumor progression and angiogenesis. The intratumoral measurement of steroid hormones and growth factors in the compartment where they are biologically active provides a valuable information on the biological characteristics of the tumor for developing new preventive therapeutic strategies and individualized treatments for each patient. Moreover, considering that mammary cancer in dogs

occurs spontaneously and shares clinical and pathophysiological characteristics with human cancers, this study provides new insights for further investigations for the use of these treatments as adjuvant therapy in this species.

**Conclusion 3.** For the first time, the expression of E-cadherin and CADM1 in canine IMC has been investigated, demonstrating that similar to IBC in humans, there is a positive association between E-cadherin expression and IMC phenotype. Moreover, CADM1 and other cell adhesion molecules were also differentially expressed in IMC cases suggesting their potential role in cell adhesion and invasiveness of the “inflammatory phenotype”. Further studies on a broad panel of cell adhesion molecules in both IBC and IMC are necessary to elucidate their role in the metastatic process and angiogenesis in this highly aggressive mammary cancer. Altogether, these findings support the value of canine IMC as a model for the study of the human disease and provide a new insight into this uncommon malignancy in dogs.

## **IX. BIBLIOGRAFÍA**

---



- Abadie, J., Nguyen, F., Loussouarn, D., Peña, L., Gama, A., Rieder, N., Belousov, A., Bemelmans, I., Jaillardon, L., Ibisch, C., Capone M. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 2: immunophenotypes and prognostic significance. 2018. *Breast Cancer Res Treat*, 67(2):459-68.
- Abdelmegeed, S. M., Mohammed, S. Canine mammary tumors as a model for human disease. 2018. *Oncol Lett*, 15(6):8195-205.
- Adly, L., Hill, D., Sherman, M., Sturgen, S.R., Fears, T.F., Mies C.R., Zielger, R.G., Hoover, R.N., Schairer, C. Serum concentrations of estrogens, sex hormone-binding globulin, and androgens and risk of breast cancer in postmenopausal women. 2006. *Int J Cancer*, 119(10):2402-7.
- Aitkenhead, M., Wang, S., Nakatsu, M., Mestas, J., Heard, C., Hughes, C. Identification of endothelial cell genes expressed in an in vitro model of angiogenesis: induction of ESM-1, (beta)ig-h3, and NrCAM. 2002. *Microvas Res*, 63(2):159-71.
- Al-Khalaf, H., Al-Harbi, B., Al-Sayed, A., Arafah, M., Tulbah, A., Jarman, A., Al-Mohanna, F., Aboussekhra, A. Interleukin-8 Activates Breast Cancer-Associated Adipocytes and Promotes Their Angiogenesis- and Tumorigenesis-Promoting Effects. 2019. *Mol Cell Biol* 39(2):e00332-18.
- Allinen, M., Peri, L., Kujala, S., Lahti-Domenici, J., Outila, K., Karppinen, S., Launonen, V., Winqvist, R. Analysis of 11q21-24 loss of heterozygosity candidate target genes in breast cancer: indications of TSLC1 promoter hypermethylation. 2002. *Genes chromosomes cancer*, 34(4):384-9.

- Alpaugh, M., Tomlinson, J., Shao, Z., Barsky, S. A novel human xenograft model of inflammatory breast cancer. 1999. *Cancer Res*, 59(20):5079-84.
- Alpaugh, M., Tomlinson, J., Ye, Y., Barsky, S. Relationship of sialyl-Lewis(x/a) underexpression and E-cadherin overexpression in the lymphovascular embolus of inflammatory breast carcinoma. 2002. *Am J Pathol*, (2):619-28.
- Anderson, W. F., Schairer, C., Chen, B. E., Hance, K. W., Levine, P. H. Epidemiology of inflammatory breast cancer (IBC). 2005. *Breast Dis*, 22:9-23.
- Anura, A., Das, R., Pal, M., Paul, R., Ray, A., Chatterjee, J. Correlated analysis of semi-quantitative immunohistochemical features of E-cadherin, VEGF and CD105 in assessing malignant potentiality of oral submucous fibrosis. 2014. *Pathol Res Pract*, 210(12):1054-63.
- Arias-Pulido, H., Chaher, N., Gong, Y., Qualls, C., Vargas, J., Royce, M. Tumor stromal vascular endothelial growth factor A is predictive of poor outcome in inflammatory breast cancer. 2012. *BMC cancer*,12:298.
- Avallone, G., Helmbold, P., Caniatti, M., Stefanello, D., Nayak, R., Roccabianca, P. The spectrum of canine cutaneous perivascular wall tumors: morphologic, phenotypic and clinical characterization. 2007. *Vet Pathol*, 44(5):607-20.
- Baba, O. K., Sood, N. K., Gupta, K. Clinical Evaluation of Glycoproteins and Inflammatory Cytokines in the Serum of Dogs Affected with Canine Mammary Cancer. 2019. *Proc Natl Acad Sci, India Section B Biol Sci*, 89:1465-9.

- Bachelder, R., Crago, A., Chung, J., Wendt, M., Shaw, L., Robinson, G., Mercurio, A. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. 2001. *Cancer Res*, 61 (15):5736-40.
- Badowska-Kozakiewicz, A., Patera, J., Sobol, M., Przybylski, J. The role of oestrogen and progesterone receptors in breast cancer - immunohistochemical evaluation of oestrogen and progesterone receptor expression in invasive breast cancer in women. 2015. *Contemp Oncol (Pozn)*, 19(3):220-5.
- Baglietto, L., Severi, G., English, D., Krishnan, K., Hopper, J., McLean, C., Morris, H., Tilley, W., Giles, G.G. Circulating steroid hormone levels and risk of breast cancer for postmenopausal women. 2010. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 19(2):492-502.
- Banerjee, S., Zvelebil, M., Furet, P., Mueller-Vieira, U., Evans, D., Dowsett, M., Martin, L. The vascular endothelial growth factor receptor inhibitor. 2009. *Cancer Res*, 69(11):4716-23.
- Barreno, L., Cáceres, S., Alonso-Diez, Á., Vicente-Montaña, A., García, M. L., Clemente, M., Illera, J. C., Peña, L. Vasculogenic mimicry-associated ultrastructural findings in human and canine inflammatory breast cancer cell lines. 2019. *BMC Cancer*, 19(1):750.

- Basu, G., Pathangey, L., Tinder, T., Gendler, S., Mukherjee, P. Mechanisms underlying the growth inhibitory effects of the cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib in human breast cancer cells. 2005. *Breast cancer*, 7(4):R422.
- Bates, R., Goldsmith, J., Bachelder, R., Brown, C., Shibuya, M., Oettgen, P., Mercurio, A. Flt-1-dependent survival characterizes the epithelial-mesenchymal transition of colonic organoids. 2003. *Curr Biol*, 13(19):1721-7.
- Beha, G., Sarli, G., Brunetti, B., Sassi, F., Ferrara, D., Benazzi, C. Morphology of the myoepithelial cell: immunohistochemical characterization from resting to motile phase. 2012. *ScientificWorldJournal*, 2012:252034.
- Bendardaf, R., Sharif-Askari, F., Sharif-Askari, N., Syrjänen, K., Pyrhönen, S. Cytoplasmic E-Cadherin Expression Is Associated With Higher Tumour Level of VEGFA, Lower Response Rate to Irinotecan-based Treatment and Poorer Prognosis in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. 2019. *Anticancer Res*, 39(4):1953-57.
- Bertolo, C., Guerrero, D., Vicente, F., Cordoba, A., Esteller, M., Ropero, S., Guillen-Grima, F., Martinez-Peñuela, J., Lera, J. Differences and molecular immunohistochemical parameters in the subtypes of infiltrating ductal breast cancer. 2008. *Am J Clin Pathol*, 130(3):414-24.
- Berx, G., Van Roy, F. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. 2001. *Breast Cancer Res*, 3(5):289-93.

- Bièche, I., Lerebours, F., Tozlu, S., Espie, M., Marty, M., Lidereau, R. Molecular profiling of inflammatory breast cancer: identification of a poor-prognosis gene expression signature. 2004. *Clin Cancer Res*, 10(20):6789-95.
- Bocca, C., Ievolella, M., Autelli, R., Motta, M., Mosso, L., Torchio, B., Bozzo, F., Cannito, S., Paternostro, C., Colombatto, S., *et al.* Expression of Cox-2 in human breast cancer cells as a critical determinant of epithelial-to-mesenchymal transition and invasiveness. 2014. *Expert opinion on therapeutic targets*, 18(2):121-35.
- Böcker, W., Moll, R., Poremba, C., Holland, R., Van Diest, P., Dervan, P., Bürger, H., Wai, D., Ina Diallo, R., Brandt, B., *et al.* Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. 2002. *Lab Invest*, 82(6):737-46.
- Boecker, W., Buerger, H. Evidence of progenitor cells of glandular and myoepithelial cell lineages in the human adult female breast epithelium: a new progenitor (adult stem) cell concept. 2003. *Cell prolifer*, 36 Suppl 1 (Suppl 1):73-84.
- Borowsky, A. Genetically engineering a mouse. 2003. *Comp Med*, 53 (3):249-50.
- Botelho, M., Soares, R., Alves, H. Progesterone in Breast Cancer Angiogenesis. 2015. *SM J Repro Health Infertil*, 1(1):1001.
- Brown, S., Hankinson, S. Endogenous estrogens and the risk of breast, endometrial, and ovarian cancers. 2015. *Steroids*, 99(Pt A):8-10.

- Brueggemeier, R., Quinn, A., Parrett, M., Joarder, F., Harris, R., Robertson, F. Correlation of aromatase and cyclooxygenase gene expression in human breast cancer specimens. 1999. *Cancer Lett*, 140(1-2):27-35.
- Brunetti, B., Sarli, G., Preziosi, R., Leprotti, S., Benazzi, C. E-cadherin expression in canine mammary carcinomas with regional lymph node metastases. 2003. *J Vet Med A Physiol Pathol Clinl Med*, 50(10):496-500.
- Brüser, L., Bogdan, S. Adherens Junctions on the Move-Membrane Trafficking of E-Cadherin. 2017. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9(3):a029140.
- Bryant, D. M., Stow, J. L. The ins and outs of E-cadherin trafficking. 2004. *Trends Cell Biol*, 14(8):427-34.
- Bukholm, I., Nesland, J., Kåresen, R., Jacobsen, U., Børresen-Dale, A. E-cadherin and alpha-, beta-, and gamma-catenin protein expression in relation to metastasis in human breast carcinoma. 1998. *J Pathol*, 185(3):262-6.
- Caceres, S., Monsalve, B., Peña, L., de Andres, P., Alonso-Diez, A., Illera, M., Woodward, W., Reuben, J., Silvan, G, Illera, J. In vitro and in vivo effect of flutamide on steroid hormone secretion in canine and human inflammatory breast cancer cell lines. 2018. *Vet Comp Oncol*, 16 (1):148-58.
- Caceres, S., Peña, L., Lacerda, L., Illera, M., de Andres, P., Larson, R., Gao, H., Debeb, B., Woodward, W., Reuben, J., *et al.* Canine cell line, IPC-366, as a good model for the study of inflammatory breast cancer. 2017. *Vet Comp Oncol*, 15 (3):980-95.

- Caceres, S., Peña, L., Silvan, G., Illera, M. J., Woodward, W. A., Reuben, J. M., Illera, J. C. Steroid Tumor Environment in Male and Female Mice Model of Canine and Human Inflammatory Breast Cancer. 2016. *Biomed Res Int*, 2016:8909878.
- Caceres, S., Pena, L., de Andres, P. J., Illera, M. J., Lopez, M. S., Woodward, W. A., Reuben, J. M., Illera, J. C. Establishment and characterization of a new cell line of canine inflammatory mammary cancer: IPC-366. 2015. *PLoS One* 10(3):e0122277.
- Camacho, L., Peña, L., Gil, A. G., Martín-Ruiz, A., Dunner, S., Illera, J. C. Immunohistochemical Vascular Factor Expression in Canine Inflammatory Mammary Carcinoma. 2013a. *Vet Pathol*, 51(4):737-48.
- Camacho, L., Peña, L., González Gil, A., Cáceres, S., Díez, L., Illera, J. Establishment and characterization of a canine xenograft model of inflammatory mammary carcinoma. 2013b. *Res Vet Sci*, 95(3):1068-75.
- Canadas, A., França, M., Pereira, C., Vilaça, R., Vilhena, H., Tinoco, F., Silva, M., Ribeiro, J., Medeiros, R., Oliveira, P., *et al.* Canine Mammary Tumors: Comparison of Classification and Grading Methods in a Survival Study. 2019a. *Vet Pathol*, 56(2):208-19.
- Canadas, A., Santos, M., Medeiros, R., Dias-Pereira, P. Influence of E-cadherin genetic variation in canine mammary tumour risk, clinicopathological features and prognosis. 2019b. *Vet Comp Oncol*, 17(4):489-96.

- Capper, C. P., Rae, J. M., Auchus, R. J. The Metabolism, Analysis, and Targeting of Steroid Hormones in Breast and Prostate Cancer. 2016. *Horm Cancer*, 7(3):149-64.
- Cavallaro, U., Christofori, G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. 2004. *Nat Rev Cancer*, 4(2):118-32.
- Chan, J., Ong, C., Salto-Tellez, M. Overexpression of neurone glial-related cell adhesion molecule is an independent predictor of poor prognosis in advanced colorectal cancer. 2011. *Cancer Sci*, 102(10):1855-61.
- Chang, C., Chiou, P., Chen, W., Li, Y., Yiu, J., Cheng, Y., Chen, S., Lin, C., Lai, Y. Assessment of the tumorigenesis and drug susceptibility of three new canine mammary tumor cell lines. 2010. *Res Vet Sci*, 88(2):285-93.
- Chen, M., Yang, Y., Xu, K., Li, L., Huang, J., Qiu, F. Androgen Receptor in Breast Cancer: From Bench to Bedside. 2020. *Frony Endocrinol (Lausanne)*, 11:573.
- Chen, J., Yao, P., Yuan, A., Hong, T., Shun, C., Kuo, M., Lee, Y., Yang, P. Up-regulation of tumor interleukin-8 expression by infiltrating macrophages: its correlation with tumor angiogenesis and patient survival in non-small cell lung cancer. 2003. *Clin cancer Res*, 9(2):729-37.
- Clarke, J., Hurwitz, H. Understanding and targeting resistance to anti-angiogenic therapies. 2013. *J Gastrointest Oncol*, 4(3):253-63.
- Clemente, M., De Andrés, P., Peña, L., Pérez-Alenza, M. Survival time of dogs with inflammatory mammary cancer treated with palliative therapy alone or palliative therapy plus chemotherapy. 2009. *Vet Red*, 165(3):78-81.

- Clemente, M., Pérez-Alenza, M., Peña, L. Metastasis of canine inflammatory versus non-inflammatory mammary tumours. 2010a. *J Comp Pathol*, 143(2-3):157-63.
- Clemente, M., Perez-Alenza, M. D., Illera, J. C., Peña, L. Histological, immunohistological, and ultrastructural description of vasculogenic mimicry in canine mammary cancer. 2010b. *Vet Pathol*, 47(2):265-74.
- Clemente, M., Sánchez-Archidona, A., Sardón, D., Díez, L., Martín-Ruiz, A., Caceres, S., Sassi, F., Dolores Pérez-Alenza, M., Illera, J., Dunner, S., *et al.* Different role of COX-2 and angiogenesis in canine inflammatory and non-inflammatory mammary cancer. 2013. *Vet J*, 197(2):427-32.
- Colpaert, C. G., Vermeulen, P. B., Benoy, I., Soubry, A., Van Roy, F., Van Beest, P., Goovaerts, G., Dirix, L. Y., Van Dam, P., Fox, S. B., *et al.* Inflammatory breast cancer shows angiogenesis with high endothelial proliferation rate and strong E-cadherin expression. 2003. *Br J Cancer*, 88(5):718-25.
- Costa, C., Soares, R., Reis-Filho, J. S., Leitão, D., Amendoeira, I., Schmitt, F. C. Cyclo-oxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. 2002. *J Clin Pathol*, 55(6):429-34.
- Cristofanilli, M., Valero, V., Buzdar, A., Kau, S., Broglio, K., Gonzalez-Angulo, A., Sneige, N., Islam, R., Ueno, N., Buchholz, T., *et al.* Inflammatory breast cancer (IBC) and patterns of recurrence: understanding the biology of a unique disease. 2007. *Cancer*, 110(7):1436-44.

- Dabrosin, C., Margetts, P., Gauldie, J. Estradiol increases extracellular levels of vascular endothelial growth factor in vivo in murine mammary cancer. 2003. *Int J Cancer*, 107(4):535-40.
- Dabrosin, C. Positive correlation between estradiol and vascular endothelial growth factor but not fibroblast growth factor-2 in normal human breast tissue in vivo. 2005. *Clin Cancer Res*, 11(22):8036-41.
- Dawood, S., Ueno, N. T., Valero, V., Woodward, W. A., Buchholz, T. A., Hortobagyi, G. N., Gonzalez-Angulo, A. M., Cristofanilli, M. Differences in survival among women with stage III inflammatory and noninflammatory locally advanced breast cancer appear early: a large population-based study. 2011. *Cancer*, 117(9):1819-26.
- De Andrés, P., Illera, J., Cáceres, S., Díez, L., Pérez-Alenza, M., Peña, L. Increased levels of interleukins 8 and 10 as findings of canine inflammatory mammary cancer. 2013. *Vet Immunol Immunopathol*, 152(3-4):245-51.
- De Jong, M., Maina, T. Of mice and humans: are they the same?--Implications in cancer translational research. 2010. *J Nucl Med*, 51(4):501-4.
- De M Souza, C., Toledo-Piza, E., Amorin, R., Barboza, A., Tobias, K. Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment. 2009. *Can Vet J*, 50(5):506-10.
- Dennis, M., McSporran, K., Bacon, N., Schulman, F., Foster, R., Powers, B. Prognostic factors for cutaneous and subcutaneous soft tissue sarcomas in dogs. 2011. *Vet Pathol*, 48(1):73-84.

- Destexhe, E., Lespagnard, L., Degeyter, M., Heymann, R., Coignoul, F. Immunohistochemical identification of myoepithelial, epithelial, and connective tissue cells in canine mammary tumors. 1993. *Vet Pathol*, 30(2):146-54.
- Dhodapkar, K., Friedlander, D., Scholes, J., Grumet, M. Differential expression of the cell-adhesion molecule Nr-CAM in hyperplastic and neoplastic human pancreatic tissue. 2001. *Hum Pathol*, 32(4):396-400.
- Dias Pereira, P., Gärtner, F. Expression of E-cadherin in normal, hyperplastic and neoplastic feline mammary tissue. 2003. *Vet Rec*, 153(10):297-302.
- Dobrolecki, L. E., Airhart, S. D., Alferez, D. G., Aparicio, S., Behbod, F., Bentires-Alj, M., Brisken, C., Bult, C. J., Cai, S., Clarke, R. B., et al. Patient-derived Xenograft (PDX) Models In Basic and Translational Breast Cancer Research. 2016. *Cancer Metastasis Rev*, 35(4):547-73.
- Dohadwala, M., Yang, S., Luo, J., Sharma, S., Batra, R., Huang, M., Lin, Y., Goodglick, L., Krysan, K., Fishbein, M., et al. Cyclooxygenase-2-dependent regulation of E-cadherin: prostaglandin E(2) induces transcriptional repressors ZEB1 and snail in non-small cell lung cancer. 2006. *Cancer research*, 66(10):5338-45.
- Dolka, I., Sapieryński, R., Król, M. Retrospective study and immunohistochemical analysis of canine mammary sarcomas. 2013. *BMC Vet Res*, 9:248.

- Dowsett, M., Houghton, J., Iden, C., Salter, J., Farndon, J., A'Hern, R., Sainsbury, R., Baum, M. Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according oestrogen receptor, progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status. 2006. *Ann Oncol*, 17(5):818-26.
- Easwaran, V., Lee, S., Inge, L., Guo, L., Goldbeck, C., Garrett, E., Wiesmann, M., Garcia, P., Fuller, J., Chan, V., *et al.* beta-Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer. 2003. *Cancer Res*, 63(12):3145-53.
- Ebos, J. M., Kerbel, R. S. Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis. 2011. *Nat Rev Clin Oncol*, 8(4):210-21.
- Eibl, G., Takata, Y., Boros, L., Liu, J., Okada, Y., Reber, H., Hines, O. Growth stimulation of COX-2-negative pancreatic cancer by a selective COX-2 inhibitor. 2005. *Cancer research*, 65(3):982-90.
- Else, R. W., Norval, M., Neill, W. A. The characteristics of a canine mammary carcinoma cell line, REM 134. 1982. *Br J Cancer*, 46(4):675-81.
- Emlet, D., Brown, K., Kociban, D., Pollice, A., Smith, C., Ong, B., Shackney, S. Response to trastuzumab, erlotinib, and bevacizumab, alone and in combination, is correlated with the level of human epidermal growth factor receptor-2 expression in human breast cancer cell lines. 2007. *Mol Cancer Ther*, 6(10):2664-74.
- Erdem, H., Gündođdu, C., Sipal, S. Correlation of E-cadherin, VEGF, COX-2 expression to prognostic parameters in papillary thyroid carcinoma. 2011. *Exp Mod Pathol*, 90(3):312-7.

- Espinosa Los de Monteros, A., Millán, M., Ordás, J., Carrasco, L., Reymundo, C., Martín Las de Mulas, J. Immunolocalization of the smooth muscle-specific protein calponin in complex and mixed tumors of the mammary gland of the dog: assessment of the morphogenetic role of the myoepithelium. 2002. *Vet Pathol*, 39(2):247-56.
- Faraji, F., Pang, Y., Walker, R., Nieves Borges, R., Yang, L., Hunter, K. Cadm1 is a metastasis susceptibility gene that suppresses metastasis by modifying tumor interaction with the cell-mediated immunity. 2012. *PLoS Genet*, 8(9):e1002926.
- Fayanju, O., Ren, Y., Greenup, R., Plichta, J., Rosenberger, L., Force, J., Suneja, G., Devi, G., King, T., Nakhlis, F., *et al.* Extent of axillary surgery in inflammatory breast cancer: a survival analysis of 3500 patients. 2020. *Breast Cancer Res Treat*, 180(1):207-17.
- Feduska, J. M., Garcia, P. L., Brennan, S. B., Bu, S., Council, L. N., Yoon, K. J. N-glycosylation of ICAM-2 is required for ICAM-2-mediated complete suppression of metastatic potential of SK-N-AS neuroblastoma cells. 2013. *BMC Cancer*,13: 261.
- Feduska, J. M., Aller, S. G., Garcia, P. L., Cramer, S. L., Council, L. N., Van Waardenburg, R. C., Yoon, K. J. ICAM-2 confers a non-metastatic phenotype in neuroblastoma cells by interaction with  $\alpha$ -actinin. 2015. *Oncogene*, 34(12):1553-62.

- Ferrara, N., Hillan, K., Gerbe, P. H., Novotny, W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. 2004. *Nat Rev Drug Discov*, 3(5):391-400.
- Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. 1971. *N Engl J Med*, 285(21):1182-6.
- Fouad, T., Barrera, A., Reuben, J., Lucci, A., Woodward, W., Stauder, M., Lim, B., SM., D., Arun, B., Gildy, B., *et al.* Inflammatory breast cancer: a proposed conceptual shift in the UICC-AJCC TNM staging system. 2017. *Lancet Oncol*, 18(4):e228-32.
- Francescone, R., Faibish, M., Shao, R. A. Matrigel-based tube formation assay to assess the vasculogenic activity of tumor cells. 2011. *J Vis Exp*, (55):3040.
- Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M., Zechner, D., Leddy, H., Behrens, J., Sommer, T., Birchmeier, W. Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. 2002. *Nat Cell Biol*, 4(3):222-31.
- Gama, A., Alves, A., Gartner, F., Schmitt, F. p63: a novel myoepithelial cell marker in canine mammary tissues. 2003. *Vet Pathol*, 40(4):412-20.
- Gama, A., Alves, A., Schmitt, F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. 2008a. *Virchows Arch*, 453(2):123-32.

- Gama, A., Paredes, J., Gartner, F., Alves, A., Schmitt, F. Expression of E-cadherin, P-cadherin and beta-catenin in canine malignant mammary tumours in relation to clinicopathological parameters, proliferation and survival. 2008b. *Vet J*, 177(1):45-53.
- Garvin, S., Nilsson, U., Dabrosin, C. Effects of oestradiol and tamoxifen on VEGF, soluble VEGFR-1, and VEGFR-2 in breast cancer and endothelial cells. 2005. *Br J Cancer*, 93(9):1005-10.
- Gelaleti, G., Jardim, B., Leonel, C., Moschetta, M., Zuccari, D. Interleukin-8 as a prognostic serum marker in canine mammary gland neoplasias. 2012. *Vet Immunol Immunopathol*, 146(2):106-12.
- Gentshev, I., Stritzker, J., Hofmann, E., Weibel, S., Yu, Y., Chen, N., Zhang, Q., Bullerdiek, J., Nolte, I., Szalay, A. Use of an oncolytic vaccinia virus for the treatment of canine breast cancer in nude mice: preclinical development of a therapeutic agent. 2009. *Cancer Gene Ther*, 16(4):320-8.
- Gerratana, L., Basile, D., Buono, G., De Placido, S., Giuliano, M., Minichillo, S., Coinu, A., Martorana, F., De Santo, I., Del Mastro, L., *et al.* Androgen receptor in triple negative breast cancer: A potential target for the targetless subtype. 2018. *Cancer Treat Rev*, 68:102-10.
- Gey, G. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. 1952. *Cancer Res.*, 12:264-5.
- Ghoncheh, M., Pournamdar, Z., Salehiniya, H. Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World. 2016. *Asian Pac J Cancer Prev*, 17(S3):43-6.

- Gillett, C., Miles, D., Ryder, K., Skilton, D., Liebman, R., Springall, R., Barnes, D., Hanby, A. Retention of the expression of E-cadherin and catenins is associated with shorter survival in grade III ductal carcinoma of the breast. 2001. *J Pathol*, 193(4):433-41.
- Giordano, S., Hortobagyi, G. Inflammatory breast cancer: clinical progress and the main problems that must be addressed. 2003. *Breast Cancer Res*, 5(6):284-8.
- Giovannelli, P., Di Donato, M., Galasso, G., Di Zazzo, E., Bilancio, A., Migliaccio, A. The Androgen Receptor in Breast Cancer. 2018. *Front Endocrinol*, 9:492.
- Goldschmidt, M., Peña, L., Rasotto, R., Zappulli, V. Classification and grading of canine mammary tumors. 2011. *Vet Pathol*, 48(1):117-31.
- Goldschmidt, M. H., Peña, L., Zappulli, V. Tumors of the Mammary Gland. In *Tumors in Domestic Animals*, 2017. ed. D. J. Meuten, 723-765. John Wiley & Sons, Inc.
- Gong, Y., Wei, W., Wu, Y., Ueno, N., Huo, L. Expression of androgen receptor in inflammatory breast cancer and its clinical relevance. 2014. *Cancer*, 120(12):1775-9.
- Gordon, I., Paoloni, M., Mazcko, C., Khanna, C. The Comparative Oncology Trials Consortium: using spontaneously occurring cancers in dogs to inform the cancer drug development pathway. 2009. *PLoS Med*, 6(10):e1000161.

- Grailer, J., Steeber, D. Vascular endothelial growth factor receptor inhibitor SU5416 suppresses lymphocyte generation and immune responses in mice by increasing plasma corticosterone. 2013. *PloS One*, 8(9):e75390.
- Gray, M., Meehan, J., Martínez-Pérez, C., Kay, C., Turnbull, A. K., Morrison, L. R., Pang, L. Y., Argyle, D. Naturally-Occurring Canine Mammary Tumors as a Translational Model for Human Breast Cancer. 2020. *Front Oncol*, 10:617.
- Grumet, M., Mauro, V., Burgoon, M. P., Edelman, G. M., Cunningham, B. A. Structure of a new nervous system glycoprotein, Nr-CAM, and its relationship to subgroups of neural cell adhesion molecules. 1991. *J Cell Biol*, 113(6):1399-412.
- Gui, X., Li, H., Song, G., Shao, B., Jiang, H. Long term use of bevacizumab in the treatment of triple negative breast cancer with giant tumor in chest wall: A case report. 2018. *Medicine (Baltimore)*, 97(48):e13410.
- Gupta, P., Kuperwasser, C. Contributions of estrogen to ER-negative breast tumor growth. 2006. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 102(1-5):71-8.
- Haddad, J. The immunopharmacologic potential of Semaxanib and new generation directed therapeutic drugs: Receptor tyrosine kinase regulation with anti-tumorigenesis/angiogenesis properties. 2012. *Saudi Pharm J*, 20(2):103-23.
- Hanahan, D., Weinberg, R. Hallmarks of cancer: the next generation. 2011. *Cell*, 144(5):646-74.

- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., Cardoso, F. Breast cancer. 2019. *Nat Rev Dis Primers*, 5(1):66.
- Harmey, J., Bouchier-Hayes, D. Vascular endothelial growth factor (VEGF), a survival factor for tumour cells: implications for anti-angiogenic therapy. 2002. *Bioessays*, 24(3):280-3.
- Harris, R. E., Casto, B. C., Harris, Z. M. Cyclooxygenase-2 and the inflammogenesis of breast cancer. 2014. *World J Clin Oncol*, 5(4):677-92.
- Heller, G., Geradts, J., Ziegler, B., Newsham, I., Filipits, M., Markis-Ritzinger, E., Kandioler, D., Berger, W., Stiglbauer, W., Depisch, D., et al. Downregulation of TSLC1 and DAL-1 expression occurs frequently in breast cancer. 2007. *Breast Cancer Res Treat*, 103(3):283-91.
- Hellmén, E. Characterization of four in vitro established canine mammary carcinoma and one atypical benign mixed tumor cell lines. 1992. *In Vitro Cell Dev Biol*, 28A(5): 309-19.
- Hellmén, E., Bergström, R., Holmberg, L., Spångberg, I., Hansson, K., Lindgren, A. Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. 1993. *Vet Pathol*, 30(1):20-7.
- Hellmén, E., Moller, M., Blankenstein, M., Andersson, L., Westermark, B. Expression of different phenotypes in cell lines from canine mammary spindle-cell tumours and osteosarcomas indicating a pluripotent mammary stem cell origin. 2000. *Breast Cancer Res Treat*, 61(3):197-210.

- Higgins, B., Kolinsky, K., Linn, M., Adames, V., Zhang, Y. E., Moisa, C., Dugan, U., Heimbrook, D., Packman, K. Antitumor activity of capecitabine and bevacizumab combination in a human estrogen receptor-negative breast adenocarcinoma xenograft model. 2007. *Anticancer Res*, 27(4B):2279-87.
- Hilborn, E., Stål, O., Jansson, A. Estrogen and androgen-converting enzymes 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and their involvement in cancer: with a special focus on 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, 2, and breast cancer. 2017. *Oncotarget*, 8(18):30552-62.
- Hiraoka, N., Yamazaki-Itoh, R., Ino, Y., Mizuguchi, Y., Yamada, T., Hirohashi, S., Kanai, Y. CXCL17 and ICAM2 are associated with a potential anti-tumor immune response in early intraepithelial stages of human pancreatic carcinogenesis. 2011. *Gastroenterology*, 140(1):310-21.
- Hoffmeyer, M. R., Wall, K. M., Dharmawardhane, S. F. In vitro analysis of the invasive phenotype of SUM149, an inflammatory breast cancer cell line. 2005. *Cancer Cell Int*, 5(1)11.
- Holen, I., Speirs, V., Morrissey, B., Blyth, K. In vivo models in breast cancer research: progress, challenges and future directions. 2017. *Dis Model Mech*, 10(4):359-71.
- Holliday, D., Speirs, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. 2011. *Breast Cancer Res*, 13(4):215
- Howard, E., Lau, S., Lyles, R., Birdsong, G., Umbreit, J., Kochhar, R. Expression of e-cadherin in high-risk breast cancer. 2005. *J Cancer Res Clin Oncol*, 131(1):14-8.

- Hsiao, Y., Hsieh, T., Liou, C., Cheng, Y., Lin, C., Chang, C., Lai, Y. Characterization of protein marker expression, tumorigenicity, and doxorubicin chemoresistance in two new canine mammary tumor cell lines. 2014. *BMC Vet Res*, 10:229.
- Hughes, E. D., Saunders, T. L. Gene Targeting in Embryonic Stem Cells. En *Advanced Protocols for Animal Transgenesis: An ISTT Manual*, 2011. eds. S. Pease & T. L. Saunders, 291-325. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Hyder, S., Chiappetta, C., Stancel, G. Pharmacological and endogenous progestins induce vascular endothelial growth factor expression in human breast cancer cells. 2001. *Int J Cancer*, 92(4):469-73.
- Hyder, S. Sex-steroid regulation of vascular endothelial growth factor in breast cancer. 2006. *Endocr Relat Cancer*, 13(3):667-87.
- Il'yasova, D., Siamakpour-Reihani, S., Akushevich, I., Akushevich, L., Spector, N., Schildkraut, J. What can we learn from the age- and race/ethnicity-specific rates of inflammatory breast carcinoma? 2011. *Breast Cancer Res Treat*, 130(2):691-7.
- Illera, J., Pérez-Alenza, M., Nieto, A., Jiménez, M., Silvan, G., Dunner, S., Peña, L. Steroids and receptors in canine mammary cancer. 2006. *Steroids*, 71(7):541-8.
- Im, K., Kim, N., Lim, H., Kim, H., Shin, J., Sur, J. Analysis of a new histological and molecular-based classification of canine mammary neoplasia. 2014. *Vet Pathol*, 51(3):549-59.

- Jain, R., Booth, M. What brings pericytes to tumor vessels? 2003. *J Clin Invest*, 112(8):1134-6.
- Janiszewska, M., Primi, M., Izard, T. Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. 2020. *J Biol Chem*, 295(8):2495-505.
- Jeong, S. J., Lee, K. H., Nam, A. R., Cho, J. Y. Genome-Wide Methylation Profiling in Canine Mammary Tumor Reveals miRNA Candidates Associated with Human Breast Cancer. 2019. *Cancers (Basel)*, 11(10):1466.
- Jerry, D., Kittrell, F., Kuperwasser, C., Laucirica, R., Dickinson, E., Bonilla, P., Butel, J., Medina, D. A mammary-specific model demonstrates the role of the p53 tumor suppressor gene in tumor development. 2000. *Oncogene*, 19(8):1052-8.
- Kaszak, I., Ruszczak, A., Kanafa, S., Kacprzak, K., Król, M., Jurka, P. Current biomarkers of canine mammary tumors. 2018. *Acta Vet Scand*, 60(1):66.
- Kawabata, A., Yamamoto, K., Lan, N., Uchida, K., Yamaguchi, R., Hayashi, T., Tateyama, S. Establishment and characterization of a cell line, MCO-Y4, derived from canine mammary gland osteosarcoma. 2006. *J Vet Med Sci*, 68(10):1047-53.
- Kim, J., Im, K., Kim, N., Chon, S., Doster, A., Sur, J. Inflammatory mammary carcinoma with metastasis to the brain and distant organs in a spayed Shih Tzu dog. 2011. *J Vet Diagn Invest*, 23(5):1079-82.
- Kim, N., Lim, H., Im, K., Shin, J., Kim, H., Sur, J. Evaluation of clinicopathological characteristics and oestrogen receptor gene expression in oestrogen

- receptor-negative, progesterone receptor-positive canine mammary carcinomas. 2014. *J Comp Pathol*, 151(1):42-50.
- Kleer, C. G., van Golen, K. L., Merajver, S. D. Molecular biology of breast cancer metastasis. Inflammatory breast cancer: clinical syndrome and molecular determinants. 2000. *Breast Cancer Res*, 2(6):423-9.
- Kleer, C. G., Van Golen, K. L., Braun, T., Merajver, S. D. Persistent E-cadherin expression in inflammatory breast cancer. 2001. *Mod Pathol*, 14(5):458-64.
- Kotsopoulos, J., Narod, S. Androgens and breast cancer. 2012. *Steroids*, 77(1-2):1-9.
- Kovács, A., Dhillon, J., Walker, R. A. Expression of P-cadherin, but not E-cadherin or N-cadherin, relates to pathological and functional differentiation of breast carcinomas. 2003. *Mol Pathol*, 56(6):318-22.
- Kristensen, V., Borresen-Dale, A. Molecular epidemiology of breast cancer: genetic variation in steroid hormone metabolism. 2000. *Mut Res*, 462(2-3):323-33.
- Kristiansen, V., Peña, L., Díez Córdova, L., Illera, J., Skjerve, E., Breen, A., Cofone, M., Langeland, M., Teige, J., Goldschmidt, M., *et al.* Effect of Ovariohysterectomy at the Time of Tumor Removal in Dogs with Mammary Carcinomas: A Randomized Controlled Trial. 2016. *J Vet Intern Med*, 30(1):230-41.
- Kuczynski, E., Vermeulen, P., Pezzella, F., Kerbel, R., Reynolds, A. Vessel co-option in cancer. 2019. *Nat Rev Clin Oncol*, 16(8):469-93.

- Kurebayashi, J., Otsuki, T., Kunisue, H., Mikami, Y., Tanaka, K., Yamamoto, S., Sonoo, H. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) family members in breast cancer. 1999. *Jpn J Cancer Res*, 90(9):977-81.
- Lacroix, M., Leclercq, G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. 2004. *Breast Cancer Res Treat*, 83(3):249-89.
- Lansink, M., Koolwijk, P., Van Hinsbergh, V., Kooistra, T. Effect of steroid hormones and retinoids on the formation of capillary-like tubular structures of human microvascular endothelial cells in fibrin matrices is related to urokinase expression. 1998. *Blood*, 92(3):927-38.
- Lee, K.-H., Park, H.-M., Son, K.-H., Shin, T.-J., Cho, J.-Y. Transcriptome Signatures of Canine Mammary Gland Tumors and Its Comparison to Human Breast Cancers. 2018. *Cancers (Basel)*, 10(9):317.
- Li, A., Varney, M., Valasek, J., Godfrey, M., Dave, B., Singh, R. Autocrine role of interleukin-8 in induction of endothelial cell proliferation, survival, migration and MMP-2 production and angiogenesis. 2005. *Angiogenesis*, 8(1):63-71.
- Li, J., Hao, Q., Cao, W., Vadgama, J., Wu, Y. Celecoxib in breast cancer prevention and therapy. 2018. *Cancer Manag Res*, 10:4653-67.
- Li, Q., Yan, H., Zhao, P., Yang, Y., Cao, B. Efficacy and Safety of Bevacizumab Combined with Chemotherapy for Managing Metastatic Breast Cancer: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. 2015. *Sci Rep*, 5:15746.

- Liang, Y., Wu, J., Stancel, G., Hyder, S. p53-dependent inhibition of progestin-induced VEGF expression in human breast cancer cells. 2005. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 93(2-5):173-82.
- Liao, T., Yang, M. Revisiting epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: the connection between epithelial plasticity and stemness. 2017. *Mol Oncol*, 11(7):792-804.
- Lim, B., Woodward, W. A., Wang, X., Reuben, J. M., Ueno, N. T. Inflammatory breast cancer biology: the tumour microenvironment is key. 2018. *Nat Rev Cancer*, 18(8):485-99.
- Liu, P., Li, X., Song, F., Li, P., Wei, J., Yan, Q., Xu, X., Yang, J., Li, C., Fu, X. Testosterone promotes tube formation of endothelial cells isolated from veins via activation of Smad1 protein. 2017. *Mol Cell Endocrinol*, 446:21-31.
- Liu, Q., Li, A., Tian, Y., Wu, J., Liu, Y., Li, T., Chen, Y., Han, X., Wu, K. The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer. 2016. *Cytokine Growth Factor Rev*, 31:61-71.
- Liu, X., Taftaf, R., Kawaguchi, M., Chang, Y. F., Chen, W., Entenberg, D., Zhang, Y., Gerratana, L., Huang, S., Patel, D. B., *et al.* Homophilic CD44 interactions mediate tumor cell aggregation and polyclonal metastasis in patient-derived breast cancer models. 2019. *Cancer Discov*, 9(1):96-113.
- Lokuhetty, D., White, V., Watanabe, R., Cree, I. *WHO classification of tumours. Breast tumors*. 2019. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer.

- Lombaerts, M., Van Wezel, T., Philippo, K., Dierssen, J., Zimmerman, R., Oosting, J., Van Eijk, R., Eilers, P., Van de Water, B., Cornelisse, C., *et al.* E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. 2006. *Br J Cancer*, 94(5):661-71.
- Lumachi, F., Brunello, A., Maruzzo, M., Basso, U., M.M. Basso, S. Treatment of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. 2013. *Curr Med Chem*, 20(5):596-604.
- Ma, L., Young, J., Prabhala, H., Pan, E., Mestdagh, P., Muth, D., Teruya-Feldstein, J., Reinhardt, F., Onder, T., Valastyan, S., *et al.* miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. 2010. *Nat Cell Biol*, 12(3):247-56.
- MacEwen, E., Patnaik, A., Harvey, H., Panko, W. Estrogen receptors in canine mammary tumors. 1982. *Cancer Res*, 42(6):2255-9.
- Madu, C., Wang, S., Madu, C., Lu, Y. Angiogenesis in Breast Cancer Progression, Diagnosis, and Treatment. 2020. *J Cancer*, 11(15):4474-94.
- Majchrzak, K., Lo Re, D., Gajewska, M., Bulkowska, M., Homa, A., Pawłowski, K., Motyl, T., Murphy, P., Król, M. Migrastatin analogues inhibit canine mammary cancer cell migration and invasion. 2013. *PloS One*, 8(10):e76789.
- Makrilia, N., Kollias, A., Manolopoulos, L., Syrigos, K. Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer. 2009. *Cancer Invest*, 27(10):1023-37.

- Maniotis, A. J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E. A., Gardner, L. M., Pe'er, J., Trent, J. M., Meltzer, P. S., Hendrix, M. J. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. 1999. *Am J Pathol*, 155(3):739-52.
- Martínez-Carpio, P., Navarro Moreno, M. [Growth factors, cell damage, cyclin-dependent kinases and their inhibitors: relevance in molecular pathology of human cancer]. 2003. *Med Clin (Barc)*, 120(7):265-71.
- Masuda, H., Baggerly, K., Wang, Y., Iwamoto, T., Brewer, T., Pusztai, L., Kai, K., Kogawa, T., Finetti, P., Birnbaum, D., *et al.* Comparison of molecular subtype distribution in triple-negative inflammatory and non-inflammatory breast cancers. 2013. *Breast Cancer Res*, 15(6):R112.
- Masuda, H., Brewer, T. M., Liu, D. D., Iwamoto, T., Shen, Y., Hsu, L., Willey, J. S., Gonzalez-Angulo, A. M., Chavez-MacGregor, M., Fouad, T. M., *et al.* Long-term treatment efficacy in primary inflammatory breast cancer by hormonal receptor- and HER2-defined subtypes. 2014. *Ann Oncol*, 25(2):384-91.
- Matos, A. J., Lopes, C., Carvalheira, J., Santos, M., Rutteman, G. R., Gartner, F. E-cadherin expression in canine malignant mammary tumours: relationship to other clinico-pathological variables. 2006. *J Comp Pathol*, 134(2-3):182-9.
- Menezes, M. E., Das, S. K., Emdad, L., Windle, J. J., Wang, X. Y., Sarkar, D., Fisher, P. B. Genetically Engineered Mice as Experimental Tools to Dissect the Critical Events in Breast Cancer. 2014. *Adv Cancer Res*, 121:331-82.

- Micheli, A., Meneghini, E., Secreto, G., Berrino, F., Venturelli, E., Cavalleri, A., Camerini, T., Mauro, M. G. D., Cavadini, E., Palo, G. D., *et al.* Plasma Testosterone and Prognosis of Postmenopausal Breast Cancer Patients. 2007. *J Clin Oncol*, 25(19):2685-90.
- Michishita, M., Akiyoshi, R., Yoshimura, H., Katsumoto, T., Ichikawa, H., Ohkusu-Tsukada, K., Nakagawa, T., Sasaki, N., Takahashi, K. Characterization of spheres derived from canine mammary gland adenocarcinoma cell lines. 2011. *Res Vet Sci*, 91(2):254-60.
- Millanta, F., Calandrella, M., Bari, G., Niccolini, M., Vannozzi, I., Poli, A. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. 2005. *Res Vet Sci*, 79(3):225-32.
- Millanta, F., Caneschi, V., Ressel, L., Citi, S., Poli, A. Expression of vascular endothelial growth factor in canine inflammatory and non-inflammatory mammary carcinoma. 2010. *J Comp Pathol*, 142(1):36-42.
- Miller, W. L. Steroidogenesis: Unanswered Questions. 2017. *Trends Endocrinol Metab*, 28(11):771-93.
- Moe, L. Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. 2001. *J Reprod Fertil Suppl*, 57:439-43.
- Moynahan, M. The cancer connection: BRCA1 and BRCA2 tumor suppression in mice and humans. 2002. *Oncogene*, 21(58):8994-9007.
- Murayama, T., Gotoh, N. Patient-Derived Xenograft Models of Breast Cancer and Their Application. 2019. *Cells*, 8(6):621.

- Nakamura, J., Savinov, A., Lu, Q., Brodie, A. Estrogen regulates vascular endothelial growth/permeability factor expression in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced rat mammary tumors. 1996. *Endocrinology*, 137(12):5589-96.
- Namba, R., Maglione, J., Young, L., Borowsky, A., MacLeod, C., Gregg, J. Molecular characterization of the transition to malignancy in a genetically engineered mouse-based model of ductal carcinoma in situ. 2004. *Mol Cancer Res*, 2(8):453-63.
- Nash, A., Baca, M., Wright, C., Scotney, P. The biology of vascular endothelial growth factor-B (VEGF-B). 2006. *Pulm Pharmacol Ther*, 19(1):61-9.
- Neve, R., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J., Tong, F., *et al.* A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. 2006. *Cancer cell*, 10(6):515-27.
- Nguyen, F., Peaa, L., Ibisch, C., Loussouarn, D., Gama, A., Rieder, N., Belousov, A., Campone, M., Abadie, J. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 1: natural history and prognostic factors. 2018. *Breast Cancer Res Treat*, 167(3):635-48.
- Nicolás Díaz-Chico, B., Germán Rodríguez, F., González, A., Ramírez, R., Bilbao, C., Cabrera de León, A., Aguirre Jaime, A., Chirino, R., Navarro, D., Díaz-Chico, J. Androgens and androgen receptors in breast cancer. 2007. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 105(1-5):1-15.

- Nieto, A., Peña, L., Pérez-Alenza, M., Sánchez, M., Flores, J., Castaño, M. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. 2000. *Vet Pathol*, 37(3):239-47.
- Nieto, M., Huang, R., Jackson, R., Thiery, J. EMT: 2016. 2016. *Cell*, 166(1):21-45.
- Norval, M., Maingay, J., Else, R. Studies of three canine mammary carcinoma cell lines--I. In vitro properties. 1984. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 20(12):1489-500.
- O'Donnell, A., Padhani, A., Hayes, C., Kakkar, A., Leach, M., Trigo, J., Scurr, M., Raynaud, F., Phillips, S., Aherne, W., et al. A Phase I study of the angiogenesis inhibitor SU5416 (semaxanib) in solid tumours, incorporating dynamic contrast MR pharmacodynamic end points. 2005. *Br J Cancer*, 93(8):876-83.
- Okegawa, T., Li, Y., Pong, R., Hsieh, J. Cell adhesion proteins as tumor suppressors. 2002. *J Urol*, 167(4):1836-43.
- Okegawa, T., Pong, R., Li, Y., Hsieh, J. The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. 2004. *Acta Biochim Pol*, 51(2):445-57.
- Padilla-Rodriguez, M., Parker, S., Adams, D., Westerling, T., Puleo, J., Watson, A., Hill, S., Noon, M., Gaudin, R., Aaron, J., et al. The actin cytoskeletal architecture of estrogen receptor positive breast cancer cells suppresses invasion. 2018. *Nat Commun*, 9(1):2980.
- Palacios, F., Tushir, J., Fujita, Y., D'Souza-Schorey, C. Lysosomal targeting of E-cadherin: a unique mechanism for the down-regulation of cell-cell

- adhesion during epithelial to mesenchymal transitions. 2005. *Mol Cell Biol*, 25(1):389-402.
- Pang, L. Y., Gatenby, E. L., Kamida, A., Whitelaw, B. A., Hupp, T. R., Argyle, D. J. Global Gene Expression Analysis of Canine Osteosarcoma Stem Cells Reveals a Novel Role for COX-2 in Tumour Initiation. 2014. *PLoS One*, 9(1):e83144.
- Paoloni, M., Khanna, C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. 2008. *Nat Rev Cancer*, 8(2):147-56.
- Pasqualini, J., Chetrite, G., Blacker, C., Feinstein, M., Delalonde, L., Talbi, M., Maloche, C. Concentrations of estrone, estradiol, and estrone sulfate and evaluation of sulfatase and aromatase activities in pre- and postmenopausal breast cancer patients. 1996. *J Clin Endocrinol Metab*, 81(4):1460-4.
- Pawlowski, K., Krol, M., Majewska, A., Badowska-Kozakiewicz, A., Mol, J., Malicka, E., Motyl, T. Comparison of cellular and tissue transcriptional profiles in canine mammary tumor. 2009. *J Physiol Pharmacol*, 60 Suppl 1:85-94.
- Payne, S., Bowen, R., Jones, J., Wells, C. Predictive markers in breast cancer-the present. 2008. *Histopathology*, 52(1):82-90.
- Pearson, T., Greiner, D., Shultz, L. Creation of "humanized" mice to study human immunity. 2008. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 15:Unit 15.21.

- Peña, L., Perez-Alenza, M., Rodriguez-Bertos, A., Nieto, A. Canine inflammatory mammary carcinoma: histopathology, immunohistochemistry and clinical implications of 21 cases. 2003a. *Breast Cancer Res Treat*, 78(2):141-8.
- Peña, L., Silván, G., Pérez-Alenza, M. D., Nieto, A., Illera, J. C. Steroid hormone profile of canine inflammatory mammary carcinoma: a preliminary study. 2003b. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 84(2-3):211-6.
- Peña, L., De Andrés, P., Clemente, M., Cuesta, P., Pérez-Alenza, M. Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. 2013. *Vet Pathol*, 50(1):94-105.
- Peña, L., Gama, A., Goldschmidt, M., Abadie, J., Benazzi, C., Castagnaro, M., Díez, L., Gärtner, F., Hellmén, E., Kiupel, M., *et al.* Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. 2014. *Vet Pathol*, 51(1):127-45.
- Perez Alenza, M. D., Tabanera, E., Peña, L. Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995-1999). 2001. *J Am Vet Med Assoc*, 219(8):1110-4.
- Petrovic, N. Targeting Angiogenesis in Cancer Treatments: Where do we Stand? 2016. *J Pharm Pharm Sci*, 19(2):226-38.
- Pichon, M., Broet, P., Magdelenat, H., Delarue, J., Spyrtatos, F., Basuyau, J., Saez, S., Rallet, A., Courriere, P., Millon, R., *et al.* Prognostic value of steroid receptors after long-term follow-up of 2257 operable breast cancers. 1996. *Br J Cancer*, 73(12):1545-51.

- Qian, C.-N., Tan, M.-H., Yang, J.-P., Cao, Y. Revisiting tumor angiogenesis: vessel co-option, vessel remodeling, and cancer cell-derived vasculature formation. 2016. *Chin J Cancer*, 8;35:10.
- Qiu, C., Lin, D., Wang, H., Qiao, C., Wang, J., Zhang, T. Quantification of VEGF-C expression in canine mammary tumours. 2008. *Aust Vet J*, 86(7):279-82.
- Queiroga, F., Pérez-Alenza, D., González-Gil, A., Silván, G., Peña, L., Illera, J. Serum and Tissue Steroid Hormone Levels in Canine Mammary Tumours: Clinical and Prognostic Implications. 2015. *Reprod Domest Anim*, 50(5):858-65.
- Queiroga, F., Perez-Alenza, M., Silvan, G., Peña, L., Lopes, C., Illera, J. Cox-2 levels in canine mammary tumors, including inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological features and prognostic significance. 2005. *Anticancer Res*, 25(6B):4269-75.
- Queiroga, F., Pires, I., Lobo, L., Lopes, C. The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. 2010. *Res Vet Sci*, 88(3):441-5.
- Rakha, E., Green, A. Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know. 2017. *Pathology*, 49(2):111-9.
- Ramirez, A. B., Bhat, R., Sahay, D., De Angelis, C., Thangavel, H., Hedayatpour, S., Dobrolecki, L. E., Nardone, A., Giuliano, M., Nagi, C., et al. Circulating tumor cell investigation in breast cancer patient-derived xenograft models by automated immunofluorescence staining, image acquisition, and single cell retrieval and analysis. 2019. *BMC Cancer*, 19(1):220.

- Ramjiawan, R., Griffioen, A., Duda, D. Anti-angiogenesis for cancer revisited: Is there a role for combinations with immunotherapy? 2017. *Angiogenesis*, 20(2):185-204.
- Ranieri, G., Patruno, R., Ruggieri, E., Montemurro, S., Valerio, P., Ribatti, D. Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a target of bevacizumab in cancer: from the biology to the clinic. 2006. *Curr Med Chem*, 13(16):1845-57.
- Rao, D., Gui, D., Koski, M., Popoviciu, L., Wang, H., Reiter, R., Said, J. An inverse relation between COX-2 and E-cadherin expression correlates with aggressive histologic features in prostate cancer. 2006. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 14(4):375-83.
- Raposo-Ferreira, T. M. M., Brisson, B. K., Durham, A. C., Laufer-Amorim, R., Kristiansen, V., Puré, E., Volk, S. W., Sorenmo, K. Characteristics of the Epithelial-Mesenchymal Transition in Primary and Paired Metastatic Canine Mammary Carcinomas. 2018. *Vet Pathol*, 55(5):622-33.
- Raposo, T., Pires, I., Prada, J., Queiroga, F., Argyle, D. Exploring new biomarkers in the tumour microenvironment of canine inflammatory mammary tumours. 2017a. *Vet Comp Oncol*, 15(2):655-66.
- Raposo, T., Arias-Pulido, H., Chaher, N., Fiering, S. N., Argyle, D. J., Prada, J., Pires, I., Queiroga, F. L. Comparative aspects of canine and human inflammatory breast cancer. 2017b. *Semin Oncol*, 44(4):288-300.
- Rasotto, R., Berlato, D., Goldschmidt, M., Zappulli, V. Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes: An Observational Cohort Study of 229 Cases. 2017. *Vet Pathol*, 54(4):571-78.

- Rasotto, R., Goldschmidt, M., Castagnaro, M., Carnier, P., Caliari, D., Zappulli, V. The dog as a natural animal model for study of the mammary myoepithelial basal cell lineage and its role in mammary carcinogenesis. 2014. *J Comp Pathol*, 151(2-3):166-80.
- Reis, A., Carvalheira, J., Schmitt, F., Gärtner, F. Immunohistochemical study of the expression of E-cadherin in canine mammary tumours. 2003. *Vet Rec*, 152(20):621-4.
- Restucci, B., Papparella, S., De Vico, G., Maiolino, P. E cadherin expression in normal and neoplastic canine mammary gland. 1997. *J Comp Pathol*, 116(2):191-202.
- Ribatti, D., Tamma, R., Annese, T. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. 2020. *Transl Oncol*, 13(6):100773.
- Rizzo, M. Cyclooxygenase-2 in oncogenesis. 2011. *Clin Chim Acta*, 412(9-10):671-87.
- Robertson, F., Bondy, M., Yang, W., Yamauchi, H., Wiggins, S., Kamrudin, S., Krishnamurthy, S., Le-Petross, H., Bidaut, L., Payer, A., et al. Inflammatory breast cancer: the disease, the biology, the treatment. 2010. *CA Cancer J Clin*, 60(6):351-75.
- Rodriguez, F. J., Lewis-Tuffin, L. J., Anastasiadis, P. Z. E-cadherin's dark side: possible role in tumor progression. 2012. *Biochim Biophys Acta*, 1826(1):23-31.

Rowell, J., McCarthy, D., Alvarez, C. Dog models of naturally occurring cancer. 2011. *Trends Mol Med*, 17(7):380-8.

Rueth, N., Lin, H., Bedrosian, I., Shaitelman, S., Ueno, N., Shen, Y., Babiera, G. Underuse of trimodality treatment affects survival for patients with inflammatory breast cancer: an analysis of treatment and survival trends from the National Cancer Database. 2014. *J Clin Oncol*, 32(19):2018-24.

Ruohola, J., Valve, E., Karkkainen, M., Joukov, V., Alitalo, K., Härkönen, P. Vascular endothelial growth factors are differentially regulated by steroid hormones and antiestrogens in breast cancer cells. 1999. *Mol Cell Endocrinol*, 149(1-2):29-40.

Russo, J., Russo, I. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. 2006. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 102(1-5):89-96.

Rutteman, G., Misdorp, W., Blankenstein, M., Van den Brom, W. Oestrogen (ER) and progesterin receptors (PR) in mammary tissue of the female dog: different receptor profile in non-malignant and malignant states. 1988. *Br J Cancer*, 58(5):594-9.

Saito, M., Goto, A., Abe, N., Saito, K., Maeda, D., Ohtake, T., Murakami, Y., Takenoshita, S. Decreased expression of CADM1 and CADM4 are associated with advanced stage breast cancer. 2018. *Oncol Lett*, 15(2):2401-6.

- Salas, Y., Márquez, A., Diaz, D., Romero, L. Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem. 2015. *PLoS One*, 10(5):e0127381.
- Samavat, H., Kurzer, M. S. Estrogen metabolism and breast cancer. 2015. *Cancer Lett*, 356(2 Pt A):231-43.
- Sánchez-Archidona, A., Jiménez, M., Pérez-Alenza, D., Silván, G., Illera, J., Peña, L., Dunner, S. Steroid pathway and oestrone sulphate production in canine inflammatory mammary carcinoma. 2007. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 104(3-5):93-9.
- Sánchez-Céspedes, R., Millán, Y., Guil-Luna, S., Reymundo, C., Espinosa de Los Monteros, A., Martín de Las Mulas, J. Myoepithelial cells in canine mammary tumours. 2016. *Vet J*, 207:45-52.
- Santoro, A., Bufo, P., Russo, G., Cagiano, S., Papagerakis, S., Bucci, P., Aquino, G., Longo, F., Feola, A., Giordano, A., *et al.* Expression and clinical implication of cyclooxygenase-2 and E-cadherin in oral squamous cell carcinomas. 2020. *Cancer biology & therapy*, 21(8):667-74.
- Sarli, G., Preziosi, R., De Tolla, L., Brunetti, B., Benazzi, C. E-cadherin immunoreactivity in canine mammary tumors. 2004. *J Vet Diagn Invest*, 16(6):542-7.

- Sasaki, Y., Tamura, M., Takeda, K., Ogi, K., Nakagaki, T., Koyama, R., Idogawa, M., Hiratsuka, H., Tokino, T. Identification and characterization of the intercellular adhesion molecule-2 gene as a novel p53 target. 2016. *Oncotarget*, 7(38):61426-37.
- Sasich, L., Sukkari, S. The US FDA's withdrawal of the breast cancer indication for Avastin (bevacizumab). 2012. *Saudi Pharm J*, 20(4):381-5.
- Sassi, F., Benazzi, C., Castellani, G., Sarli, G. Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. 2010. *BMC Vet Res*, 6:5.
- Sehgal, A., Boynton, A. L., Young, R. F., Vermeulen, S. S., Yonemura, K. S., Kohler, E. P., Aldape, H. C., Simrell, C. R., Murphy, G. P. Cell adhesion molecule Nr-CAM is over-expressed in human brain tumors. 1998. *Int J Cancer*, 76(4):451-8.
- Shibue, T., Weinberg, R. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. 2017. *Nat Rev Clin Oncol*, 14(10):611-29.
- Shim, J., An, H., Lee, Y., Kim, S., Lee, K., Lee, K. Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with breast carcinoma and its poor prognostic factors. 2003. *Mol Pathol*, 16(12):1199-204.
- Shim, V., Gauthier, M., Sudilovsky, D., Mantei, K., Chew, K., Moore, D., Cha, I., Tlsty, T., LJ, E. Cyclooxygenase-2 expression is related to nuclear grade in ductal carcinoma in situ and is increased in its normal adjacent epithelium. 2003. *Cancer Res*, 63(10):2347-50.

- Shirakawa, K., Tsuda, H., Heike, Y., Kato, K., Asada, R., Inomata, M., Sasaki, H., Kasumi, F., Yoshimoto, M., Iwanaga, T., *et al.* Absence of endothelial cells, central necrosis, and fibrosis are associated with aggressive inflammatory breast cancer. 2001. *Cancer Res*, 61(2):445-51.
- Shirakawa, K., Wakasugi, H., Heike, Y., Watanabe, I., Yamada, S., Saito, K., Konishi, F. Vasculogenic mimicry and pseudo-comedo formation in breast cancer. 2002. *Int J Cancer*, 99(6):821-8.
- Simeone, P., Trerotola, M., Franck, J., Cardon, T., Marchisio, M., Fournier, I., Salzet, M., Maffia, M., Vergara, D. The multiverse nature of epithelial to mesenchymal transition. 2019. *Sem Cancer Biol*, 58:1-10.
- Singletary, S. E., Cristofanilli, M. Defining the clinical diagnosis of inflammatory breast cancer. 2008. *Semin Oncol*, 35(1):7-10.
- Sleeckx, N., de Rooster, H., Veldhuis Kroeze, E., Van Ginneken, C., Van Brantegem, L. Canine mammary tumours, an overview. 2011. *Reprod Domestic Anim*, 46(6):1112-31.
- Somboonporn, W., Davis, S. R. Testosterone effects on the breast: implications for testosterone therapy for women. 2004. *Endocr Rev*, 25(3):374-88.
- Sorenmo, K., Worley, D., Zappulli, V. Tumors of the mammary gland. En *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*, 2020. eds. D. Vail, D. Thamm & J. Liptack, 604-25. Elsevier.
- Stacker, S., Achen, M. Emerging Roles for VEGF-D in Human Disease. 2018. *Biomolecules*, 8(1):1.

- Stefanello, D., Avallone, G., Ferrari, R., Roccabianca, P., Boracchi, P. Canine cutaneous perivascular wall tumors at first presentation: clinical behavior and prognostic factors in 55 cases. 2011. *J Vet Intern Med*, 25(6):1398-405.
- Susaneck, S. J., Allen, T. A., Hoopes, J., Withrow, S. C., Macy, D.W. Inflammatory mammary carcinoma in the dog. 1983. *J Am Anim Hosp Assoc*, 9:971-76.
- Sugimoto, T., Maruo, K., Imaeda, Y., Suzuki, K., Shirota, K., Ejima, H., Endo, S., Nomura, T. Xenotransplantation of canine tumors into severe combined immunodeficient (SCID) mice. 1994. *J Vet Med Sci*, 56(6):1087-91.
- Sullivan, L., Brekken, R. The VEGF family in cancer and antibody-based strategies for their inhibition. 2010. *MAbs*, 2(2):165-75.
- Sun, N. Y., Yang, M. H. Metabolic Reprogramming and Epithelial-Mesenchymal Plasticity: Opportunities and Challenges for Cancer Therapy. 2020. *Front Oncol*, 10:792.
- Suzuki, T., Nakata, T., Miki, Y., Kaneko, C., Moriya, T., Ishida, T., Akinaga, S., Hirakawa, H., Kimura, M., Sasano, H. Estrogen sulfotransferase and steroid sulfatase in human breast carcinoma. 2003. *Cancer Res*, 63(11):2762-70.
- Suzuki, S., Uchida, K., Nakayama, H. The effects of tumor location on diagnostic criteria for canine malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNSTs) and the markers for distinction between canine MPNSTs and canine perivascular wall tumors. 2014. *Vet Pathol*, 51(4):722-36.

- Szweda, M., Rychlik, A., Babińska, I., Pomianowski, A. Significance of Cyclooxygenase-2 in Oncogenesis. 2019. *J Vet Res*, 63(2):215-24.
- Takahashi, Y., Iwai, M., Kawai, T., Arakawa, A., Ito, T., Sakurai-Yageta, M., Ito, A., Goto, A., Saito, M., Kasumi, F., *et al.*. Aberrant expression of tumor suppressors CADM1 and 4.1B in invasive lesions of primary breast cancer. 2012. *Breast Cancer*, 19(3):242-52.
- Takeshita, E., Osanai, T., Higuchi, T., Soumaoro, L., Sugihara, K. Elevated cyclooxygenase-2 expression is associated with histological grade in invasive ductal breast carcinoma. 2005. *J Med Dent Sci*, 52(4):189-93.
- Tamura, D., Saito, T., Murata, K., Kawashima, M., Asano, R. Celecoxib exerts antitumor effects in canine mammary tumor cells via COX-2-independent mechanisms. 2015. *Int J Oncol*, 46(3):1393-404.
- Tavassoli, F. A. *Pathology of the Breast*. 1999. McGraw-Hill Professional Publishing.
- Teicher, B. Tumor models for efficacy determination. 2006. *Mol Cancer Ther*, 5(10):2435-43.
- Teixeira, S., Amorim, I., Rêma, A., Faria, F., Gärtner, F. Molecular Heterogeneity of Canine Cutaneous Peripheral Nerve Sheath Tumors: A Drawback in the Diagnosis Refinement. 2016. *In vivo*, 30(6):819-27.

- Timoshenko, A., Chakraborty, C., Wagner, G., Lala, P. COX-2-mediated stimulation of the lymphangiogenic factor VEGF-C in human breast cancer. 2006. *Br J Cancer*, 94(8):1154-63.
- Todorović-Raković, N., Milovanović, J. Interleukin-8 in breast cancer progression. 2013. *J Interferon Cytokine Res*, 33(10):563-70.
- Trabert, B., Sherman, M., Kannan, N., Stanczyk, F. Progesterone and Breast Cancer. 2020. *Endocr Rev*, 41(2):320-44.
- Tsourlakis, M. C., Walter, E., Quaas, A., Graefen, M., Huland, H., Simon, R., Sauter, G., Steurer, S., Schlomm, T., Minner, S. High Nr-CAM expression is associated with favorable phenotype and late PSA recurrence in prostate cancer treated by prostatectomy. 2013. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 16(2):159-64.
- Ueno, T., Chow, L., Toi, M. Increases in circulating VEGF levels during COX-2 inhibitor treatment in breast cancer patients. 2006. *Biomed Pharmacother*, 60(6):277-9.
- Vajkoczy, P., Menger, M., Vollmar, B., Schilling, L., Schmiedek, P., Hirth, K., Ullrich, A., Fong, T. Inhibition of tumor growth, angiogenesis, and microcirculation by the novel Flk-1 inhibitor SU5416 as assessed by intravital multi-fluorescence videomicroscopy. 1999. *Neoplasia*, 1(1):31-41.
- Valdivia, G., Alonso-Diez, Á., Pérez-Alenza, D., Peña, L. From Conventional to Precision Therapy in Canine Mammary Cancer: A Comprehensive Review. 2021. *Front Vet Sci*, 8:623800.

- Van der Auwera, I., Van Laere, S. J., Van den Eynden, G. G., Benoy, I., Van Dam, P., Colpaert, C. G., Fox, S. B., Turley, H., Harris, A. L., Van Marck, E. A., *et al.* Increased angiogenesis and lymphangiogenesis in inflammatory versus noninflammatory breast cancer by real-time reverse transcriptase-PCR gene expression quantification. 2004. *Clin Cancer Res*, 10(23):7965-71.
- Van Golen, K., Wu, Z., Qiao, X., Bao, L., Merajver, S. RhoC GTPase overexpression modulates induction of angiogenic factors in breast cells. 2000. *Neoplasia*, 2(5):418-25.
- Van Laere, S., Van den Eynden, G., Van der Auwera, I., Vandenberghe, M., Van Dam, P., Van Marck, E., Van Golen, K., Vermeulen, P., Dirix, L. Identification of cell-of-origin breast tumor subtypes in inflammatory breast cancer by gene expression profiling. 2006. *Breast Cancer Res Treat*, 95(3):243-55.
- Van Staveren, W., Solís, D., Hébrant, A., Detours, V., Dumont, J., Maenhaut, C. Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells? 2009. *Biochim Biophys Acta*, 1795(2):92-103.
- Van Uden, D., Bretveld, R., Siesling, S., de Wilt, J., Blanken-Peeters, C. Inflammatory breast cancer in the Netherlands; improved survival over the last decades. 2017. *Breast Cancer Res Treat*, 162(2):365-74.
- Van Uden, D., Van Laarhoven, H., Westenberg, A., de Wilt, J., Blanken-Peeters, C. Inflammatory breast cancer: an overview. 2015. *Crit Rev Oncol Hematol*, 93(2):116-26.

- Venturelli, E., Orenti, A., Fabricio, A. S. C., Garrone, G., Agresti, R., Paolini, B., Bonini, C., Gion, M., Berrino, F., Desmedt, C., *et al.* Observational study on the prognostic value of testosterone and adiposity in postmenopausal estrogen receptor positive breast cancer patients. 2018. *BMC Cancer*, 18(1):651.
- Visan, S., Balacescu, O., Berindan-Neagoe, I., Catoi, C. In vitro comparative models for canine and human breast cancers. *Clujul Med*, 2016. 38-49.
- Von Schoultz, B. Androgens and the breast. 2007. *Maturitas*, 57(1):47-9.
- Wang, X., Semba, T., Phi, L., Chainitikun, S., Iwase, T., Lim, B., Ueno, N. Targeting Signaling Pathways in Inflammatory Breast Cancer. 2020. *Cancers*, 12(9):2479.
- Webster, J., Dennis, M., Dervisis, N., Heller, J., Bacon, N., Bergman, P., Bienzle, D., Cassali, G., Castagnaro, M., Cullen, J., *et al.* Recommended guidelines for the conduct and evaluation of prognostic studies in veterinary oncology. 2011. *Vet Pathol*, 48(1):7-18.
- Wei, X., Chen, Y., Jiang, X., Peng, M., Liu, Y., Mo, Y., Ren, D., Hua, Y., Yu, B., Zhou, Y., *et al.* Mechanisms of vasculogenic mimicry in hypoxic tumor microenvironments. 2021. *Mol Cancer*, 20(1):7.
- Wensman, H., Flama, V., Pejler, G., Hellmén, E. Plasticity of cloned canine mammary spindle cell tumor, osteosarcoma and carcinoma cells. 2008. *Vet Pathol*, 45(6):803-15.

- Whittle, J. R., Lewis, M. T., Lindeman, G. J., Visvader, J. E. Patient-derived xenograft models of breast cancer and their predictive power. 2015. *Breast Cancer Res*, 17(1):17.
- Wikman, H., Westphal, L., Schmid, F., Pollari, S., Kropidlowski, J., Sielaff-Frimpong, B., Glatzel, M., Matschke, J., Westphal, M., Iljin, K., *et al.* Loss of CADM1 expression is associated with poor prognosis and brain metastasis in breast cancer patients. 2014. *Oncotarget*, 5(10):3076-87.
- Williams, E. D., Gao, D., Redfern, A., Thompson, E. W. Controversies around epithelial-mesenchymal plasticity in cancer metastasis. 2019. *Nat Rev Cancer*, 19(12):716-32.
- Wolfe, L. G., Smith, B. B., Toivio-Kinnucan, M. A., Sartin, E. A., Kwapien, R. P., Henderson, R. A., Barnes, S. Biologic properties of cell lines derived from canine mammary carcinomas. 1986. *J Natl Cancer Inst*, 77(3):783-92.
- Wong, T., Gao, W., Chan, J. Interactions between E-cadherin and microRNA deregulation in head and neck cancers: the potential interplay. 2014. *Biomed Res Int*, 2014:126038.
- Wood, C., Lees, C., Cline, J. Mammary gland and endometrial effects of testosterone in combination with oral estradiol and progesterone. 2009. *Menopause*, 16(3):466-76.
- Woodward, W. A. Inflammatory breast cancer: unique biological and therapeutic considerations. 2015. *Lancet Oncol*, 16(15):e568-76.

- Wu, J., Richer, J., Horwitz, K., Hyder, S. Progesterin-dependent induction of vascular endothelial growth factor in human breast cancer cells: preferential regulation by progesterone receptor B. 2004. *Cancer Res*, 64(6):2238-44.
- Wu, V., Kanaya, N., Lo, C., Mortimer, J., Chen, S. From bench to bedside: What do we know about hormone receptor-positive and human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer? 2015. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 153:45-53.
- Xu, K., Gao, H., Shu, H. Celecoxib can induce vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis. 2011. *Mol Cancer Ther*, 10(1):138-47.
- Yager, J., Davidson, N. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. 2006. *N Engl J Med*, 354(3):270-82.
- Yamashita, A., Maruo, K., Suzuki, K., Shiota, K., Kobayashi, K., Hioki, K. Experimental chemotherapy against canine mammary cancer xenograft in SCID mice and its prediction of clinical effect. 2001. *J Vet Med Sci*, 63(8):831-6.
- Ye, Y., Tellez, J., Durazo, M., Belcher, M., Yearsley, K., Barsky, S. E-cadherin accumulation within the lymphovascular embolus of inflammatory breast cancer is due to altered trafficking. 2010. *Anticancer Res*, 30(10):3903-10.

- Yehya, A., Asif, M., Petersen, S., Subramaniam, A., Kono, K., Majid, A., Oon, C. Angiogenesis: Managing the Culprits behind Tumorigenesis and Metastasis. 2018. *Medicina (Kaunas)*, 54(1):8.
- Yoon, K. J., Phelps, D. A., Bush, R. A., Remack, J. S., Billups, C. A., Khoury, J. D. ICAM-2 expression mediates a membrane-actin link, confers a nonmetastatic phenotype and reflects favorable tumor stage or histology in neuroblastoma. 2008. *PLoS One*, 3(11):e3629.
- Yoshida, K., Yoshida, S., Choisunirachon, N., Saito, T., Matsumoto, K., Saeki, K., Mochizuki, M., Nishimura, R., Sasaki, N., Nakagawa, T. The relationship between clinicopathological features and expression of epithelial and mesenchymal markers in spontaneous canine mammary gland tumors. 2014. *J Vet Med Sci*, 76(10):1321-7.
- Yoshimura, H., Nakahira, R., Kishimoto, T., Michishita, M., Ohkusu-Tsukada, K., Takahashi, K. Differences in indicators of malignancy between luminal epithelial cell type and myoepithelial cell type of simple solid carcinoma in the canine mammary gland. 2014. *Vet Pathol*, 51(6):1090-5.
- Yu, J., Qin, B., Moyer, A. M., Sinnwell, J. P., Thompson, K. J., Copland, J. A., Marlow, L. A., Miller, J. L., Yin, P., Gao, B., *et al.* Establishing and characterizing patient-derived xenografts using pre-chemotherapy percutaneous biopsy and post-chemotherapy surgical samples from a prospective neoadjuvant breast cancer study. 2017. *Breast Cancer Res*, 6;19(1):130.

- Zappulli, V., Peña, L., Rasotto, R., Goldschmidt, M., Gama, A., Scruggs, J., Kiupel, M. *Surgical Pathology of Tumors of Domestic Animals*. 2019. United States of America: Davis-Thompson DVM Foundation.
- Zeleniuch-Jacquotte, A., Afanasyeva, Y., Kaaks, R., Rinaldi, S., Scarmo, S., Liu, M., Arslan, A., Toniolo, P., Shore, R., Koenig, K. Premenopausal serum androgens and breast cancer risk: a nested case-control study. 2012. *Breast Cancer Res*, 14(1):R32.
- Zhang, G., Zhong, L., Luo, H., Wang, S. MicroRNA-155-3p promotes breast cancer progression through down-regulating CADM1. 2019. *Onco Targets Ther*, 12:7993-8002.
- Zhang, H., Craft, P., Scott, P., Ziche, M., Weich, H., Harris, A., Bicknell, R. Enhancement of tumor growth and vascular density by transfection of vascular endothelial cell growth factor into MCF-7 human breast carcinoma cells. 1995. *J Natl Cancer Inst*, 87(3):213-9.
- Zhang, H., Scott, P., Morbidelli, L., Peak, S., Moore, J., Turley, H., Harris, A., Ziche, M., Bicknell, R. The 121 amino acid isoform of vascular endothelial growth factor is more strongly tumorigenic than other splice variants in vivo. 2000. *Br J Cancer*, 83(1):63-8.
- Zhang, X., Claerhout, S., Prat, A., Dobrolecki, L., Petrovic, I., Lai, Q., Landis, M., Wiechmann, L., Schiff, R., Giuliano, M., *et al.*. A renewable tissue resource of phenotypically stable, biologically and ethnically diverse, patient-

derived human breast cancer xenograft models. 2013. *Cancer Res*, 73(15):4885-97.

Zhang, X., Gaspard, J., Chung, D. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. 2001. *Cancer Res*, 61(16):6050-4.

Zuccari, D., Castro, R., Gelaleti, G., Mancini, U. Interleukin-8 expression associated with canine mammary tumors. 2011. *Genet Mol Res*, 10(3):1522-32.