



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y DE  
PROGESTERONA EN TEJIDO MAMARIO NORMAL Y TUMORAL  
CANINO**

**CLAUDIA M. DELLA CELLA PEREZ**

**TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL**

**URUGUAY  
2014**





**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y DE  
PROGESTERONA EN TEJIDO MAMARIO NORMAL Y  
TUMORAL CANINO**

**CLAUDIA M. DELLA CELLA PEREZ**

**Celia Tasende, DMVT, MSc, PhD  
Directora de Tesis  
2014**

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE  
DEFENSA DE TESIS**

**Elsa G. Garófalo; Profesora, Doctora  
Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República - Uruguay**

**Ana Meikle; DMTV, MSc, PhD  
Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República - Uruguay**

**Rodolfo Rivero; DMTV, MSc  
Dirección de Laboratorios Veterinarios, Ministerio de  
Ganadería, Agricultura y Pesca, Paysandú - Uruguay**



**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**Programa de Posgrados**

**ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS**  
**DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL**

**“Expresión de los receptores de estrógenos alfa y de progesterona en tejido mamario normal y tumoral canino”**

---

**Por: Dra. Claudia Mercedes Della Cella Pérez**  
**Directora de Tesis: Dra. Celia Tasende**

**Tribunal**

**Presidente: Dra. Elsa Garófalo**

**Segundo Miembro: Dra. Ana Meikle**

**Tercer Miembro: Dr. Rodolfo Rivero**

**Fallo del Tribunal: Aprobada con Mención**

**Montevideo, 7 de agosto de 2014**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA  
Postgrados Académicos y Especializaciones

## FUNDAMENTACIÓN

### EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y DE PROGESTERONA EN TEJIDO MAMARIO NORMAL Y TUMORAL CANINO

**Dra. Claudia DELLA CELLA (DCV)**

### TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

El Tribunal considera que la Dra. Claudia DELLA CELLA ha realizado un trabajo de Tesis de Maestría de calidad científica, basado en una actualizada y pertinente revisión bibliográfica, con hipótesis de investigación bien elaboradas, objetivos acordes y adecuada estrategia de investigación. La expresión de Receptores de Estrógenos y de Progesterona en glándula mamaria normal y tumoral en caninos, fue determinada utilizando dos metodologías con diferentes enfoques experimentales y diferentes significación biológica y proyección clínica. Los principales resultados obtenidos son firmes en cuanto a su significación estadística y constituyen un aporte original al conocimiento de aspectos moleculares que están en la base de la sensibilidad y capacidad de respuesta de glándula mamaria canina normal y tumoral a los esteroides sexuales.

El Tribunal ha señalado que el manuscrito presenta aspectos a ser corregidos y en acuerdo con la tesista y su directora, dichas correcciones serán incorporadas en la versión final de la de tesis.

La Dra. Claudia DELLA CELLA realizó una presentación oral clara y concisa y en cuanto a la defensa respondió con solvencia a las preguntas del Tribunal y en acuerdo con las observaciones planteadas.

En suma, el Tribunal considera que la Dra. Claudia DELLA CELLA ha realizado una investigación de calidad, que aporta conocimiento a la oncología molecular del cáncer mamario canino, contribuyendo en forma significativa al desarrollo de la medicina y ciencias veterinarias en pequeños animales, tanto en la Facultad como en el país, por lo que ha merecido la calificación de Aprobado con Mención.

  
Prof. Dra. Elsa G. Garófalo  
Presidenta del Tribunal

Montevideo 7 de Agosto de 2014



## **DEDICATORIA**

Si no conozco una cosa, la investigaré.

Louis Pasteur (1822-1895) *Químico y microbiólogo francés.*

Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano.

Isaac Newton (1642-1727) *Matemático y físico británico.*

Daría todo lo que sé, por la mitad de lo que ignoro.

René Descartes (1596-1650) *Filósofo y matemático francés.*

El que nada duda, nada sabe.

Proverbio griego.

**A Mamá  
Siempre conmigo**



## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de Tesis fue realizado en las Áreas de Bioquímica y Pequeños Animales de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la Republica, Montevideo Uruguay, con financiación de Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), y de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) y Comisión de Investigación y Desarrollo Científico de la Facultad de Veterinaria (CIDEC), Programa de Posgrados Académicos de Facultad de Veterinaria: apoyo a estudiantes.

También quiero expresar mi gratitud a las siguientes personas:

A **Celia Tasende**, mi tutora, Profesora de Bioquímica que me enseñó a transitar estos primeros pasos en el mundo de la investigación, despertar mi curiosidad científica y enseñarme los rigurosos pasos del método científico. Y sobre todo por su decidido apoyo y constante amistad, junto con un férreo compromiso con esta investigación. Brindándome generosamente el tiempo, espacio, reactivos y equipos imprescindibles para realizar este trabajo.

A **Álvaro Hernández** Profesor de Patología y Clínica de Pequeños Animales por su apoyo y comprensión para que pudiera realizar mis estudios de posgrado; a **Luis Delucchi** compañero de maestría con el que compartimos muchas horas de trabajo y discusión académica, **Alicia Decuadro** por su invaluable apoyo y a los compañeros del área **Alejandro Benech**, **Mary Cuns**, **Natalia Barthezaghi**, y **Carlos Soto** director del Centro Hospital Veterinario a todos les agradezco su apoyo.

**Rafael Sauto** por su invaluable contribución en la obtención de muestras de tejido mamario normal, ensayos de inmunohistoquímica y en la evaluación de los resultados de inmunohistoquímica. **Cecilia López** por su apoyo en el entrenamiento de la técnica de inmunohistoquímica y en la evaluación de los resultados de la misma. **Perla Rubianes** por su invaluable colaboración en las determinaciones de receptores, por la preparación de todos los materiales para los ensayos realizados, así como fotocopiado de bibliografía y sobre todo por el cariño que siempre me brindó. **Juan Pablo Damián** por el apoyo para el análisis de los datos y las críticas constructivas realizadas al mismo, realizado siempre con humildad y cariño. **Marcelo Rodríguez-Piñón** por su apoyo en el laboratorio de Bioquímica y aporte de bibliografía. Mariana Amoedo, Roció González y Gonzalo D´Anatro por su apoyo.

**Mario Quintero**, **Carlos Nemetchek**, **Pablo Malet** por su desinteresada colaboración en la obtención de muestras de la glándula mamaria. **María Jesús Sabalsagaray** por su colaboración en la inclusión de las muestras en parafina y el corte de las mismas. **Fernando Dutra** por su invaluable colaboración en el estudio anatomopatológico de los tumores. **Danilo Fila** por su entrenamiento y colaboración en la técnica de citología vaginal y clasificación de grupos de las perras. **Ana Meikle** por abrirme las puertas de su laboratorio, el entrenamiento en las técnicas de RIA y por su apoyo incondicional para las determinaciones de progesterona. **Isabel Sartore** por su apoyo en las determinaciones de progesterona. **Alejandro Bielli** mi querido compañero de liceo y de facultad por su entrenamiento para la identificación de los compartimientos histológicos de la glándula mamaria. A las **compañeras de biblioteca** de nuestra Facultad por su apoyo con el material bibliográfico.

A mis padres, **Martha** y **Argos** por haberme dado sostén, amor, comprensión, apoyo en todo lo que he emprendido, brindándome todas las oportunidades para desarrollarme tanto en lo personal, como en lo profesional y me hicieron la vida muy feliz; mi hermano **Flavio** con el que se que cuento de manera incondicional, **Pablo** esposo, compañero, amigo que me enseñó a ser fuerte y a confiar en mí, a ti dedico mi Tesis y todas mis nuevas metas por emprender, mi adorado hijo **Ramiro** (eximio esgrimista) por regalarme cada día su entusiasmo y sensibilidad. Ellos son el soporte de mi vida, son las personas que más amo en este mundo y las que me impulsan a seguir mis sueños, festejando logros o acompañándome en los momentos difíciles, y porque muchas veces utilicé tiempo que debió ser para ellos para poder realizar este trabajo. Gracias por su paciencia, y su amor.

A todas **mis amigas y amigos** que no voy a nombrar porque son muchos y no quisiera olvidarme de ninguno, que me apoyaron y alentaron y que muchas veces compartieron mis angustias.

A **Sofía** gracias por su apoyo, contención y ayuda.

También agradezco a los propietarios de nuestros pacientes que colaboraron en la obtención de la información necesaria para completar las fichas clínicas y a sus animales, que ya son literatura veterinaria.

# ÍNDICE

	Páginas
<b>Resumen</b> .....	i
<b>Summary</b> .....	ii
<b>1) Introducción</b> .....	01
1.1. La hembra canina animal de compañía y modelo de estudio experimental para el estudio del cáncer de mama.....	01
1.2. La glándula mamaria canina normal.....	02
1.3. Ciclo Reproductivo de la perra.....	03
1.4. Cambios histológicos en la glándula mamaria de la hembra canina durante el ciclo reproductivo.....	05
1.5. Aspectos generales de los tumores mamarios caninos.....	05
1.6. Clasificación de los tumores y lesiones mamarias en la perra.....	07
1.7. Factores asociados al desarrollo del cáncer mamario.....	07
<b>2) Antecedentes Específicos</b> .....	09
2.1. Hormonas esteroides ováricas.....	09
2.2. Mecanismo de acción de los estrógenos y la progesterona.....	09
2.3. Regulación de los receptores de estrógenos y progesterona.....	10
2.4. Receptores de estrógenos y progesterona en la glándula mamaria normal.....	11
2.5. Receptores de estrógenos y progesterona en la glándula mamaria tumoral.....	12
<b>3) Hipótesis</b> .....	14
<b>4) Objetivo General</b> .....	14
<b>5) Objetivos Específicos</b> .....	14
<b>6) Estrategia de la Investigación</b> .....	14
6.1. Diseño en perras normales.....	14
6.2. Diseño en perras con tumores mamarios.....	15
<b>7) Materiales y Métodos</b> .....	15
7.1. Diseño en perras normales.....	15
7.2. Diseño en perras con tumores mamarios.....	15
7.3. Muestras de vagina en perras normales.....	16
7.4. Muestras de sangre y tejido mamario en perras normales y con tumores mamarios.....	16
7.4.1. Muestras de sangre.....	16
7.4.2. Muestras de tejido de la glándula mamaria normal y tumoral.....	16
7.5. Determinación de la concentración de progesterona sérica en perras normales y con tumores mamarios.....	17

7.6. Determinación de RE $\alpha$ y RP por inmunohistoquímica en glándula mamaria normal y tumoral.....	17
7.7. Análisis de imágenes.....	18
7.8. Ensayos de unión de RE y RP en glándula mamaria normal y tumoral.....	18
7.9. Análisis estadístico.....	19
<b>8) Resultados en Glándula Mamaria de Perras</b>	
<b>Normales.....</b>	<b>20</b>
8.1. Clasificación de las perras normales en los distintos estadios del ciclo.....	20
8.2. Concentraciones de progesterona sérica en perras normales.....	22
8.3. Distribución e intensidad inmunomarcado a RE $\alpha$ en glándula mamaria normal.....	23
8.4. Distribución e intensidad de inmunomarcado a RP en glándula mamaria normal.....	24
8.5. Concentración de RE y RP en glándula mamaria normal.....	26
8.6. Concentración de RE y RP en glándula mamaria de perras prepúberes.....	28
<b>9) Discusión de los Resultados en Glándula Mamaria Normal.....</b>	<b>29</b>
<b>10) Resultados en Tumores Mamarios.....</b>	<b>31</b>
10.1. Histopatología de los tumores mamarios.....	31
10.2. Concentración de progesterona sérica en perras con tumores mamarios.....	32
10.3. Distribución e intensidad de inmunomarcado a RE $\alpha$ en tumores mamarios de perras enteras.....	33
10.4. Distribución e intensidad de inmunomarcado a RP en tumores mamarios de perras enteras.....	34
10.5. Distribución e intensidad de inmunomarcado a RE $\alpha$ y RP en tumores mamarios de perras castradas.....	36
10.6. Concentración de RE y RP en tumores mamarios de perras enteras.....	36
10.7. Concentración de RE y RP en tumores mamarios de perras castradas.....	37
<b>11) Discusión de Resultados en Tumores Mamarios.....</b>	<b>38</b>
<b>12) Discusión General.....</b>	<b>40</b>
<b>13) Conclusiones.....</b>	<b>42</b>
<b>14) Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>43</b>

## **INDICE DE ABREVIATURAS**

E: Estrógenos

P4: Progesterona

GnRH: Hormona liberadora de gonadotrofinas

FSH: Hormona folículo estimulante

LH: Hormona luteinizante

OMS: Organización Mundial de la Salud

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

IGF-I: Factor de crecimiento insulina simil tipo I

TGF-  $\alpha$ : Factor de crecimiento transformante alfa

RE $\alpha$ : Receptor de estrógenos alfa

RE $\beta$ : Receptor de estrógenos beta

RP: Receptor de progesterona

DNA: Acido desoxiribonucleico

Kd: Constante de disociación aparente

TC: Tejido conectivo

EA: Epitelio alveolar

EC: Epitelio de conductos

SERM: modulador selectivo del receptor de estrógenos

GH: hormona del crecimiento

EEM: error estandar de la media

## Resumen

Los objetivos de esta tesis fueron estudiar si la distribución, concentración y afinidad de los receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP) en la glándula mamaria están vinculados a la concentración de Progesterona (P4) sérica en diferentes etapas del ciclo en perras normales y en perras con tumores mamarios. Se realizó un diseño en perras normales y otro en perras con tumores mamarios. Se utilizaron 12 perras adultas sanas enteras y 4 prepúberes y 22 adultas (15 enteras, 7 castradas) con tumores mamarios. Se obtuvieron muestras de tejido mamario durante las cirugías. Se determinó P4 por RIA, la distribución de RE $\alpha$  y RP por inmunohistoquímica y la concentración de RE y RP por ensayos de unión. Los resultados fueron analizados por ANOVA, expresados como la media  $\pm$  EEM, considerando significativo  $P < 0,05$ . La concentración (ng/mL) de P4 sérica fue mayor en diestro que en proestro, estro y anestro en ambos diseños. Se detectó inmunomarcado a RE $\alpha$  y RP en tejido conectivo, epitelios alveolar y de conductos en perras adultas normales y con tumores mamarios sugiriendo que los tres compartimientos son blanco de acción de los estrógenos y P4. La intensidad de inmunomarcado a RE $\alpha$  y RP fue mayor en epitelio alveolar que en tejido conectivo. La intensidad de inmunomarcado a RE $\alpha$  en epitelio de conductos fue mayor en anestro que en proestro, estro y diestro y la de RP en tejido conectivo fue mayor al estro que en proestro, diestro y anestro. La afinidad de ambos receptores fue similar en ambos diseños. La concentración (fmol/prot) de RE y RP fue menor en perras en diestro que en proestro y estro. El perfil de distribución y concentración de RE y RP en nuestro trabajo está vinculado a los niveles circulantes de P4, en acuerdo con lo reportado para RE pero no para RP. En perras prepúberes la concentración de ambos receptores fue menor que en adultas, en acuerdo con el escaso desarrollo del tejido mamario. En perras enteras con tumores mamarios la intensidad de inmunomarcado a RE $\alpha$  fue mayor en tumores benignos que malignos e hiperplasias y fue mayor en tejido conectivo que en ambos epitelios. En tumores benignos también fue mayor en tejido conectivo que en ambos epitelios. La de RP en epitelios de conductos tendió a ser mayor en hiperplasias que en tumores malignos. En perras castradas no hubo diferencias en los parámetros estudiados. La concentración de RE fue mayor en tumores benignos que malignos e hiperplasias y la de RP fue similar en los diferentes tipos de tumores. Por ensayos de unión todas las muestras de tumores fueron RE y RP positivos, sugiriendo que las vías relacionadas con los estrógenos y progestinas pueden proporcionar dianas eficaces para el tratamiento del cáncer de mama.

## SUMMARY

The aim of the Thesis was to study the effect of the progesterone (P4) circulating levels on the distribution, concentration and affinity of the estrogen and progesterone receptors (ER, PR) in normal bitches at different stages of the cycle and in bitches with mammary tumours. Two experiments were performed in bitches, one in normal and other with mammary tumours. Twelve healthy adult bitches and 4 prepubertal and 22 adult (15 intact, 7 spayed) with mammary tumours were used. Mammary samples were obtained during surgery. Progesterone was determined by RIA. The ER $\alpha$  and PR distribution by immunohistochemistry and ER and PR affinity and concentrations by binding assay were determined. The results were analysed by ANOVA and expressed as mean  $\pm$  standard error pooled, considering significant  $P < 0.05$ . The P4 serum concentration (ng/mL) was higher in diestrus than proestrus, estrus and anestrus in both experiments. Immunolabeling for ER $\alpha$  and PR was detected in connective tissue, and alveolar and ductal epithelium in adult normal and bitches with tumours suggesting that all of them are target for the action of estrogen and Progesterone. Higher ER $\alpha$  and PR immunolabeling intensity was found in alveolar epithelium than connective tissue. On other hand higher ER $\alpha$  intensity of immunolabeling was found in ductal epithelium in anestrus than proestrus, estrus and diestrus. The PR immunolabeling intensity in connective tissue was higher in estrus than, proestrus, diestrus and anestrus. The affinity for ER and PR was similar in both experiments. The ER and PR concentration (fmol/prot) was lower in bitches in diestrus than in proestrus and estrus. The pattern of the distribution and concentration of ER and PR in our study are related to P4 circulating levels in agreement with the result reported for ER but not for PR. In prepubertal bitches ER y PR concentration were lower than in adults, in agreement with the scarce development of mammary tissue. In intact bitches with mammary tumours the ER $\alpha$  immunolabeling intensity was higher in benign than malignant tumours and hyperplasias, and was higher in connective tissue than in both epithelia. In benign tumours also was higher in connective tissue than both epithelia. The PR immunolabeling intensity in ductal epithelium tended to be higher in hyperplasia than in malignant tumours. In spayed bitches no differences in the parameters studied were found. Higher ER concentration in benign than malignant and hyperplasias was found and PR concentrations were similar in the different tumours. By binding assay all tumours samples were ER and PR positive suggesting that the pathways associated with estrogens and progestins can provide effective targets for treatment of mammary tumours.

# INTRODUCCIÓN

## 1.1. La hembra canina animal de compañía y modelo experimental para el estudio del cáncer de mama

El perro doméstico procede muy probablemente del lobo (*Canis lupus*), esta hipótesis esta basada en estudios sobre la morfología, el comportamiento y la genética de ambas especies. El perro así como el lobo son animales sociales y establecen jerarquías en el seno de la manada (Evans & White, 1997). Es difícil establecer con precisión el origen del perro, los restos más antiguos datan de 15.000 años A.C. en Rusia, fecha que coincide con la aparición del perro en las primeras pinturas rupestres y las primeras domesticaciones se sitúan en torno al año 5000 A.C (Manteca, 2003). Actualmente el perro doméstico (*Canis familiaris*) tiene un rol fundamental como animal de compañía, generando un fuerte vínculo con el hombre dado su comportamiento social, una gran capacidad de adaptación, utilizándose también como animal de trabajo, en la caza, seguridad y también como lazarillo para personas no videntes.

La hembra canina desarrolla espontáneamente enfermedades tales como diabetes, hipotiroidismo y cáncer, enfermedades que también afectan a los seres humanos por lo que constituyen excelentes modelos experimentales para el estudio de las enfermedades que comparten. Los tumores mamarios rara vez ocurren en yegua, vaca, oveja, cabra, y cerda mientras que en perras el cáncer de mama tiene una alta prevalencia (Munson & Moresco, 2007). Los ciclos estrales en la yegua, vaca, cabras, y la cerda se producen durante todo el año y se caracterizan por una fase folicular seguida de una fase luteal más corta que en la perra; esta diferencia en la exposición hormonal junto con la ocurrencia más regular de preñeces y que no llegan a una edad avanzada pueden contribuir a la baja prevalencia de tumores mamarios en las especies antes mencionadas en relación a la perra (Munson & Moresco, 2007). El estudio del cáncer de mama en la perra figura entre los modelos experimentales naturales propuestos por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Esto es debido a similitudes epidemiológicas, clínicas evolutivas, morfológicas, hormono dependencia (Martín de las Mulas & Reymundo, 2000) y semejanzas a nivel molecular relativas a la expresión de los receptores esteroideos (Queiroga et al. 2011, Salas & Romero, 2011) con el carcinoma de mama humano. A pesar de tener diferentes expectativas de vida, la edad media de inicio de síntomas de tumores de mama es comparable entre la mujer y la perra, para la mujer después de los 40 años y en la perra después de los 6 años, además el pico de incidencia de la enfermedad es también comparable entre las dos especies, en la mujer 50-58 años y en la perra 8-11 años (MacEwen et al. 1982). El modelo de la perra permite realizar estudios de significación estadística en periodos de tiempo cortos (Ferreira et al. 2010).

La incidencia de los tumores de mama es elevada en humanos y caninos. De acuerdo con Brodey et al. (1983) de todos los tumores que se presentan en la perra el 42% son tumores mamarios comparado con la mujer que representan un 27% de todos los tumores. La perra tiene una mayor incidencia de tumores mamarios que la mujer y otros animales domésticos; la incidencia anual de carcinomas mamarios en la perra es de 2 a 3 veces mayor que en los seres humanos (Scheneider, 1970). En la perra, el comportamiento biológico de los tumores de mama es maligno en la mitad



de los casos (Martín de las Mulas & Reymundo, 2000). En el Uruguay, en la mujer los tumores mamarios malignos presentan alta incidencia y mortalidad, se reportó en entre 2002-2006 8798 de casos (Barrios et al. 2010) Aunque los esquemas de clasificación de los carcinomas de mama humanos y caninos presentan diferencias, la morfología histológica es muy similar. Los factores pronósticos, entre ambas especies también son similares, en medicina humana son factores pronóstico, el tamaño tumoral, estado ganglionar, presencia de metástasis, tipo y grado histológico, y grado de diferenciación nuclear. Del mismo modo en Medicina Veterinaria se considera el grado de infiltración y grado histológico de malignidad, que incluye el grado de diferenciación, pleomorfismo nuclear, índice mitótico. Por lo tanto la utilización de la perra como modelo natural del tumor mamario permite el estudio de la enfermedad y contribuye al conocimiento de la etiología y al tratamiento (Martín de las Mulas & Reymundo, 2000). Si bien los tumores son procesos patológicos que se presentan en todas las especies de animales domésticos, estos solo ocurren frecuentemente en la perra y en menor grado en la gata, siendo raro en otras especies. El tumor mamario canino es más común en la perra con una incidencia entre un 25-50% de todos los tumores (Theilen & Madewell, 1979; Mangieri et al. 1994; Pérez Alenza et al. 2000). El creciente interés de la sociedad por el bienestar animal ha causado una mayor demanda y preocupación por parte de los dueños de mascotas en el diagnóstico temprano y tratamiento de las enfermedades que afectan a sus animales. Dada la elevada incidencia de los tumores mamarios en la perra y por ser considerada como un modelo para el estudio del cáncer de mama es importante conocer las características de la glándula mamaria normal.

## **1.2. La glándula mamaria canina normal**

La hembra canina posee entre 4 y 6 pares de glándulas mamarias, distribuidas a lo largo del tórax y el abdomen. Dos pares craneales denominados torácicos (anterior y posterior), dos abdominales (anterior y posterior) y el par caudal inguinal (Argyle, 2000).

La glándula mamaria es un órgano cuya estructura morfológica y función está estrechamente vinculada con el sistema endocrino (Derivaux & Ectors, 1984). Las glándulas mamarias están presentes en ambos sexos y solo alcanzan su completo desarrollo en la hembra. Son glándulas túbulo-alveolares (Banks, 1986), localizadas en el tejido subcutáneo, después de la pubertad ofrece un aspecto arracimado cuyo parénquima está formado por la aglomeración de lóbulos independientes separados unos de otros por tabiques de tejido conectivo por los cuales circulan vasos sanguíneos, linfáticos y nervios (Derivaux & Ectors, 1984). Cada mama tiene entre 7 y 16 aberturas de ductos, y cada ducto eventualmente forma un lóbulo en la glándula adulta y actúa como una unidad funcional independiente dentro de la glándula (Sorenmo et al. 2011). Su función básicamente es la nutrición de los neonatos y conferirles inmunidad pasiva (Derivaux & Ectors, 1984; Cunningham, 2003). En general la glándula mamaria presenta una fase de desarrollo del sistema canalicular y lobuloalveolar y una fase de actividad secretora importante para el mantenimiento de la lactación (Derivaux & Ectors, 1984).

Las glándulas mamarias están formadas por células epiteliales alveolares secretoras y la porción inicial de los conductos intralobulares (Banks, 1986). La porción secretora de las glándulas, drena a través del sistema ductal, formado por un

epitelio columnar y cuboidal no secretor. El tejido conectivo da soporte a los alvéolos y a los conductos pequeños. Rodeando los grandes conductos, hay bandas de músculo liso y fibras elásticas. Se pueden encontrar células mioepiteliales entre las células del epitelio alveolar y la membrana basal (Solano-Gallego, 2010). Los conductos intralobulillares se reúnen formando los interlobulillares que se reúnen en los senos galactóforos, que están en comunicación con el pezón (Cunningham, 2003). En la glándula mamaria en reposo, los lobulillos mamarios están formados sólo por los conductos excretores y sus ramificaciones, en la glándula mamaria activa, el número de alvéolos aumenta a expensas de la disminución del tejido conectivo (Banks, 1986)

El desarrollo de la glándula mamaria en la vida posfetal comienza en la pubertad (Cunningham, 2003). El eje hipotálamo-hipófisis-ovarios está involucrado en el desarrollo y función de la glándula mamaria. En la perra después de la pubertad, la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) del hipotálamo estimula la síntesis y liberación de las gonadotropinas hipofisarias. La hormona folículo estimulante (FSH) estimula el desarrollo de los folículos ováricos y estos sintetizan estrógenos (E), la hormona luteinizante (LH) produce la luteinización celular y la formación del cuerpo lúteo responsable de la síntesis de progesterona (P4). Los E son responsables del desarrollo y ramificación de los conductos y la P4 estimula el desarrollo lóbulo-alveolar (Cunningham, 2003). Además el crecimiento del tejido mamario normal es estimulado por factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ) (Perez Alenza et al.2000) a través de sus receptores (Rutterman & Misdorp, 1993)

Durante la gestación, la glándula mamaria sufre un gran desarrollo; los conductos excretores se alargan y ramifican originándose numerosos alvéolos glandulares, el tejido conectivo interlobulillar disminuye, pierde células adiposas y aumenta su vascularización (Di Fiore, 1981). Los altos niveles de P4 circulantes durante la gestación favorecen la formación de lobulillos y alvéolos secretores. Los niveles basales de prolactina también contribuyen al desarrollo del epitelio lóbulo-alveolar. La hormona del crecimiento (GH) y los esteroides adrenales (cortisol) son responsables del desarrollo de los conductos (Cunningham, 2003).

### **1.3. Ciclo Reproductivo de la perra**

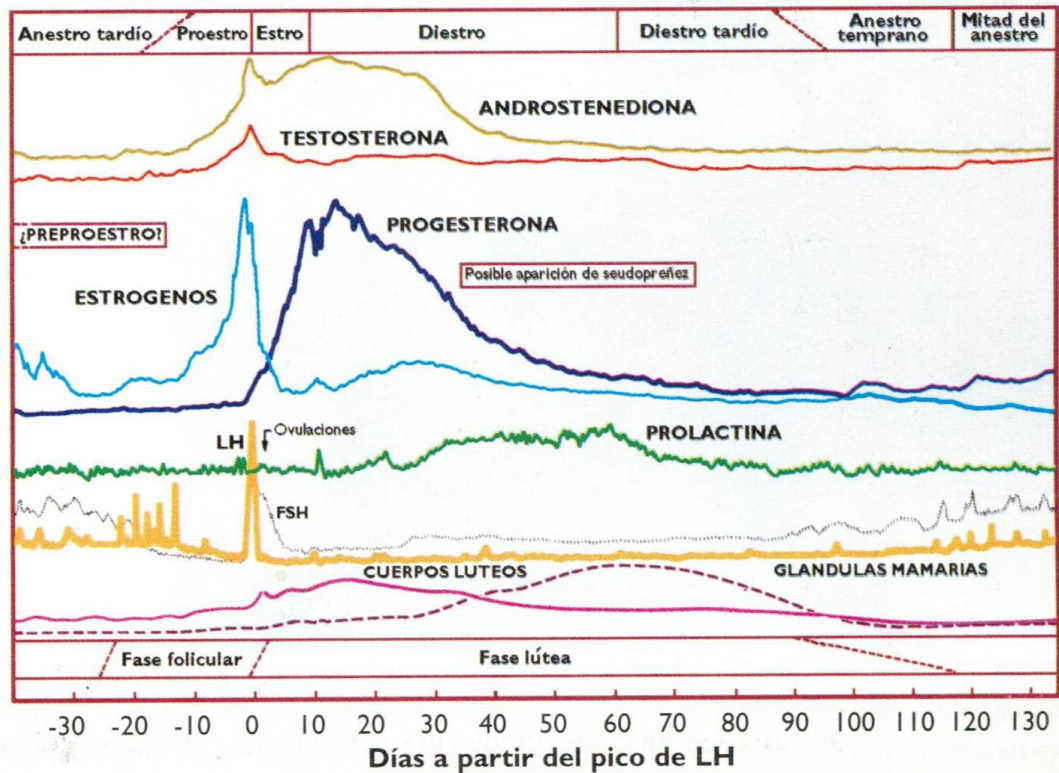
La perra es monoéstrica no estacional, y se distingue por tener intervalos prolongados de actividad e inactividad sexual (Feldman & Nelson, 2007). Llega a la pubertad cuando alcanza el peso del adulto, lo que sucede entre los 6 y 12 meses de edad, dependiendo de la raza; las perras de razas de porte pequeño en general tienen su primer celo alrededor de los 6 meses de edad, mientras que las de razas grandes lo hacen alrededor del año, normalmente el primer celo ocurre sin relación con la época del año. En la perra adulta el intervalo del ciclo reproductivo es en promedio 7,5 meses, con un rango de 5 a 12 meses (Stabenfeldt & Edqvist, 1999; Concannon, 2011). La raza tiene un efecto significativo sobre el intervalo del ciclo reproductivo, la raza Basenji cicla cada 12 meses, mientras que el Pastor Alemán y el Rottweiler lo hacen cada 4-5 meses (Edens & Health, 2005; Feldman & Nelson, 2007). El ciclo reproductivo de la perra puede dividirse en cuatro estadios: proestro, estro, diestro y una etapa de inactividad sexual o anestro (Wanke & Gobello, 2006; Feldman & Nelson, 2007; Concannon, 2011).

El proestro tiene una duración promedio de 9 días y se define clínicamente como el periodo de tiempo desde el comienzo de la descarga vulvar hemorrágica hasta la primera aceptación del macho (Wanke & Gobello, 2006; Concannon, 2011). Se caracteriza por un crecimiento de los folículos ováricos, y síntesis y liberación de E a la circulación general. Los E son responsables de la secreción vaginal, y atracción de los machos en la que también participan las feromonas y preparación uterina para la gestación (Feldman & Nelson, 2007). Los niveles de E séricos aumentan de 5 a 15 pg/mL, alcanzando valores máximos de 40 a 120 pg/mL (Figura 1) (Concannon, 2011). La concentración de P4 durante el proestro es basal (0,2-0,8 ng/mL) (Concannon et al. 2009). La citología vaginal se caracteriza por presentar numerosas células parabasales e intermedias pequeñas y grandes. Los neutrófilos y glóbulos rojos son habituales en cantidades variables. El proestro finaliza cuando la concentración de P4 sérica basal comienza a elevarse y la hembra permite el apareamiento (Edens & Health, 2005; Feldman & Nelson, 2007).

El estro tiene una duración promedio de 9 días y el comportamiento de la perra cambia de la agresividad a la pasividad aceptando el apareamiento (Concannon, 1983; Concannon, 2011). La descarga vulvar sanguinolenta disminuye y se torna de un color más claro. La vagina se vuelve blanda y flácida para favorecer la penetración del macho (Wanke & Gobello, 2006; Feldman & Nelson, 2007). El inicio del estro está marcado por un aumento de P4 sérica, alcanzando valores mayores de 1 ng/mL hasta 3 ng/mL, durante el pico preovulatorio de LH (considerado día cero) (Figura 1). Después del día 3, la concentración de P4 sérica alcanza valores de 10 a 25 ng/mL. La concentración de E disminuye a valores de 10-20 pg/mL (Concannon, 2011). La citología vaginal en estro se caracteriza por presentar más del 80 % de células superficiales y anucleares y ausencia de neutrófilos. Puede o no haber glóbulos rojos. El estro finaliza cuando la hembra no acepta el apareamiento (Feldman & Nelson, 2007).

El diestro tiene una duración promedio de 60 a 100 días. La vulva retoma su tamaño normal (Feldman & Nelson, 2007). La concentración de E varía entre 15 a 30 pg/mL (Figura 1). En esta fase hay un predominio de la P4 sobre los E. Los niveles de P4 sérica alcanzan valores de 15 a 90 ng/mL durante los primeros 30 días, luego se mantienen constantes 1 a 2 semanas y finalmente, a los 70-90 días después del pico preovulatorio de LH la P4 disminuye a niveles basales (<1 ng/mL) (Figura 1) (Wanke & Gobello, 2006; Concannon, 2011). En diestro, la vagina presenta bajo número de células superficiales y alto número de células intermedias pequeñas y parabasales. Se pueden observar neutrófilos y detritos. (Edens & Health, 2005; Feldman & Nelson, 2007).

El anestro es el intervalo comprendido entre el final del diestro y el inicio del proestro (Jeffcoate, 2000). Tiene una duración entre 7-20 semanas después que la P4 disminuye por debajo de 1-2 ng/mL. En este periodo no hay manifestaciones evidentes de actividad ovárica (Concannon, 2011). La perra no manifiesta cambios físicos característicos ni conducta sexual. La vulva se encuentra pequeña y sin descargas vaginales (Wanke & Gobello, 2006). La vagina presenta células parabasales e intermedias. No hay glóbulos rojos. Pueden haber o no neutrófilos (Edens & Health, 2005).



**Figura 1.** Representación esquemática de los cambios endócrinos típicos que se producen en el ciclo reproductivo de la hembra canina (Concannon, 2011).

#### 1.4. Cambios histológicos en la glándula mamaria de la hembra canina durante el ciclo reproductivo

El desarrollo y crecimiento de la glándula mamaria está bajo la influencia de los cambios cíclicos de las hormonas esteroideas ováricas (Munson & Moresco, 2007). En la perra pre-púber, la glándula mamaria es rudimentaria con estructuras de conductos que se extienden desde la superficie hasta la dermis en la base del pezón. Estos conductos están pobremente diferenciados y están rodeados por una o más capas de células epiteliales quiescentes. En perras adultas en proestro, el epitelio de los conductos prolifera para formar estructuras alargadas y dilatadas. En estro, los conductos y alvéolos mamarios proliferan en la dermis del pezón y se observa crecimiento de tejido conectivo y capilares con extravasación de glóbulos rojos e infiltración de células inflamatorias. En diestro, la glándula mamaria presenta un desarrollo lóbulo-alveolar completo y en anestro, los bajos niveles de esteroides ováricos resultan en una involución del tejido mamario, observándose pocos grupos alveolares rodeando los conductos colapsados (Nelson & Kelly, 1974; Wanke & Gobello, 2006; Rehm et al. 2007; Santos et al. 2010).

#### 1.5. Aspectos generales de los tumores mamarios caninos.

Como fue mencionado anteriormente, en la perra, el tumor mamario es el más común (Theilen & Madewell, 1979; Mangieri et al. 1994; Pérez Alenza et al. 2000). Su importancia reside en la alta incidencia de esta patología, que altera la calidad y expectativa de vida del paciente. Según Moulton (1990), tumor es una masa o tejido

anormal de crecimiento excesivo e incoordinado que no responde a los mecanismos normales de control, alejándose del fenotipo normal y su crecimiento persiste aún cuando termine el estímulo que lo provocó. El estado de diferenciación de un tumor puede ser determinado histológicamente. Se basa en la presencia o aparición de células neoplásicas, su organización y su asociación con el estroma de apoyo (Ehrhart & Powers, 2009).

El diagnóstico clínico se basa en la evaluación de las características tumorales (tamaño, adherencia y ulceración) y en el establecimiento del estadio clínico (afectación local, presencia de metástasis regionales, o a distancia) el estudio citológico prequirúrgico es orientativo y el diagnóstico definitivo es el histopatológico. El protocolo quirúrgico y terapéutico de los distintos casos de tumores mamarios caninos es fundamental; debido a que la variabilidad de los mismos compromete la evolución y pronóstico de esta patología (Pérez Alenza & Martí Angulo, 2011). Las características clínicas determinan el pronóstico y el tratamiento previo a la cirugía. La información histopatológica y clínica establecen el pronóstico definitivo y el tratamiento postquirúrgico adyuvante si corresponde (Pérez Alenza & Pena, 2000).

La localización tumoral puede ser en cualquiera de las glándulas mamarias y en cualquier combinación; no obstante la localización más frecuente corresponde a las abdominales posteriores e inguinales, con similar frecuencia en ambos lados (Else & Hannant, 1979; Mangieri et al. 1994; Donnay et al. 1995a; Martín de las Mulas & Raymundo, 2000; Lana et al. 2007). La frecuencia de tumores mamarios aumenta desde las mamas torácicas 15-20%, abdominales anteriores 20% y abdominales posteriores e inguinales 60% de los casos. Los porcentajes más altos se corresponden con las mamas que más trabajan, traumatizan y sufren mastitis, también son las mamas que tienen mayor cantidad de tejido mamario siendo las propensas al desarrollo de tumores (Mangieri et al. 1994; Sorenmo, 2003).

De acuerdo al diagnóstico histopatológico entre 41 y 53% de los tumores mamarios de perra son considerados malignos (Pérez Alenza et al. 2000). La presentación clínica de los tumores es variable, se presentan como un solo nódulo o múltiples, los cuales pueden ser del mismo o diferente tipo citológico (Ortega et al. 2013). El tumor puede ser de crecimiento lento, estacionario o rápido; puede ser invasivo, ulcerados, o adheridos a planos tisulares profundos lo que evidencia signos de malignidad (Pérez Alenza et al. 2000), además, pueden producir metástasis, y recidivar después de ser extirpados (Moulton, 1990). El órgano blanco para la metástasis de tumores mamarios malignos es el pulmón y con menor frecuencia el hígado y otros órganos (Mangieri et al. 1994). El adenocarcinoma es el tipo histológico maligno más común en los tumores mamarios caninos (Nelson & Couto, 1998). Los tumores benignos presentan un crecimiento lento y, generalmente son encapsulados (Moulton, 1990), los más frecuentes son adenomas simples, compuestos por células epiteliales o células mioepiteliales y adenomas complejos, compuestos por células epiteliales y mioepiteliales (comunes), papiloma ductal, fibroadenoma y tumor mixto benigno (Misdorp et al. 1999). Las lesiones hiperplásicas/displasias mamarias se caracterizan por la proliferación del epitelio ductal o secretor o de las células mioepiteliales, que recuerda la hiperplasia fisiológica que se produce durante la gestación, con atipias histológicas, que se corresponde con un incremento del número de células (Hampe & Misdorp, 1974).

## 1.6. Clasificación de los tumores y lesiones mamarias en la perra

La clasificación establecida por la OMS, cuyo objetivo es la estandarización internacional de la terminología y la nomenclatura de los tumores mamarios caninos (Misdorp et al. 1999), combina la clasificación morfológica descriptiva con un criterio pronóstico, clasificando los tumores mamarios más frecuentes en grados crecientes de malignidad (ej. Carcinoma *in situ*, Carcinoma complejo, Carcinoma simple etc.). Posteriormente se incorporaron modificaciones de acuerdo con el tejido de origen: epitelial, mioepitelial, o mesenquimal (Misdorp, 2002). La mayoría de los tumores de glándulas mamarias son de origen epitelial simple, algunos sin embargo, pueden tener más de un tipo de tejido como ser tejido epitelial y mioepitelial (tumores complejos) o con áreas de cartílago y hueso (tumores mixtos). Recientemente, la clasificación de la OMS, fue revisada y actualizada (Goldschmidt et al. 2011), incluyéndose algunos cambios en la nomenclatura y clasificación como por ejemplo el carcinoma cribiforme y el comedocarcinoma, los cuales estaban anteriormente dentro de los carcinomas *in situ*. Se incorporaron otras nuevas entidades recientemente descritas como el carcinoma inflamatorio o el carcinoma micropapilar. Hiperplasia lobulillar regular (adenosis) (Goldschmidt et al. 2011); pero los criterios generales establecidos para la clasificación de los tumores mamarios no han cambiado (Cuadro I)

**Cuadro I** Clasificación de los tumores mamarios según Misdorp et al. (1999). Por columna los tumores malignos están en orden creciente de malignidad (arriba hacia abajo).

Tumores Malignos	Tumores Benignos	Lesiones no clasificadas
Carcinoma <i>in situ no infiltrativo</i>	Adenoma simple	Displasia mamaria
Carcinoma complejo	Adenoma basaloide	Hiperplasia ductal
Carcinoma simple	Adenoma complejo	Hiperplasia lobular (lobulillar)
Carcinoma túbulo-papilar	Fibroadenoma	Fibrosis focal,
Carcinoma sólido	Papiloma ductal	Ectasia ductal
Carcinoma anaplásico	Tumor mixto benigno	Ginecomastia
<b>Tipos especiales de carcinomas</b>		
Carcinoma de células fusiformes.		
Carcinoma con diferenciación escamosa		
Carcinoma mucinoso		
Carcinoma rico en lípidos		
<b>Sarcomas</b>		
Fibrosarcoma		
Osteosarcoma		
Condrosarcoma		
Carcinosarcoma		

## 1.7. Factores asociados al desarrollo del cáncer mamario

El desarrollo de neoplasias en la glándula mamaria es hormono-dependiente, el riesgo de padecer tumores mamarios es 0,05% para las perras esterilizadas antes del primer celo, 8% después del primero y 26% después de 2 o más celos, indicando

el importante rol de las hormonas esteroides ováricas en la carcinogénesis mamaria temprana (Sorenmo, 2003; Sorenmo et al. 2011). El desarrollo de tumores mamarios se previene mediante ovariectomía antes de los dos años y medio de edad; en apoyo de esto se reportó, que del 99,5% de los tumores mamarios de perras, el 90% son en enteras (Misdorp, 1988; Rutteman, 1988; Gobello & Corrada, 2001). La ovariectomía, después de los dos años de edad reduce el riesgo de desarrollar tumores benignos pero tiene poco o ningún efecto sobre la aparición de tumores malignos, presentando un riesgo similar que en perra no castrada (Schneider et al. 1969). La ovariectomía efectuada en el momento o después de la remoción quirúrgica del tumor no ha demostrado tener influencia sobre el curso de la enfermedad clínica y sus metástasis (Pérez Alenza et al. 2000). La sobrevivencia en perras castradas simultáneamente o dentro de los dos años de realizada la mastectomía fue un 45% mayor, que en perras enteras u ovariectomizadas al menos dos años antes de la aparición del tumor (Schneider et al. 1969; Misdorp, 2002).

En el Hospital de Facultad de Veterinaria (UdelaR) entre los años 2005 a 2010, los tumores de mama de perra de 6 a 10 años representaron el 68 % de todos los tumores (Pessina et al. 2012) incidencia similar a la reportada internacionalmente. En los países anglosajones donde es habitual la ovariectomía, la incidencia de los tumores de mama es prácticamente inexistente; esto habla del importante rol que juegan las hormonas esteroides ováricas sugiriendo que probablemente los cambios cruciales para la carcinogénesis mamaria se producen entre el primer y cuarto celo; aunque la neoplasia se haga visible macroscópicamente varios años después (Knapp et al. 2002; Kitchel, 2003; Hedlund, 2009).

Los machos raramente son afectados (representando un 1% de incidencia de los tumores) generalmente, los tumores son malignos (Gobello & Corrada, 2001) y están asociados con la presencia de un tumor testicular en las células de Sertoli que produce E (Schneider et al. 1969; Brodey et al. 1983; Moulton et al. 1990; Misdorp, 2002; Lana et al. 2007). La menor incidencia en machos se explicaría por el escaso desarrollo de tejido mamario. En la perra, la edad media al diagnóstico es de 10 años, no es frecuente la aparición de tumores mamarios en perras menores de 4 años (Misdorp, 1988), sin embargo las hiperplasias se presentan entre 2-4 años (Pérez Alenza et al. 2000). A los 6 años el riesgo de desarrollar tumores mamarios aumenta (Pérez Alenza et al. 2000; Sorenmo et al. 2009) y después de los 14 años la incidencia de desarrollo de tumores mamarios benignos disminuye y aumenta la de los malignos (Moulton et al. 1990).

Dentro de las razas de pequeño porte la Caniche, Caniche Toy, Maltes, Chihuahua, Beagle, Dachshund, West Highland White Terrier, Yorkshire Terrier, Bichon Frise tienen mayor riesgo para el desarrollo de tumores mamarios. De las de talla mediana la English Springer y Cocker Spaniel, son más afectadas y las de talla grande la Setter Irlandés, Pointer, Lebel Afgano, Ovejero Alemán (Sorenmo et al. 2011). Sin embargo en contraposición a Sorenmo et al. (2011), se reportó que razas como la Chihuahua y la Bóxer presentan bajo riesgo de presentar tumores mamarios (Hedlund, 2009). En general hay una mayor prevalencia de tumores malignos en razas de talla grande que de talla pequeña (Solano-Gallego, 2010). La sobre o subrepresentación de una raza dentro de una población depende fundamentalmente de la composición de dicha población lo que explicaría diferentes opiniones en cuanto a la existencia a la predisposición racial para el desarrollo de tumores mamarios

(Sorenmo et al. 2011). El hecho de que ciertas razas tienen un mayor riesgo de desarrollar tumores mamarios sugiere un componente genético, sin embargo una mutación genética común no se ha reportado en perras. Por otro lado se ha logrado establecer que muchos de los animales con tumor mamario presentan expresión disminuida del gen supresor de la proliferación celular p53 y sobre expresión de protooncogenes como el c-erbB2 (Sorenmo, 2003).

La obesidad y una dieta rica en grasas en los primeros años de vida han sido asociadas con un incremento del riesgo de padecer tumores mamarios y con peor pronóstico en la evolución de la enfermedad (Sorenmo, 2003). Se encontró un descenso en la incidencia de tumores mamarios en perras delgadas entre los 9 y 12 meses de edad en relación a las perras con dieta rica en grasas y obesidad, sugiriendo que el factor nutricional a edad temprana está involucrado en el desarrollo del tumor mamario canino (Sonnenschein et al. 1991).

## **2. ANTECEDENTES ESPECIFICOS**

### **2.1. Hormonas esteroideas ováricas**

Los E y P4 tienen un rol importante en el desarrollo, diferenciación sexual, crecimiento, pubertad, en la conducta sexual, la receptividad del útero al embrión, la preñez, el parto y la lactación. El desarrollo, crecimiento y función de la glándula mamaria, está bajo los efectos de estas hormonas (Ing et al. 1993). Dichas hormonas son sintetizadas a partir del colesterol, bajo el control de las gonadotropinas. Los E y P4 son mensajeros químicos, sintetizados principalmente en los ovarios circulan en sangre unidos a globulinas específicas o a la albumina sérica. Debido a su naturaleza lipídica, estas hormonas atraviesan las membranas celulares por difusión pasiva (Clark & Mani, 1994).

Los progestágenos (medroxiprogesterona, acetato de megestrol) utilizados para suprimir el estro, promueven cambios hiperplásicos y neoplásicos en las glándulas mamarias, aumentando el riesgo de aparición de tumores mamarios (Misdorp, 1988; Stovring et al. 1997; Munson & Moresco, 2007). Los tratamientos con estrógenos utilizados para la interrupción de la preñez también aumentan el riesgo de tumores mamarios, pero el mayor riesgo en la aparición de tumores malignos se produce cuando se combina el uso de progestágenos con estrógenos o cuando se utilizan altas dosis de estas hormonas (Giles et al. 1978; Conncanon et al. 1981; Munson & Moresco, 2007). El crecimiento del tejido tumoral también involucra factores de crecimiento como el EGF, factor de crecimiento insulina similar tipo I (IGF-I) y TGF- $\alpha$ , induciendo la patogénesis de los tumores mamarios mediante un incremento en la proliferación y diferenciación celular (Ruttermann & Misdorp, 1993; Mol et al. 1996).

### **2.2. Mecanismo de acción de los estrógenos y la progesterona**

Los E y P4 ejercen sus acciones en los tejidos blanco a través de la unión a proteínas receptoras específicas (RE y RP, respectivamente). La unión de la hormona al receptor es de alta afinidad, específica y saturable (número de receptores finito) (Clark & Mani, 1994). Los RE y RP son proteínas de estructura compleja, miembros



de una súper familia de receptores nucleares, que comparten una estructura molecular básica formada por distintos dominios organizados en regiones funcionales: un dominio que interactúa con miembros del aparato de transcripción; otro dominio que se une al DNA en los elementos de respuesta hormonal, un dominio de unión a proteínas de shock térmico, y un dominio de unión al ligando involucrado en la dimerización del receptor y en la interacción con factores de transcripción. El complejo hormona-receptor actúa como factor de transcripción activando o reprimiendo genes específicos (síntesis de proteínas, RNAs) (Couse & Korach, 1999; Nilsson & Gustafsson, 2002).

Además de las acciones genómicas de los E y P4 realizadas a través de sus receptores nucleares se han descrito acciones no genómicas a través de receptores de membrana (Revelli et al. 1998); estas acciones parecen ser más rápidas que las realizadas a través de receptores nucleares y no son sensibles a inhibidores de la transcripción (Bramley, 2003; Stormshak & Bishop 2007).

En la mayoría de las especies de mamíferos incluida la perra, se han descrito dos tipos de RE denominados RE alfa ( $RE\alpha$ ) y RE beta ( $RE\beta$ ). Estas proteínas son producto de dos genes diferentes, poseen alta homología en los dominios de unión al DNA, homología parcial en los dominios de unión a la hormona y escasa homología en los dominios de activación de la transcripción (Kuiper et al. 1996; Conneely, 2001). El  $RE\alpha$  es predominante en tracto reproductivo de la hembra, su ablación produce infertilidad por defectos en: comportamiento sexual, regulación neuroendocrina de las gonadotrofinas, ovulación, función uterina y morfogénesis pospuberal de la glándula mamaria. El  $RE\beta$  es predominante en el ovario donde el  $RE\alpha$  se expresa en menor cantidad; ambos receptores son importantes para el normal desarrollo ovárico así como para la fertilidad de la hembra (Conneely, 2001; Nilsson & Gustafsson, 2002; Martín de las Mulas et al. 2004).

En la mayoría de las especies de mamíferos; así como en la perra se han descrito dos isoformas del RP; llamadas A y B que derivan de un mismo gen con sitios alternativos de regulación de su expresión (Conneely, 2001). Las dos isoformas tienen similar dominio de unión a la hormona y al DNA pero presentan diferencias en el dominio de activación de la transcripción. El RP-B tiene una secuencia adicional de aminoácidos en la región N-terminal que tiene una función de activación de la transcripción que está ausente en el RP-A (Conneely, 2001). El RP-A está implicado en las respuestas a la progesterona en el tracto reproductivo de la hembra, mientras que la isoforma B es necesaria para provocar la respuesta proliferativa normal y de diferenciación de la glándula mamaria (Conneely et al. 2003; Conneely et al. 2008).

### **2.3. Regulación de los receptores de estrógenos y progesterona**

Las acciones de los E y P4 que implican la transcripción de genes se realizan a través de receptores nucleares específicos. La respuesta de los tejidos efectora a los E y P4 depende de la concentración de la hormona circulante y la concentración tisular de RE y RP (Clark et al. 1992; Meikle et al. 2004). La concentración de RE y RP está regulada por las propias hormonas. Estas hormonas realizan la regulación estimulando o inhibiendo la expresión de genes, incluidos los genes que codifican a sus propios receptores, es decir los complejos hormona-receptor pueden activar o

reprimir genes incluyendo los genes de RE y RP. En general se acepta que los E unidos a su receptor estimulan la síntesis de los RE y RP y de los mRNA respectivos (regulación positiva), mientras que la P4 unida a su receptor inhibe la expresión de ambos receptores, (regulación negativa) (Ing et al. 1993; Clark & Mani, 1994). En el miometrio de ovejas adultas ovariectomizadas y tratadas con E y P4, se demostró que el tratamiento con E aumento los RE y RP y el tratamiento con P4 disminuyó ambos receptores (Rexroad, 1981). En ovejas ovariectomizadas el tratamiento con estradiol aumento el mRNA de RE y RP, pero la tasa de transcripción de RE no se modificó (Ing et al. 1996), probablemente debido a que los E aumentan la vida media del mRNA por un mecanismo post transcripcional (Ing & Ott, 1999; Ing, 2005). Este aumento de la vida media del mRNA de RE $\alpha$  sería debido a que los E estimulan la síntesis de proteínas como la AUF1p45 que se unen al mensajero del receptor estabilizándolo (Ing et al. 2008). La regulación en menos del RE $\alpha$  sería debida a la inducción de la proteólisis (Preisler-Mashek et al. 2002). La proteólisis de los receptores nucleares es realizada en el proteosoma 26S (enzima multicatalítica) (Powers et al. 2010).

El efecto estimulador de los E e inhibidor de P4 sobre la expresión de RE y RP concuerda con el perfil de distribución de RE y RP encontrados durante el ciclo estral (en diferentes tejidos efectores y diferentes especies). Los niveles de RE y RP son altos alrededor del estro, cuando predominan los E, mientras que en la fase luteal cuando predomina la P4 los niveles de ambos receptores son bajos (Clark & Mani, 1994; Meikle et al. 2004). Esto se ha demostrado en útero, hipófisis y cérvix de la oveja (Miller et al. 1977; Rexroad, 1981; Tasende et al. 2005; Rodríguez-Piñón et al. 2008) y en útero de perra (Vermeirsch et al. 2002; Donnay et al. 1995b), y glándula mamaria de perra (Donnay et al. 1995b).

#### **2.4. Receptores de estrógenos y progesterona en la glándula mamaria normal**

Como ya se dijo, las hormonas esteroides ováricas tienen un rol importante en el desarrollo, crecimiento y función de la glándula mamaria. Estas acciones de los E y la P4 se ejercen a través de sus receptores nucleares específicos (RE, RP respectivamente) (Ing et al. 1993; Clark & Mani, 1994). Los E y P4 además, de ser esenciales para el desarrollo y función de la glándula mamaria normal, están implicados en el desarrollo de cáncer de mama (Henderson et al. 1988, Conneely, 2001; Nilsson & Gustafsson, 2002; Anderson, 2002). Se demostró que pacientes con deficiencia de aromatasa, (fundamental para la síntesis de E) no desarrollan tejido mamario a la pubertad, sin embargo el tratamiento con E induce desarrollo mamario normal, demostrando que los E son fundamentales para el desarrollo de glándula (Nilsson & Gustafsson, 2002). Ratones RE $\alpha$  knock-out tienen desarrollo defectuoso de la glándula mamaria debido a la falta del efecto estimulador de los E sobre el epitelio y el estroma mamario. Este efecto de los E puede ser directo o indirecto a través de factores de crecimiento como el EGF, el RP o el receptor de prolactina (Nilsson & Gustafsson, 2002). Por otro lado, se reportó que ratones con RP o receptor de prolactina knock-out en epitelio mamario, tienen inadecuada formación de alveolos y conductos mamaros (Conneely et al. 2008) demostrando que la P4 y la prolactina están involucradas en el desarrollo y remodelación de la glándula mamaria.

Los RE y RP se han estudiado por inmunohistoquímica en tejido mamario normal en diferentes especies. Esta técnica permite identificar, localizar y estimar la intensidad de inmunomarcado a los receptores, pero no los cuantifica. Inmunotinción a RE $\alpha$  y RP en tejido conectivo y epitelios alveolar y de conductos fue reportada en glándula mamaria normal de perra (Millanta et al. 2005) bovinos (Schams et al. 2003), ovinos (Colitti & Parillo, 2013) y a RE $\alpha$  en roedores (Shyamala et al. 2002). Sin embargo Manee-in et al. (2010) no encontraron tinción a RE $\alpha$  ni a RP en tejido conectivo en glándula mamaria de perras normales durante el ciclo reproductivo y sugieren que las células del tejido conectivo no serían blanco de acción de las hormonas esteroides ováricas. Tampoco se reportó tinción a RE $\alpha$  ni RP en tejido conectivo en la glándula mamaria de mujeres (Anderson, 2002), primates no humanos (Cheng et al. 2005) y cabras (Moroni et al. 2007).

Durante el ciclo reproductivo de la perra se reportó que la inmunotinción a RE $\alpha$  y RP en la glándula mamaria fue mayor en la fase folicular que luteal (diestro medio), los niveles más altos de P4 coincidieron con los niveles más bajos de ambos receptores (Manee-in et al. 2010). En anestro los niveles de RE $\alpha$  fueron similares a los del diestro y los de RP similares a los de la fase folicular y los niveles circulantes de P4 fueron basales (Manee-in et al. 2010). La concentración de RP fue menor en la fase luteal temprana (coincidente con los mayores niveles de P4 circulante) que en las otras fases del ciclo, la concentración de RE fue mayor en la fase luteal media que en los otros estadios del ciclo (Donnay et al. 1995b). En la glándula mamaria de mujeres y cabras no encontraron diferencias en la tinción a RP entre la fase folicular y luteal (Soderqvist et al. 1993; Moroni et al. 2007). Contrariamente, en la glándula mamaria de roedores reportaron que la tinción a RE $\alpha$  y RP fue menor en la fase luteal que en la fase folicular (Shyamala et al. 2002).

## **2.5. Receptores de estrógenos y progesterona en la glándula mamaria tumoral**

Como ya fue mencionado los RE y RP están implicados en el desarrollo de cáncer de mama (Conneely, 2001; Nilsson & Gustafsson, 2002; Anderson, 2002). Más del 70% de los tumores mamarios humanos son RE $\alpha$  positivos y su crecimiento depende de los estrógenos (Nilsson & Gustafsson, 2002). El RP unido a su ligando puede modular la expresión de la GH en la glándula mamaria contribuyendo a su proliferación y diferenciación; sin embargo durante la transformación maligna esta regulación se puede perder (Lantiga-van Leeuwen, 2000). La determinación de RE $\alpha$  por inmunotinción en tumores mamarios caninos es considerada un factor pronóstico, aceptado como una herramienta importante para la predicción y pronóstico de la terapia hormonal en el cáncer de mama (Misdorp, 1988; Nieto et al. 2000; Martín de las Mulas et al. 2005; Mariotti et al. 2013). La activación selectiva del RP-A podría limitar efectos proliferativos adversos de la P4 en el tejido glandular mamario (Conneely et al. 2008). Además la presencia de ambos receptores y sus concentraciones debe ser considerado como el principal responsable de la modulación de la respuesta de los tejidos diana a las hormonas esteroides ováricas y factores de crecimiento (Donnay et al. 1993).

En tumores benignos y malignos se detectó inmunomarcado a RE $\alpha$  en el núcleo de células epiteliales (Graham et al. 1999; Millanta et al. 2005, Manee-in et al. 2009), y mioepiteliales (Nieto et al. 2000; Martín de las Mulas et al. 2005; Millanta et al. 2005; Port Louis et al. 2012) y a RP en epitelios alveolar y de conductos (Martín de las Mulas et al. 2005; Millanta et al. 2005; Manee-in et al.

2009; Port Louis et al. 2012), y en tejido conectivo (Millanta et al.2005; Port Louis et al. 2012). Se considera que muestras de tejido mamario con un 5% de inmunomarcado a RE $\alpha$  y/o RP son positivas (Millanta et al. 2005; Martín de las Mulas et al.2000; Mariotti et al. 2013). En los tumores benignos el grupo más común fue RE $\alpha$  negativo, RP positivo y RE $\beta$  positivo; en los malignos el grupo más común fue RE $\alpha$  negativo, RP negativo y RE $\beta$  positivo y no hubo asociación entre el RE $\alpha$  y RP con RE $\beta$ , sugiriendo que el RE $\beta$  se expresa en los tumores benignos y malignos independientemente del status de RE $\alpha$  y RP (Port Louis et al. 2012). Por el contrario Martín de las Mulas et al (2005) reportó que el grupo de tumores benignos fue RE $\alpha$  y RP positivo y el de malignos fue RE $\alpha$  negativo y RP positivos. Sin embargo se reportó que 4 de 8 tumores benignos y 2 de 4 malignos fueron RE $\alpha$  y RP negativos (Manee-in et al. 2009). Geraldles et al (2000) no detectó inmunomarcado a RE $\alpha$  en tumores mamarios benignos ni malignos, pero los tumores malignos RP negativos tuvieron una tasa mayor de proliferación que los positivos, sugiriendo que la progresión a la malignidad en los tumores mamarios espontáneos se acompaña por una disminución en la dependencia hormonal. En displasias y tumores benignos el inmunomarcado a RE $\alpha$  fue mayor que en malignos; además, en perras con tumores malignos e historia clínica de pseudopreñez el inmunomarcado a RE $\alpha$  fue mayor que las que no tenían ese antecedente (Nieto et al. 2000). El inmunomarcado a RE $\alpha$  también fue mayor en hiperplasia y tumores benignos que en malignos y no hubo diferencia en el inmunomarcado a RP entre displasias y tumores benignos pero fue menor en los malignos (Millanta et al. 2005).

Además, la concentración de RE y RP en tumores mamarios se estudió por ensayos de unión (Hamilton, 1977; Rutterman et al. 1988; Donnay, 1993; Donnay et al. 1995a). La concentración de receptores expresada en fmol/mg de proteínas citosólicas considerada para asignarle a los tumores la condición de “positivos” fue  $\geq 5$  para RE y RP (Rutterman et al. 1988);  $> 2$  (Donnay et al. 1995a) y  $> 2$  y  $> 5$  para RE y RP respectivamente (Inaba et al. 1984). Se reportó sitios de unión para E y P4 de alta afinidad. Los valores de Kd reportados son 0.4 - 2.5 y 0.3 - 5.8 nM (Inaba et al. 1984). 0.26 y 0.56 nM (Donnay et al. 1995a) y  $< 5$  y 0.5 nM (Rutterman et al. 1988) para RE y RP respectivamente. Aproximadamente el 80% de los tumores y 95 % del tejido normal expresa concentraciones detectables de RE y RP o ambos (Donnay et al. 1995a). La concentración de RE y RP fue menor en carcinomas que en los otros tipos de tumores (Donnay et al. 1993). La mediana de la concentración (fmol/mg de proteínas) de RE fue mayor en tejido normal que tumoral (46 vs 27) y la de RP fue mayor en tejido tumoral que normal (77 vs 57) (Donnay et al. 1995a). Para Rutterman et al. (1988) los tumores RE o RP positivos también fueron los más frecuentes y la concentración de ambos receptores fue mayor en tumores benignos que malignos. Sin embargo, solo nueve de trece tumores benignos y cuatro de catorce malignos fueron RE y RP positivos (Inaba et al. 1984) y dieciséis de sesenta y cuatro tumores benignos y treinta y cuatro de sesenta y cinco malignos fueron RE positivos y no hubo diferencias en la concentración de RE (no reportan los valores) entre tumores benignos y malignos (Hamilton, 1977).

Los estudios de hormono sensibilidad (en términos de receptores) del tejido mamario canino normal y tumoral han dado resultados contradictorios y en nuestro país no se cuenta con este tipo de trabajos a pesar de la alta incidencia de tumores mamario que presenta la perra.

### **3. HIPOTESIS**

La expresión de RE y RP en la glándula mamaria normal dependería de los niveles de las hormonas esteroides ováricas en las diferentes etapas del ciclo.

En los tumores mamarios caninos la expresión de RE y RP estaría vinculada a la transformación y progresión tumoral.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la distribución de RE y RP en la glándula mamaria normal y en glándula mamaria con diferentes tipos de tumores.

### **5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar la concentración de P4 sérica en perras normales durante el ciclo reproductivo y antes de la pubertad, y en perras adultas enteras y castradas con tumores mamarios.

Estudiar la presencia y distribución de RE $\alpha$  y RP por inmunohistoquímica en los diferentes tipos celulares de la glándula mamaria de perras sanas, prepúberes y adultas enteras durante el ciclo y en perras enteras y castradas con tumores mamarios.

Determinar la concentración de RE y RP y su afinidad a E y P4 por ensayos de unión en glándula mamaria de perras normales durante el ciclo reproductivo y antes de la pubertad y en perras adultas enteras y castradas con tumores mamarios.

Estudiar si existe relación entre la concentración RE y RP en el tejido mamario normal y tumoral.

Determinar si existe relación entre la expresión RE y RP en tejido mamario y los niveles circulantes de P4 en perras normales y en perras con tumores mamarios.

### **6. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN**

En la perra existe una alta incidencia en la presentación de tumores mamarios que representan entre 25-50% de todos los tumores. Los tumores mamarios en su mayoría están vinculados a las hormonas esteroides ováricas. Además, perra es considerada un modelo para el estudio de la de tumores mamarios humanos, sin embargo hay pocos trabajos y en nuestro país no existe ninguno que documente la concentración y distribución del RE y RP en el tejido mamario canino. A los efectos de conocer la concentración y distribución del RE y RP en el tejido mamario canino normal y tumoral se realizaron dos diseños experimentales:

## **6.1. Diseño en perras normales**

Fue realizado en hembras caninas sanas enteras en diferentes etapas del ciclo. Se estudió el estadio del ciclo reproductivo por citología vaginal y por los niveles circulantes de P4. También se investigó la concentración, localización y distribución de los RE y RP en el tejido mamario canino de todos los animales.

## **6.2. Diseño en perras con tumores mamarios**

Fue realizado con hembras caninas adultas enteras y castradas con tumores mamarios. Se investigó la concentración de P4 circulante, la histopatología y la concentración, localización y distribución de los RE y RP en tejido mamario tumoral de todos los animales.

# **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

## **7.1. Diseño en perras normales**

Se utilizaron 12 hembras caninas adultas sanas enteras entre 9 meses a 8 años de edad y 4 prepúberes entre 5 a 8 meses. Todas de raza cruzada, de una clínica veterinaria privada de la ciudad de Montevideo; en la que se le realizó ovariectomía por línea media. Todos los animales fueron evaluados durante la consulta por el médico veterinario que realizó la cirugía mediante examen objetivo general y particular para poder determinar el estado de salud del paciente. Se registró la edad, raza, tiempo desde el último celo, presencia y/o número de pariciones y afecciones reproductivas asociadas. Siete de las 12 adultas habían tenido un parto, 4 fueron nulíparas y de 1 no se tuvo información. Se realizó la observación de la vagina para evaluar su aspecto macroscópico, turgencia, edematización, congestión y presencia de corrimientos. Esta información junto con el análisis de la citología vaginal y los niveles de P4 circulantes se utilizaron para clasificar el estadio del ciclo reproductivo en que se encontraban los animales (Edens & Health, 2005; Wanke & Gobello, 2006; Feldman & Nelson, 2007; Rehm et al. 2007).

## **7.2. Diseño en perras con tumores mamarios**

Se utilizaron 22 perras adultas, 15 enteras (de las razas: 4 cruzadas, 3 Ovejero Alemán, 2 Bóxer, 2 Dóberman, 2 Cocker, 1 caniche, y 1 Bulldog) y 7 castradas (3 Cruzadas, 1 Rottweiler, 1 Pekinés, 1 Dóberman y 1 Ovejero Alemán) comprendidas en un rango de 5 a 14 años. Estos animales concurren a la consulta en la policlínica del Centro Hospital de la Facultad de Veterinaria, fueron evaluados sistemáticamente durante la consulta registrándose en la historia clínica del animal, la edad, raza, condición fisiológica entera o castrada, tiempo desde el último celo, presencia y/o número de pariciones, afecciones reproductivas asociadas y evolución del proceso tumoral. De las perras enteras con tumor maligno 5/9 eran nulíparas, 2/9 tuvieron partos y 2/9 sin dato, en los benignos 2/4 nulíparas y 2/4 tuvieron partos y en las hiperplasias 2/2 fueron nulíparas. En las perras castradas con tumores malignos 1/1 tuvo 2 partos, con tumores benignos 3/3 nulíparas, en las hiperplasias 2/3 nulíparas y 1/3 tuvo 1 parto. De las perras nulíparas 2 tenían pseudopreñez.

A todos los animales se les realizó 3 radiografías de tórax (dos incidencias laterolaterales una izquierda, una derecha y una ventrodorsal) para descartar la presencia de metástasis pulmonares. El resultado de este estudio es de valor pronóstico y fue considerado para decidir si el paciente era sometido a cirugía ablatoria del tumor, método de elección de tratamiento si el estudio radiológico no evidencia metástasis y si no se han diseminado más allá del tejido mamario y linfáticos adyacentes. Siendo la técnica quirúrgica el tratamiento recomendado para aproximadamente la mitad de las neoplasias mamarias malignas. Posterior a la cirugía es importante un control periódico para determinar la posible recurrencia de la neoplasia (Knapp et al. 2002). En ninguno de los animales de este trabajo se evidenciaron metástasis, por lo que se realizó la ablación de los tumores, que fueron usados en este estudio.

### **7.3. Muestras de exudado vaginal en perras normales**

Se obtuvieron muestras de exudado de la vagina con hisopos a lo largo del borde superior de los labios vulvares. Los hisopos se rotaron sobre portaobjetos y se cubrieron con otros portaobjetos para proteger las muestras hasta llegar al laboratorio. En el laboratorio, se le retiraron los portaobjetos que las cubrían y se tiñeron con azul de metileno al 1% para la clasificación en los distintos estadios del ciclo reproductivo por citología vaginal. En acuerdo con Edens & Health, (2005); Wanke & Gobello, (2006); Feldman & Nelson, (2007); Rehm et al. (2007).

### **7.4. Muestras de sangre y tejido mamario en perras normales y con tumores mamarios**

#### **7.4.1 Muestras de sangre**

Antes de las cirugías se tomaron muestras de sangre por vena punción de la vena safena de las perras normales y con tumores mamarios. Las muestras fueron centrifugadas a 1000 g durante 10 minutos y el suero obtenido fue almacenado a -20°C hasta su procesamiento para la determinación de la concentración de P4 por RIA.

#### **7.4.2 Muestras de tejido de la glándula mamaria normal y tumoral**

Una vez anestesiados los animales se procedió a la obtención de las muestras de glándula mamaria inguinal. De las perras sanas fueron obtenidas en el momento de la ovariectomía por línea media y de las tumorales en el momento de la cirugía. Las muestras fueron disecadas (libre de piel grasa y sangre) y se fraccionaron en dos partes, una parte de cada muestra se almacenó a -80°C, para estudiar la capacidad de unión de los E y la P4 a su receptor correspondiente. La otra parte de las muestras se fijó en paraformaldehído al 4% (pH=7,4) durante 72 horas y posteriormente se incluyeron en bloques de parafina fueron cortados con un espesor de 5 micrómetros y fueron montadas en láminas portaobjetos silanizadas para estudiar la distribución de RE y RP en el tejido normal y tumoral. Los cortes de las muestras de tejidos normales también se tiñeron con hematoxilina y eosina para estudios de histología del tejido mamario y clasificación en los distintos estadios del ciclo reproductivo. Dichos estudios se realizaron con el apoyo y supervisión de Dr. Danilo Fila. Los cortes de las muestras de tejidos tumorales se tiñeron con hematoxilina y

eosina y se realizó el diagnóstico anatomopatológico, de acuerdo al criterio de Misdorp et al (1999) y Goldschmidt et al (2011) dicho diagnóstico se realizó en el Departamento de Patología del Laboratorio Regional Este del DILAVE, Treinta y Tres con la supervisión y apoyo del Dr. Fernando Dutra.

#### **7.5. Determinación de la concentración de progesterona sérica en perras normales y con tumores mamario**

Se realizó en las muestras de suero de perras sanas enteras, ciclando y prepuberes y perras con tumores mamarios enteras y castradas. La medida de la concentración de P4 se realizó por RIA en fase sólida utilizando el kit comercial Coat-A-Count; DPC, Los Ángeles, CA, USA (Donnay et al. 1995b; Mainee in et al. 2010, Iturralde et al. 2013). Todas las muestras se determinaron por duplicado en el mismo ensayo, siguiendo el protocolo del fabricante. La sensibilidad fue 0,03 ng/mL y los coeficientes de variación intraensayo para los controles, bajo (0,76 ng/mL) medio (2,26 ng/mL) y alto (10,7 ng/mL) fueron menores a 10%. Las determinaciones de P4 se realizaron en el laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria, UdelaR.

Los niveles de P4 circulantes fueron utilizados para la clasificación de los animales en los diferentes estadios del ciclo reproductivo (Concannon et al. 2009; Concannon, 2011).

#### **7.6. Determinación de RE $\alpha$ y RP por inmunohistoquímica en glándula mamaria normal y tumoral**

La presencia y distribución de RE $\alpha$  y RP se realizó por la técnica inmunohistoquímica avidina-biotina-peroxidasa (Meikle et al. 2000, Hermo et al. 2010) en las muestras de tejido mamario normal y tumoral, en el laboratorio de Bioquímica de Facultad de Veterinaria. Los bloques de parafina obtenidos se cortaron de un espesor de 5 micrómetros y se montaron en portaobjetos. Las láminas fueron desparafinadas con xilol durante 20 minutos y rehidratadas con etanol 100%, 95% y 70% durante 5 minutos. Posteriormente fueron pre tratadas en microondas con citrato de sodio 0.01 M pH=6 por 10 minutos y se dejaron enfriar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se lavaron en buffer PBS 0.01 M pH=7,4 y Tritón 0,1 % durante 10 minutos. La actividad inespecífica de las peroxidases endógenas fue bloqueada con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol por 10 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron nuevamente en buffer PBS 0.01 M pH =7,4 y Tritón 0,1 % durante 10 minutos. Las láminas fueron incubadas por 30 minutos en una cámara húmeda a oscuras a temperatura ambiente con suero de caballo normal (NHS: Vectastain ABC-KIT, Elite, Cat # PK-6102) diluido en PBS 0.01 M pH=7,4.

Se utilizó anticuerpo primario anti-RE $\alpha$  (anticuerpo monoclonal de ratón, Cat No. sc -787; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluido 1/25 en PBS e incubado por una hora. El anticuerpo anti-RP (de ratón, Cat. No 18-0172, Zymed, South San Francisco, CA, USA) fue diluido 1/100 en PBS. Los controles negativos se obtuvieron reemplazando el anticuerpo primario por suero inespecífico de ratón (IgG de ratón Cat No sc-2025, Santa Cruz, Biotechnology California, USA). Se realizó la incubación de las muestras con anticuerpo secundario (IgG biotinilado, equino anti-ratón, Vectastain ABC-KIT) diluido en NHS para RE $\alpha$  y RP. A continuación los tejidos se incubaron con el complejo avidina-biotina-peroxidasa



(ABC) (Vectastain Elite; Vector Lab) durante 60 minutos a temperatura ambiente. La unión del complejo enzimático fue visualizado con 3,3'-diaminobenzidina en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DAB kit Vector Lab Cat#4100.), un cromógeno que produce un precipitado marrón insoluble cuando se incubó junto con la peroxidasa. Las muestras de tejido fueron contra coloreadas con hematoxilina, deshidratadas con etanol 70%, 95%, 100% durante 5 minutos y colocadas en xilol durante 20 minutos antes de ser montadas con Pertex. (Histolab, Gothenburg, Sweden).

### **7.7. Análisis de imágenes**

La distribución de RE $\alpha$  y RP en muestras de perras normales y con tumores mamarios se estudió en los siguientes compartimientos histológicos: tejido conectivo (TC), epitelios alveolar (EA) y de conductos (EC) de la glándula mamaria, mediante obtención de imágenes con el software Infinity Capture en microscopio óptico Olympus BX41. La intensidad de inmunomarcado a RE $\alpha$  y RP fue evaluada subjetivamente por dos observadores independientes que desconocían que muestras estaban evaluando (Sosa et al. 2004). Se analizaron diez campos para cada compartimiento celular con aumento de 400x. El score de la intensidad de inmunomarcado se evaluó de acuerdo a la siguiente escala: negativo (-), leve (+), moderado (++) o intenso (+++), si no se evidenciaba tinción, si se evidenciaba marrón leve, marrón o marrón oscuro respectivamente. La intensidad de inmunomarcado se expresó como un score y se calculó como:  $1 \times n1 + 2 \times n2 + 3 \times n3$ , donde n es la proporción de células por campo que exhiben tinción: leve (n1), moderado (n2) e intenso (n3) (Boos et al. 1996). Los controles negativos también fueron incluidos en el análisis.

### **7.8. Ensayos de unión de RE y RP en glándula mamaria normal y tumoral**

La concentración de RE y RP se determinó por la técnica bioquímica de múltiples puntos, en el laboratorio de Bioquímica de Facultad de Veterinaria. Los resultados de cada ensayo de unión se analizaron por el modelo de Scatchard inverso (Braunberg, 1984; Garófalo & Tasende, 1996). Las muestras de tejido mamario normal y tumoral se laminaron congeladas, se homogeneizaron en un homogeneizador Polytron Kinematica PT 10-35 a 27000 rpm en buffer de ensayo en una relación 1/10 (p/v). El buffer de ensayo utilizado fue TRIS 50 mM, EDTA 1,5 mM, DTT 1 mM, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 16,5 mM y Glicerol 10% v/v de Sigma, pH=7,4. Cada muestra fue homogeneizada tres veces durante cinco segundos con intervalos de un minuto entre cada homogeneización. La homogeneización así como todos los procedimientos posteriores se realizaron entre 0-4 °C. Los homogeneizados se centrifugaron a 1100g durante 10 minutos en centrífuga Sorvall Evolution RC y los sobrenadantes se centrifugaron a 50000g durante 1 hora obteniéndose la fracción citosólica.

La unión total se determinó incubando por duplicado alícuotas de la fracción citosólica con 5-6 concentraciones crecientes de (2,4,6,7 <sup>3</sup>H)-E2-17 $\beta$  (<sup>3</sup>H-E2), 86 Ci/mmol (0,15 a 15 nM) para RE o <sup>3</sup>H-ORG-2058 (16 $\alpha$ -ethyl-21-hydroxy-19-nor[6,7,3H]pregn4en-3,20-dione), 40 Ci/mmol (0,25 a 30 nM) para RP (Amersham Internacional Buckinghamshire, England). En paralelo, las mismas muestras se incubaron por duplicado, con un exceso de 200 veces de diethylstilbestrol (DES) no

marcado para RE o ORG-2058 no marcado para RP, para determinar la unión no específica. Luego de 18 horas de incubación, los esteroides libres fueron separados por el método de carbón-dextrano conteniendo 1% carbón (p/v), dextrano 0,1% (p/v) (Dextran T-70; Pharmacia, Uppsala Sweden) en buffer de ensayo. La radioactividad del sobrenadante fue contada en líquido de centelleo (Ready Safe scintillation de Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA). La unión específica se obtuvo restando la unión inespecífica a la unión total. Los resultados se analizaron por el modelo de Scatchard inverso (Braunsberg, 1984) que permite calcular la constante de disociación aparente ( $K_d$ , nM) y la concentración de receptores que se expresó en femtomoles por miligramo de proteínas citosólica (fmol/mg proteínas) y en femtomoles por miligramo de tejido (fmol /mg tejido).

En perras adultas, el análisis de los resultados de los ensayos de unión expresados en fmol/mg de tejido, dieron resultados similares a los expresados fmol/mg proteínas, por lo tanto los resultados se presentaron en fmol/mg proteínas. En perras prepúberes se presentaron expresados en fmol/mg de tejido debido a que la concentración de proteínas citosólicas fue menor a 1 mg/mL.

La concentración de proteínas de la fracción citosólica se midió por el método de Lowry usando Albúmina Sérica Bovina (BSA, fracción V de Sigma) como estándar (Lowry et al. 1951).

La concentración de proteínas y la cantidad de tejido utilizado en los ensayos de unión se correlacionó positivamente ( $r=0,70$ ,  $n=16$ ,  $P=0,0024$  y  $r=0,88$ ;  $n=22$ ;  $P<0,0001$  para glándula mamaria normal y tumoral respectivamente) indicando que el procedimiento de extracción fue similar en las diferentes muestras de tejido mamario.

Los RE y RP *in vivo* están situados en el núcleo (Perrot-Applanat et al. 1992). Se ha demostrado que después de la ruptura del tejido y las células, durante el proceso de homogenización, toda la actividad de unión aparece en la fracción citosólica (Martín & Scheridan, 1982). En acuerdo con esto se reportó que la concentración de receptores en la fracción nuclear (pellet) representó menos del 10% y la fracción citosólica (sobrenadante) mas del 90 % del contenido total de receptores (Meikle et al. 2000). La expresión “citosólica” se refiere al sobrenadante obtenido después de la homogenización y centrifugación diferencial del tejido en la cual medimos la concentración de receptores en este trabajo.

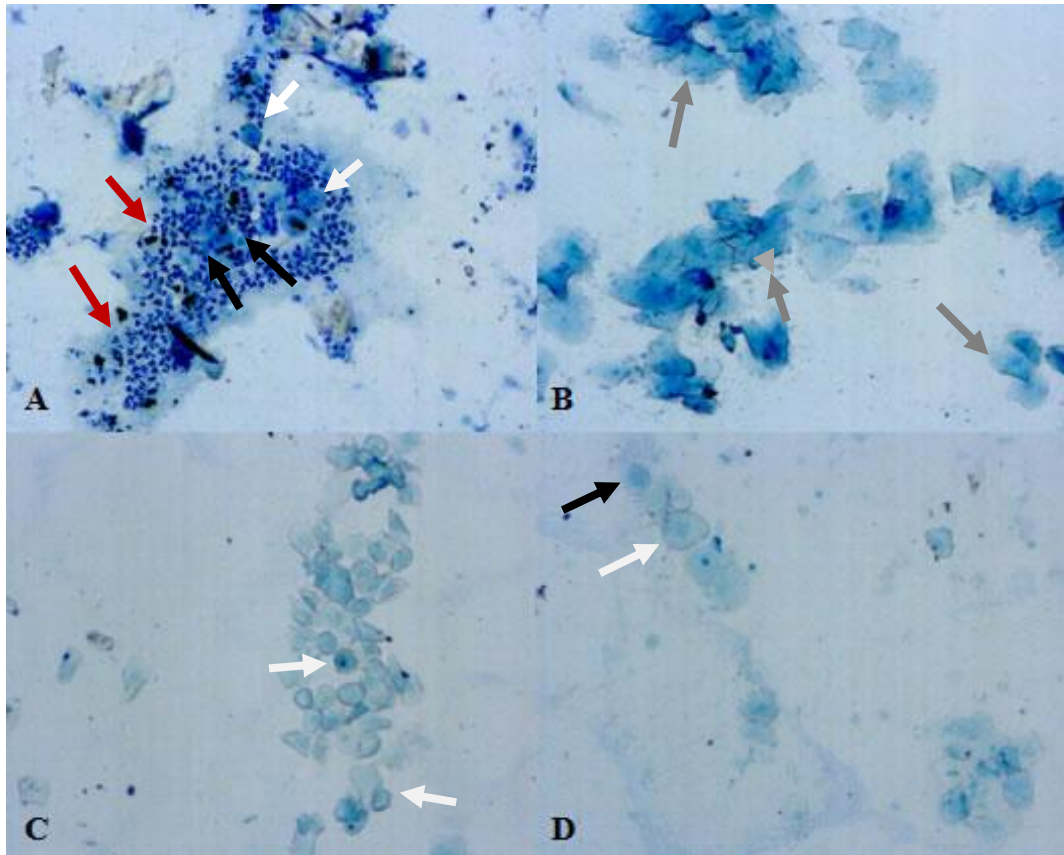
## 7.9. Análisis estadístico

La concentración de P4 circulante y la concentración de RE y RP y la cantidad de RE y RP en los diferentes compartimentos histológicos fueron analizadas por ANOVA utilizando el procedimiento mixto de Statistical Analysis System (SAS Institute inc., Cary, NC, USA). En el modelo estadístico se incluyeron los efectos de observador, compartimento histológico, situación fisiológica de la perra o tipo de tumor. Se realizó el test de correlación de Pearson para estudiar la relación entre la concentración de RE y RP, y la concentración de P4 y la concentración de RE y RP y cantidad de tejido y la concentración de proteína citosólica. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media (media  $\pm$  EEM). El nivel de significación fue  $P<0,05$ , salvo que se especifique lo contrario.

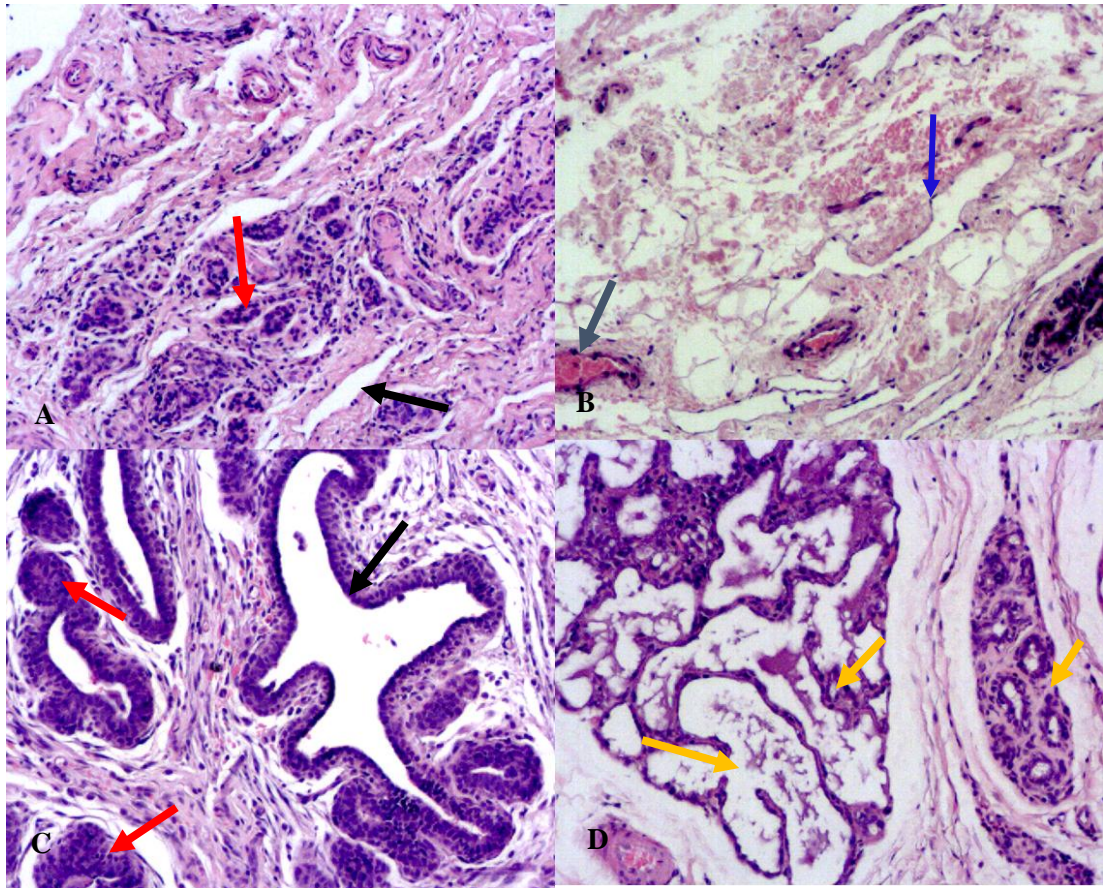
## **8. RESULTADOS EN GLANDULA MAMARIA DE PERRAS NORMALES**

### **8.1. Clasificación de las perras normales en los distintos estadios del ciclo**

Las perras que presentaron predominio de células intermedias y parabasales, pocas células superficiales con cantidad moderada de neutrófilos cuyas mamas presentaron proliferación de conductos dilatados y lobulillos pequeños fueron consideradas en proestro (n=3) (Figuras 2 y 3). Presencia de muchas células superficiales y anucleares y escasa cantidad de células intermedias y tejido mamario con pocos conductos, se clasificaron en estro (n=2). Muestras que contenían células intermedias y parabasales pequeñas, con pocas células superficiales y tejido mamario con gran desarrollo de conductos y lobulillos se determinaron en diestro (n=4). Las perras con menor cantidad de células parabasales e intermedias y con alvéolos mamaros reducidos en tamaño y escasa secreción se clasificaron en anestro (n=3) (Figuras 2 y 3). En las perras de 5 a 8 meses de edad se observó tejido mamario rudimentario. Esto fue consistente con la información aportada por los propietarios, en relación a que dichos animales nunca habían manifestado síntomas de actividad reproductiva, por lo tanto se clasificaron en prepúberes (n=4). En la citología vaginal de estos animales se evidenciaron muy pocas células parabasales e intermedias.



**Figura 2.** Citología vaginal de perras en diferentes estadios del ciclo reproductivo, tinción con azul de metileno, 100x. A) Proestro: células intermedias (flechas blancas), parabasales (flechas negras) y neutrófilos (flechas rojas). B) Estro: células superficiales (gris). C) Diestro: células intermedias pequeñas (flechas negras). D) Anestro: células parabasales (flecha negra) e intermedias (flecha blanca).



**Figura 3.** Histología del tejido mamario canino en distintos estadios del ciclo: A) Proestro: dilatados (flecha negra) y pequeños lobulillos (flecha roja). B) Estro: pocos conductos (flecha azul) rodeados de adipocitos, con presencia de vasos y extravasación de glóbulos rojos (flecha gris). C) Diestro: gran desarrollo de conductos (flecha negra) y formación de lobulillos (flechas rojas). D) Anestro: grupos alveolares con poca secreción (flechas amarillas).

## 8.2. Concentraciones de progesterona sérica en perras normales

Se encontró efecto de la etapa del ciclo reproductivo sobre la concentración de P4 sérica ( $P=0,03$ ). La concentración de P4 sérica fue mayor en diestro que en proestro, estro, anestro y en la prepubertad (Cuadro II).

**Cuadro II.** Concentraciones de P4 sérica en perras normales.

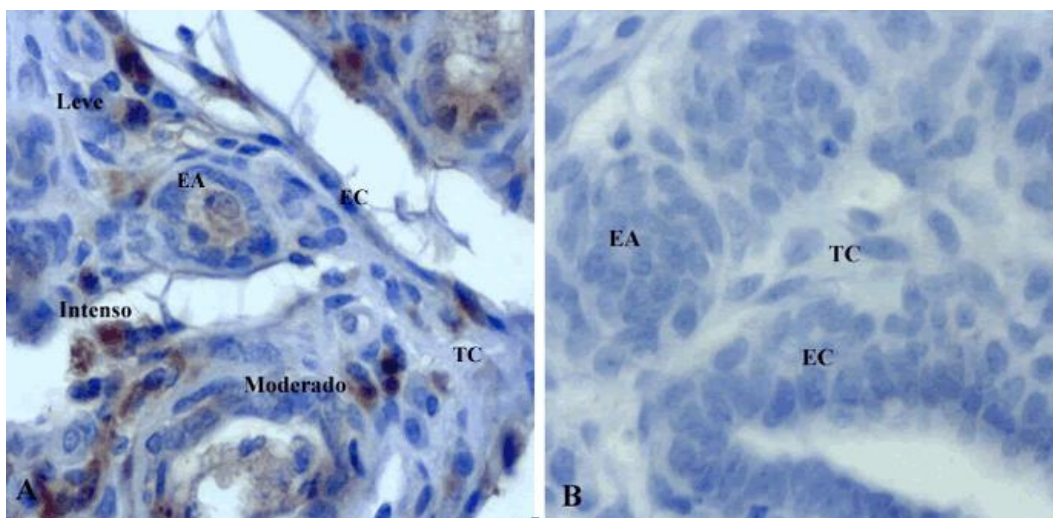


Situación fisiológica	P4 sérica (ng/mL, media± EEM )
Proestro (n=3)	0.91 ± 0.02(a)
Estro (n=2)	2.81 ± 1.42 (a)
Diestro (n=4)	31.67 ± 8.60 (b)
Anestro (n=3)	0.25 ± 0.04(a)
Prepubertad (n=4)	0.48 ± 0.14 (a)

a, b indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las diferentes situaciones fisiológicas.

### 8.3. Distribución e intensidad de inmunomarcado a RE $\alpha$ en glándula mamaria normal

En los animales adultos se detectó inmunomarcado a RE $\alpha$  en los núcleos del tejido conectivo de 10 muestras, en epitelio alveolar de todas muestras y en epitelio de conductos en 11 muestras (Figura 4). Los controles negativos no presentaron inmunomarcado a RE $\alpha$  (Figura 4). No se encontró efecto de observador, en la intensidad de inmunomarcado a RE $\alpha$ .

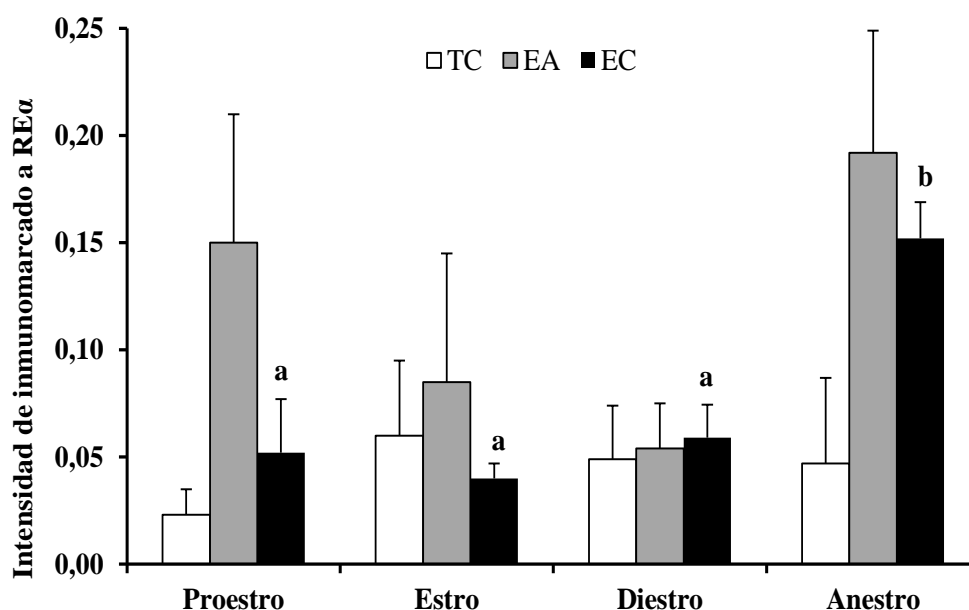


**Figura 4.** A) Intensidad de inmunomarcado a RE $\alpha$  en tejido conectivo (TC), epitelio alveolar (EA) y epitelio de conductos (EC) de la glándula mamaria canina, 400x; el inmunomarcado a RE $\alpha$  (coloración marrón) en el núcleo celular del tejido mamario (leve, moderada, e intensa). B) Control negativo (núcleos de coloración azul).

Se encontró efecto de estadio del ciclo en el epitelio de conductos ( $P=0,013$ ) y de compartimiento histológico ( $P=0,037$ ) en la intensidad de inmunomarcado a RE $\alpha$ . La intensidad de inmunomarcado a RE $\alpha$  fue mayor en epitelio alveolar que en tejido conectivo ( $0,117 \pm 0,026$ ,  $0,044 \pm 0,013$ , media  $\pm$  EEM) respectivamente,  $P=0,011$ ) no hubo diferencias entre tejido conectivo y epitelio de conductos ( $0,077 \pm 0,016$  media  $\pm$  EEM) ni entre epitelios alveolar y de conductos.

Durante el ciclo la intensidad de inmunomarcado a RE $\alpha$  en epitelio de conductos fue mayor en anestro que en proestro, estro y diestro ( $P < 0,007$ ), no hubo diferencias en la intensidad de inmunomarcado a RE $\alpha$  en tejido conectivo y epitelio alveolar entre proestro, estro, diestro y anestro (Figura 5).

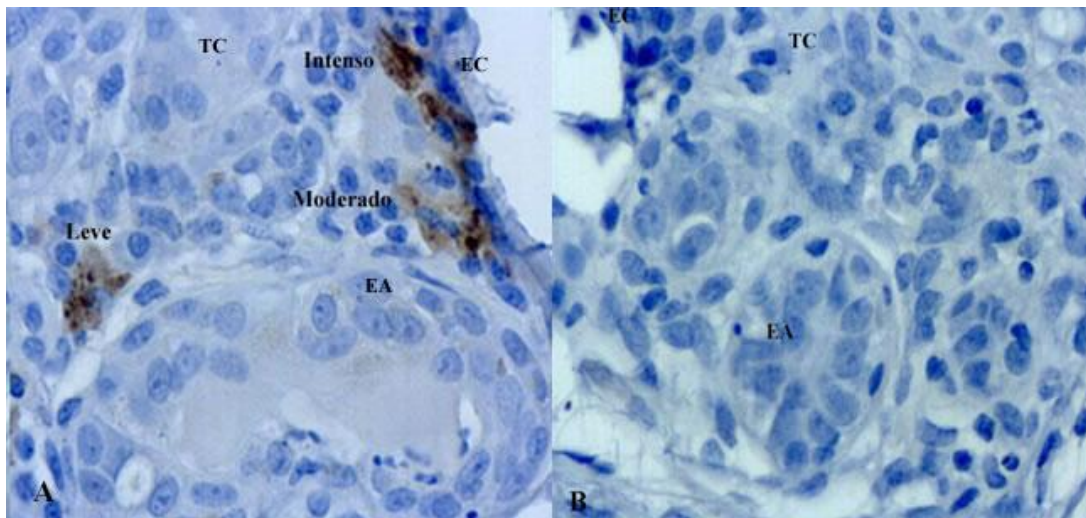
No se detectó inmunomarcado a RE $\alpha$  en las muestras de tejido mamario en perras prepúberes.



**Figura 5.** Intensidad de inmunomarcado a RE $\alpha$  (media  $\pm$  EEM) en tejido conectivo (TC), epitelio alveolar (EA) y epitelio de conductos (EC) de la glándula mamaria canina en proestro (n=3), estro (n=2), diestro (n=4) y anestro (n=3). a b, indican diferencias en epitelio de conductos para diferentes estadios ( $P < 0,05$ ).

#### 8.4. Distribución e intensidad de inmunomarcado a RP en glándula mamaria normal

Se detectó inmunomarcado a RP en tejido conectivo de 5 muestras, y en epitelio alveolar y de conductos de 10 muestras. Los controles negativos no presentaron inmunomarcado a RP (Figura 6). No se encontró efecto de observador en la intensidad de inmunomarcado a RP. Se encontró efecto de estadio del ciclo en tejido conectivo ( $P = 0,011$ ) y de compartimiento histológico ( $P = 0,0038$ ) sobre la intensidad de inmunomarcado a RP.



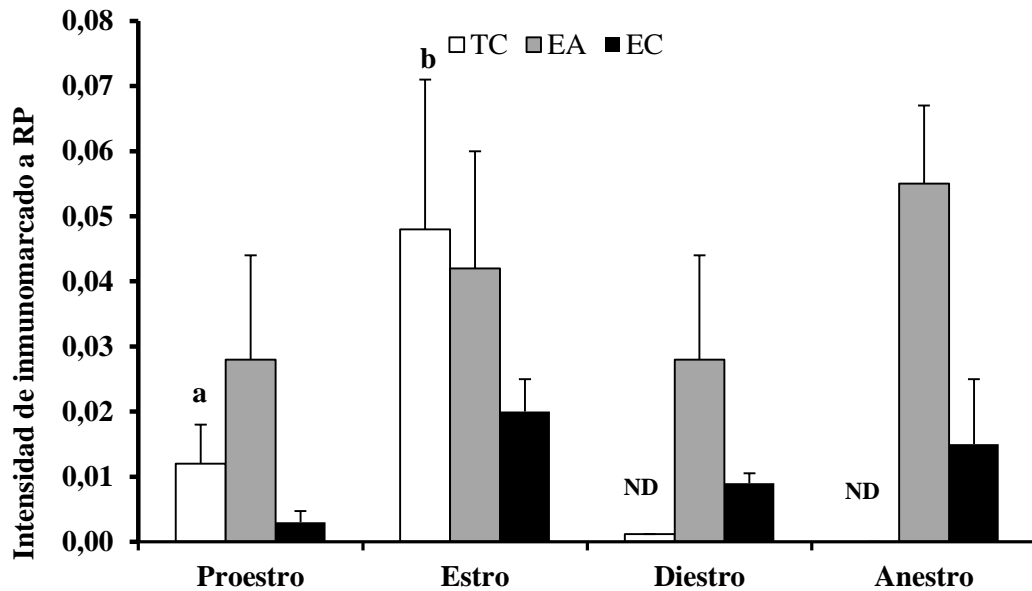
**Figura 6.** A) Intensidad de inmunomarcado a RP en tejido conectivo (TC), epitelio alveolar (EA) y epitelio de conductos (EC) de la glándula mamaria canina 400x; el inmunomarcado a RP (coloración marrón) en el núcleo celular del tejido mamario (leve, moderada, e intensa). B) Control negativo (núcleos de coloración azul).

La intensidad de inmunomarcado a RP fue mayor en epitelio alveolar que en tejido conectivo y epitelio de conductos ( $0,037 \pm 0,008$ ,  $0,011 \pm 0,006$ ,  $0,011 \pm 0,003$  medias  $\pm$  EEM respectivamente,  $P < 0,004$ ) no hubo diferencias entre tejido conectivo y epitelio conductos.

Durante el ciclo la intensidad de inmunomarcado en el tejido conectivo fue mayor al estro que en el proestro ( $P < 0,02$ ), no se detectó inmunomarcado a RP en diestro y anestro. No hubo diferencias en la intensidad de inmunomarcado a RP en epitelios alveolar y de conductos entre proestro, estro, diestro y anestro (Figura 7).

No se detectó inmunomarcado a RP en las muestras de tejido mamario en perras prepúberes.

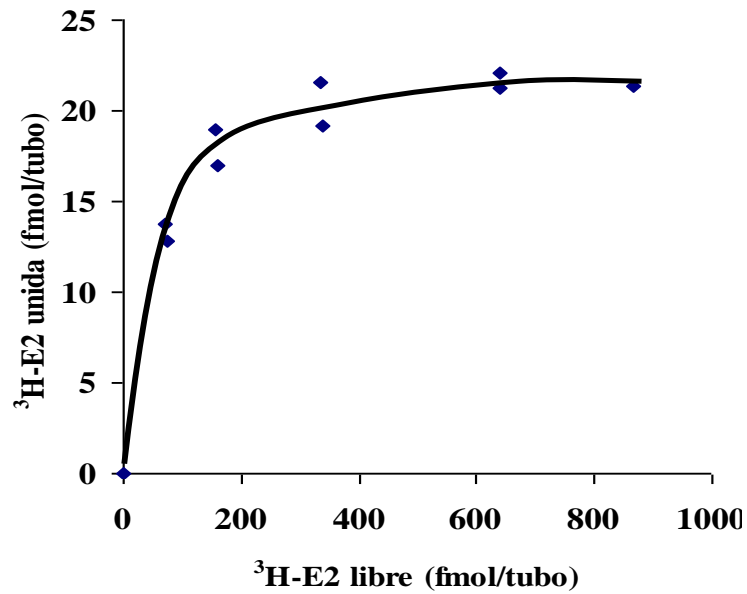




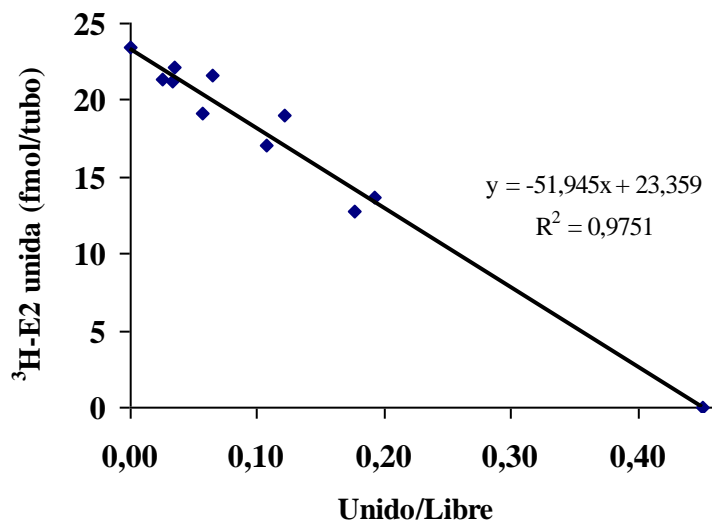
**Figura 7.** Intensidad de inmunomarcado a RP (media  $\pm$  EEM) en tejido conectivo (TC), epitelio alveolar (EA) y epitelio de conductos (EC) de la glándula mamaria canina en proestro (n=3), estro (n=2), diestro (n=4) y anestro (n=3). a, b indican diferencias para tejido conectivo, (P<0,05). ND indica que no se detectó inmunomarcado.

### 8.5. Concentración de RE y RP en glándula mamaria normal

En las muestras de glándula mamaria de todos los animales se demostró unión específica, saturable y desplazamiento de la unión con las hormonas no marcadas correspondientes. En la (Figura 8) se muestra una curva de saturación y en la (Figura 9) un gráfico de Scatchard inverso de la misma muestra.



**Figura 8.** Curva de saturación de RE ejemplo de uno de los animales estudiados



**Figura 9.** Gráfico de Scatchard inverso de RE ejemplo de la misma muestra de la curva de saturación.

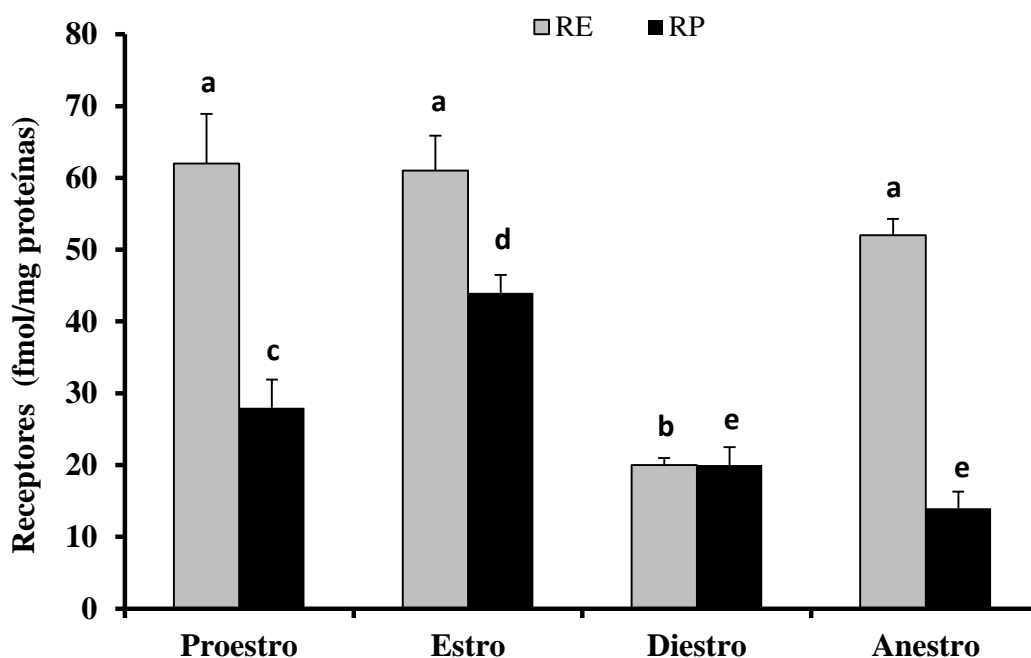
No hubo efecto de la etapa del ciclo sobre los valores de Kd de RE ni de RP. (Cuadro III).

**Cuadro III.** Valores de Kd (nM) de RE y RP

<b>Animales en:</b>	<b>Kd RE</b> (media $\pm$ EEM)	<b>Kd RP</b> (media $\pm$ EEM)
Proestro (n=3)	1,30 $\pm$ 0,30	0,51 $\pm$ 0,23
Estro (n=2)	1,22 $\pm$ 0,20	0,93 $\pm$ 0,02
Diestro (n=4)	0,90 $\pm$ 0,11	0,86 $\pm$ 0,37
Anestro (n=3)	0,76 $\pm$ 0,12	0,56 $\pm$ 0,28
Prepubertad (n=4)	0,72 $\pm$ 0,15	0,52 $\pm$ 0,15

Hubo efecto de la etapa del ciclo sobre la concentración de RE (P=0,0002). La concentración (fmol/mg de proteínas) de RE fue menor en las perras en diestro que en proestro, estro y anestro (P<0,0005 (Figura 10).

Hubo efecto de la etapa del ciclo sobre la concentración de RP (P=0,001). La concentración de RP también fue menor en diestro que en proestro (P=0,05) y estro (P<0,0006) y no se diferenció del anestro; y en estro fue mayor que en proestro (Figura 10).



**Figura 10.** Concentración de RE y RP (fmol/mg de proteínas, media  $\pm$  EEM) en tejido mamario canino en proestro (n=3), estro (n=2), diestro

(n=4) y anestro (n=3). Para el mismo receptor y diferente estado diferentes letras indican diferencias (P<0,05).

### 8.6. Concentración de RE y RP en glándula mamaria de perras prepúberes

En la glándula mamaria de las perras prepúberes se detectó unión específica a RE y RP. La concentración de proteína en las muestras fue menor a 1mg/mL en acuerdo con el escaso desarrollo del tejido mamario.

La concentración de receptores expresada en fmol/mg de proteínas en las perras prepúberes “seria” mucho mayor que en las adultas mientras que expresado en fmol/mg de tejido es menor que en las adultas ( $0,33 \pm 0,08$ ,  $1,29 \pm 0,16$  respectivamente para RE,  $P=0,005$  y  $0,34 \pm 0,11$ ,  $0,69 \pm 0,07$  para RP respectivamente  $P=0,029$ ). En las perras prepúberes los resultados se muestran expresados en fmol/mg de tejido, para compararlos con los de las perras adultas (Cuadro IV). La concentración de RE fue similar a las del diestro y la de RP similar a la del anestro, que fueron los menores valores encontrados en las perras adultas.

**Cuadro IV.** Concentración (fmol/mg tejido) de RE y RP en glándula mamaria de perras normales.

	<b>RE</b> (media $\pm$ EEM)	<b>RP</b> (media $\pm$ EEM)
<b>Proestro</b> (n=3)	1,53 $\pm$ 0,18 (a*)	0,73 $\pm$ 0,17(a <sup>#</sup> )
<b>Estro</b> (n=2)	1,35 $\pm$ 0,005 (a)	0,97 $\pm$ 0,13 (a)
<b>Diestro</b> (n=4)	0,75 $\pm$ 0,05(b*)	0,74 $\pm$ 0,07 (a)
<b>Anestro</b> (n=3)	1,71 $\pm$ 0,47 (a)	0,41 $\pm$ 0,06 (b <sup>#</sup> )
<b>Prepúberes</b> (n=4)	0,33 $\pm$ 0,08 (b)	0,34 $\pm$ 0,11 (b)

Por columna a, b indican diferencias significativas (P<0,05), <sup>#</sup> indica tendencia P=0,08.

La concentración de RE y P4 se correlacionaron negativamente ( $r=-0,58$ ,  $n=16$ ,  $P=0,02$ ). No se encontró correlación entre la concentración de RP y P4. Se encontró tendencia a correlación positiva entre la concentración de RP y RE ( $r=0,45$ ,  $n=16$ ,  $P=0,08$ ).

## 9. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS EN GLANDULA MAMARIA NORMAL

La concentración de P4 circulante fue mayor en el diestro que en proestro, estro y anestro en acuerdo con lo reportado en perras durante el ciclo reproductivo (Concannon, 2011; Iturralde et. al 2013). Los valores de P4 encontrados en los animales estudiados están de acuerdo con etapa del ciclo y la actividad ovárica que corresponde.

En las muestras de glándula mamaria de perras prepúberes no encontramos inmunomarcado a RE $\alpha$  ni a RP en ninguno de los tres compartimientos histológicos estudiados, esto podría deberse a que la concentración de ambas proteínas receptoras antes de la pubertad no sea suficiente para su detección por inmunohistoquímica. Sin

embargo se reportó inmunotinción a ambos receptores en glándula mamaria de terneras (Connor et al. 2005) y corderas (Colitti & Parillo, 2013) prepúberes utilizando los mismos anticuerpos primarios. Estas diferencias pueden deberse a que son especies distintas, o a que las terneras prepúberes podrían tener un mayor desarrollo de tejido mamario que las perras prepúberes en las que se reportó que el tejido glandular mamario apenas fue diferenciable de la dermis antes del inicio del primer ciclo estral (Chandra et al. 2010). Los bajos niveles de concentración de RE y RP en perras prepúberes concuerdan con el escaso desarrollo mamario de estos animales y explican en parte que no hayamos detectado inmunomarcado a ninguno de los dos receptores. No encontramos trabajos en tejido mamario de perras prepúberes con quien comparar este trabajo.

Se observó inmunomarcado a RE $\alpha$  en los núcleos de las células del tejido conectivo, epitelios alveolar y de conductos en las muestras de tejido mamario, en los diferentes estadios del ciclo reproductivo; para RP se detectó inmunomarcado en todos los compartimientos durante el proestro y el estro; y solo para epitelio alveolar y de conductos durante diestro y anestro. Sin embargo Manee-in et al. (2010) no encontraron tinción a RE $\alpha$  ni a RP en tejido conectivo en glándula mamaria de perras normales durante el ciclo reproductivo y sugieren que las células del tejido conectivo no serían blanco de acción de las hormonas esteroides ováricas. Tampoco se reportó tinción a RE $\alpha$  ni RP en tejido conectivo en la glándula mamaria de mujeres (Anderson, 2002), primates no humanos (Cheng et al. 2005), bovinos (Schams et al. 2003) y cabras (Moroni et al. 2007). Por el contrario, inmunotinción a RE $\alpha$  y RP en tejido conectivo y epitelios alveolar y de conductos fue reportada en glándula mamaria normal de perra (Millanta et al. 2005) ovinos (Colitti & Parillo, 2013) y a RE $\alpha$  en roedores (Shyamala et al. 2002). Estos resultados y los nuestros sugieren que los tres compartimientos histológicos estudiados son blanco de acción de las hormonas esteroides ováricas.

La distribución de RE $\alpha$  y RP en tejido conectivo, epitelios alveolar y de conductos varió en los estadios del ciclo reproductivo estudiados. No encontramos publicaciones que reporten como se distribuye la intensidad de inmunomarcado a RE $\alpha$  ni de RP en tejido conectivo y epitelios alveolar y de conductos de glándula mamaria normal de perra en los diferentes estadios del ciclo. La mayor intensidad de inmunomarcado a RE $\alpha$  en epitelio alveolar en proestro y en epitelios alveolar y de conductos en anestro en relación al tejido conectivo, sugiere que los epitelios son más sensibles a los estrógenos que el tejido conectivo. Estos resultados sugieren que los RE y RP del epitelio y del estroma participan en los cambios que sufre la glándula mamaria en las diferentes etapas del ciclo. Por otro lado en ratones en la glándula mamaria en desarrollo, la concentración de RP y la modulación del RP por los estrógenos parecen estar restringida al epitelio (Haslam & Shyamala, 1981). Por el contrario, se sugirió que la regulación del desarrollo de la glándula mamaria en roedores esta mediada por los RP del estroma y del epitelio (Humphreys et. al. 1997), indicando que existe una interconexión-función entre los RE y RP del epitelio y del estroma.

En los ensayos de unión de RE y RP se demostró unión específica y de alta afinidad en todas las muestras estudiadas. Los valores de Kd fueron similares en los diferentes estadios del ciclo reproductivo incluidas las perras prepúberes. Estos valores de Kd son similares a los reportados en ovinos en útero (Miller et al. 1977;

Rexroad, 1981; Meikle et al. 2004; Tasende et al. 2005), cérvix (Rodríguez-Piñón et al. 2008) y en la perra en tejido uterino y mamario (Donnay et al. 1995 a,b). Sin embargo utilizando la metodología de ensayos de unión Hamilton (1977) no detecto RE en glándula mamaria normal de perra, y no específica en que situación fisiológica se encontraban los animales.

Nosotros encontramos menor concentración de RE y RP en diestro (fase luteal) en relación al proestro y estro (fase folicular). Nuestros resultados concuerdan con la menor inmunotinción a RE $\alpha$  y RP (Manee-in et al. 2010) y con la menor concentración de RP (Donnay et al. 1995 b) reportada en la mitad del diestro en relación al estro y al proestro. Por el contrario no se encontraron diferencias en la concentración de RE entre diestro, estro y proestro (Donnay et al. 1995 b). Nosotros encontramos que en anestro la concentración de RE fue mayor y la de RP fue similar que en diestro. Sin embargo en anestro la concentración de RE fue similar y la de RP mayor a la del diestro (Donnay et al. 1995 b). Manee-in et al. (2010) también reportaron que en anestro la inmunotinción a RE $\alpha$  es menor y la de RP es mayor que en diestro. Estas diferencias pueden ser debidas a variaciones en la longitud del ciclo estral entre diferentes razas y a variaciones individuales entre los animales. Por otro en la glándula mamaria de mujeres y cabras tampoco encontraron diferencias en la tinción a RP entre la fase folicular y luteal (Soderqvist et al. 1993; Moroni et al. 2007). Contrariamente, en la glándula mamaria de roedores reportaron que la tinción a RE $\alpha$  y RP fue menor en la fase luteal que en la fase folicular (Shyamala et al. 2002).

El perfil de concentración de RE y RP en nuestro trabajo concuerda con lo reportado por Donnay et al. (1995 b) en tejido uterino de perras durante el ciclo reproductivo. Pero no concuerda con lo reportado por estos autores en glándula mamaria ya que no encuentran diferencias en la concentración de RE y RP entre proestro, estro y la fase luteal temprana, a pesar de que reportaron la mayor concentración de P4 en esta fase.

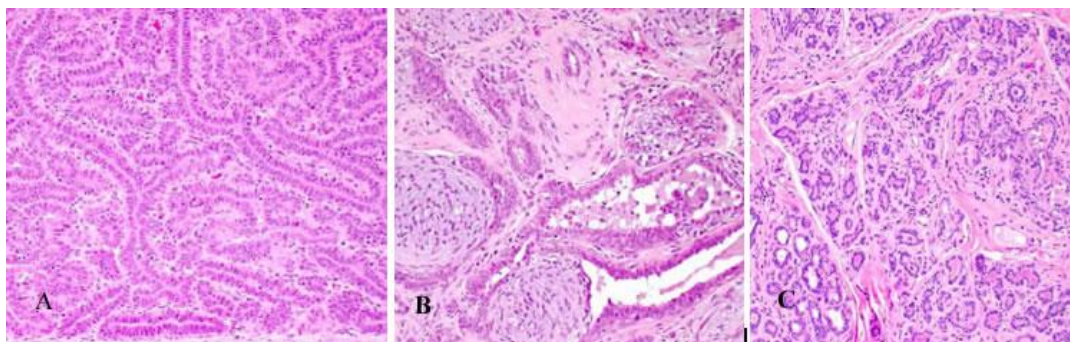
Los mayores niveles de RE y RP en proestro y estro en relación al diestro y anestro se acompañan por los menores niveles de P4 circulantes y los mayores niveles de E circulantes. Esto concuerda con la regulación de la expresión de RE y RP, se acepta que los E estimulan la síntesis de ambos receptores y que la P4 la inhibe (Clark & Mani, 1994).

## **10. RESULTADOS EN TUMORES MAMARIOS**

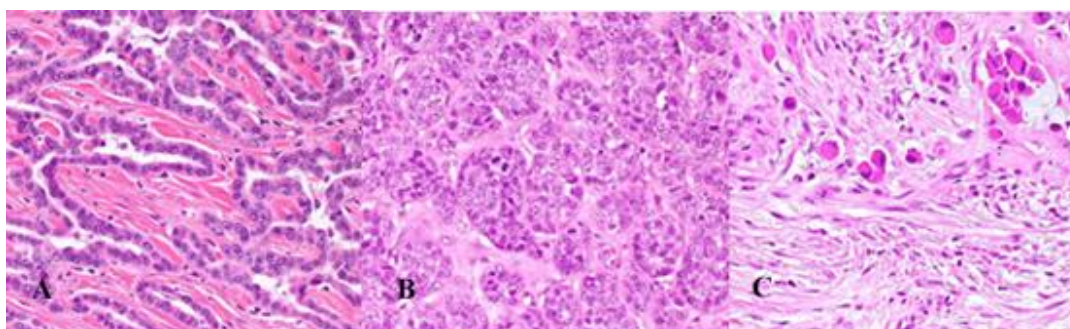
### **10.1 Histopatología de los tumores mamarios**

Las muestras de tumores de las perras enteras y castradas fueron clasificadas en: benignos, malignos e hiperplasias. Dentro de las perras enteras fueron: benignos n=4 (2 adenomas complejos, 1 adenoma simple mioepitelial, 1 fibroadenoma); malignos n=9 (1 tumor mioepitelial, 2 adenocarcinoma tubular simple, 1 adenocarcinoma, 1 carcinoma tubular, 1 carcinoma de tipo mixto, 1 carcinoma anaplásico, 1 carcinoma simple sólido, 1 carcinoma tubular simple); e hiperplasias n=2 (1 hiperplasia lobulillar, 1 Hiperplasia epitelial tubular). En las perras castradas se clasificaron en benignos n=3 (1 adenoma simple, 1 adenoma tubular simple, 1 tumor mixto benigno); maligno n=1 (1 carcinoma anaplásico) e hiperplasias n=3

(hiperplasia lobulillar regular, hiperplasia lobulillar, hiperplasia ductal) (Figuras 11 y 12).



**Figura 11.** Histología del tejido mamario tumoral canino, tinción con hematoxilina y eosina, 100x. Tumores Benignos. A) Adenoma simple. B) Adenoma complejo. C) Hiperplasia lobulillar.



**Figura 12.** Histología del tejido mamario tumoral canino, tinción con hematoxilina y eosina, 100x. Tumores Malignos. A) Carcinoma tubular. B) Carcinoma solido. C) Carcinoma anaplásico.

## 10.2. Concentración de progesterona sérica en perras con tumores mamarios

Se encontró efecto del estadio del ciclo reproductivo ( $P < 0,0001$ ) sobre la concentración de P4 sérica. La concentración de P4 sérica fue mayor en diestro que en proestro, estro, anestro y castradas (Cuadro V).

**Cuadro V.** Concentraciones de P4 (ng/mL) sérica en perras con tumores mamarios

Perras en	P4 sérica (ng/mL, media $\pm$ EEM )
Proestro (n=4)	0,51 $\pm$ 0.03 (a)
Estro (n=3)	7,92 $\pm$ 2.26 (b)
Diestro (n=2)	29,60 $\pm$ 7.21 (c)
Anestro (n=3)	1,24 $\pm$ 0.30 (a)
Castradas (n=7)	1,15 $\pm$ 0.28 (a)

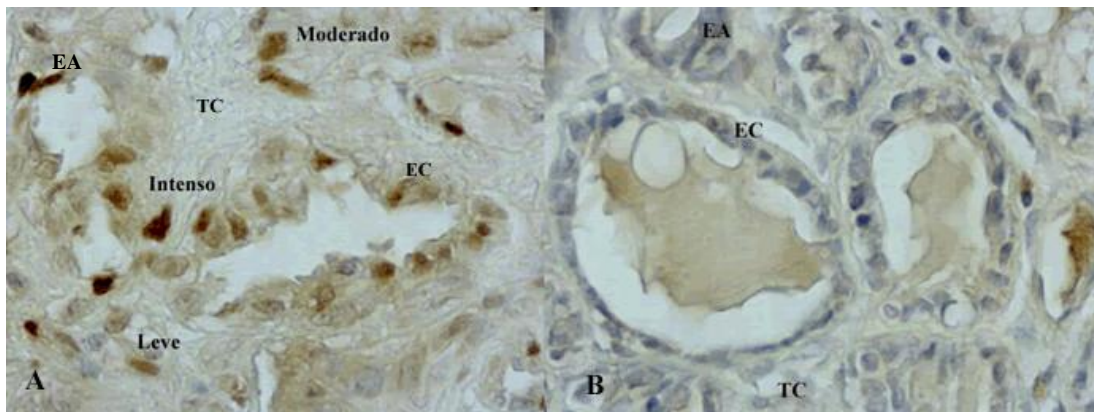
Diferente letra para los diferentes estadios indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

Los niveles de P4 circulantes en los 2 animales con pseudopreñez (uno con tumor benigno y uno con tumor maligno) fueron  $2,08 \pm 0,45$  ng/mL, media  $\pm$  EEM).

Estos dos animales no fueron incluidos en los análisis de P4 junto con los de diestro y tampoco fueron incluidos en los análisis de receptores de los tumores benignos y malignos porque la patología agregada (pseudopreñez) puede afectar los resultados (Nieto et al. 2000) y los diferencia de otros animales.

### 10.3. Distribución e intensidad de inmunomarcado a RE $\alpha$ en tumores mamarios de perras enteras

Se detectó inmunomarcado a RE $\alpha$  en el tejido conectivo, epitelial alveolar y de conductos en las muestras de glándula mamaria inguinal de las perras estudiadas (n=12). Los controles negativos no presentaron inmunomarcado a RE $\alpha$  (Figura 13).

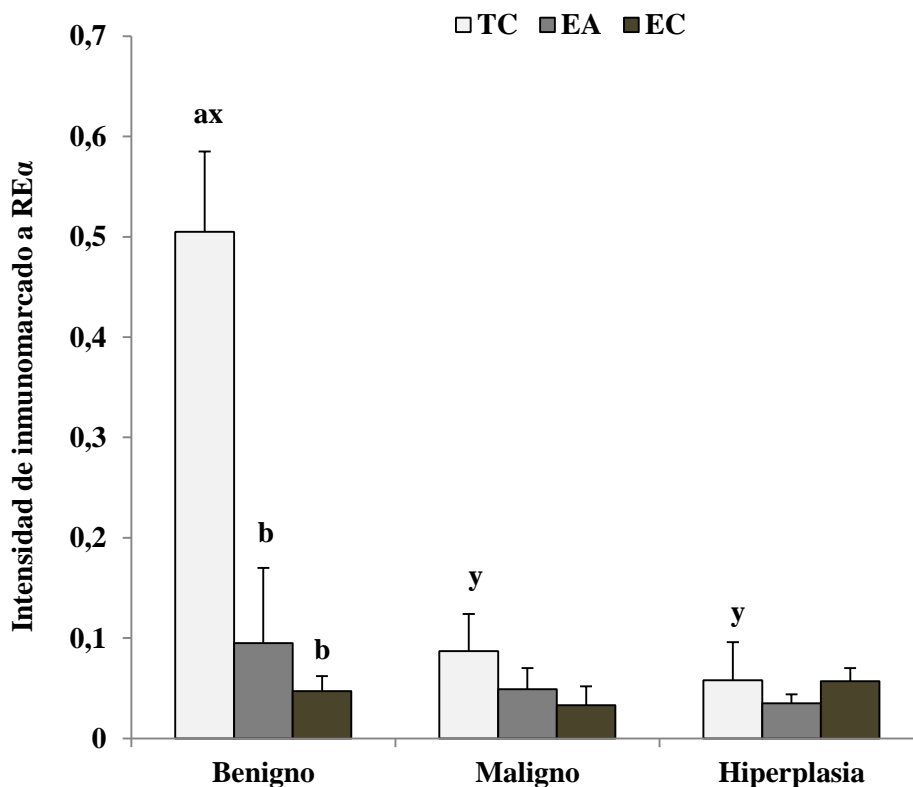


**Figura 13.** A) Intensidad de inmunomarcado a RE $\alpha$  en tejido conectivo (TC), epitelio alveolar (EA) y de conductos (EC) de la glándula mamaria tumoral canina 400x; el inmunomarcado a RE $\alpha$  se visualiza de color marrón en el núcleo de las células con tinción leve, moderada o intensa. B) Control negativo, el núcleo celular se visualiza de color azul.

Se encontró efecto de tipo de tumor ( $P=0,0003$ ), compartimento histológico ( $P=0,0002$ ) e interacción entre ambos en la intensidad de inmunomarcado a RE $\alpha$  ( $P=0,0003$ ). La intensidad de inmunomarcado (media  $\pm$  EEM) a RE $\alpha$  fue mayor en tumores benignos ( $0,220 \pm 0,16$ ) que malignos ( $0,056 \pm 0,027$ ) e hiperplasias ( $0,050 \pm 0,02$ ) ( $P<0,001$ ) y no hubo diferencias entre los tumores malignos e hiperplasias. La intensidad de inmunomarcado a RE $\alpha$  fue mayor en tejido conectivo ( $0,220 \pm 0,05$ ) que epitelios alveolar ( $0,06 \pm 0,017$ ) y de conductos ( $0,05 \pm 0,014$ ) ( $P<0,0004$ ) y no hubo diferencias entre epitelios de conductos y alveolar.

En los tumores benignos el inmunomarcado a RE $\alpha$  fue mayor en tejido conectivo que epitelios alveolar y de conductos ( $P<0,0001$ ). En los tumores malignos e hiperplasias no hubo diferencias en la intensidad de inmunomarcado entre los compartimentos estudiados (Figura 14).





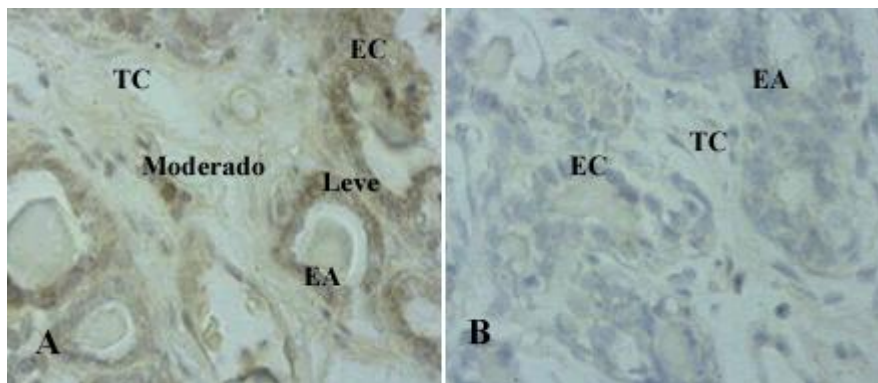
**Figura 14.** Intensidad de inmunomarcado a RE $\alpha$  (media  $\pm$  EEM) en tejido conectivo (TC), epitelio alveolar (EA) y de conductos (EC) en tumores benignos (n=2), malignos (n=8) e hiperplasias (n=2). a, b indican diferencias para un mismo tipo de tumor y diferente compartimento histol3gico (P<0,05), x, y indican diferencias para el mismo compartimento histol3gico y diferente tipo de tumor.

En relaci3n a los diferentes tipos de tumores, la intensidad de inmunomarcado fue mayor en tejido conectivo de tumores benignos que malignos e hiperplasias (P<0,0001). La intensidad de inmunomarcado en epitelios alveolar y de conductos fue similar en los tumores benignos, malignos e hiperplasias (Figura 14).

En los 2 animales con pseudopreñez (uno con tumor benigno y uno con tumor maligno) el inmunomarcado a RE $\alpha$  (media  $\pm$  EEM) en el tejido conectivo, epitelios alveolar y de conductos fue 0,133  $\pm$  0,08, 0,033  $\pm$  0,013, 0,058  $\pm$  0,003 respectivamente.

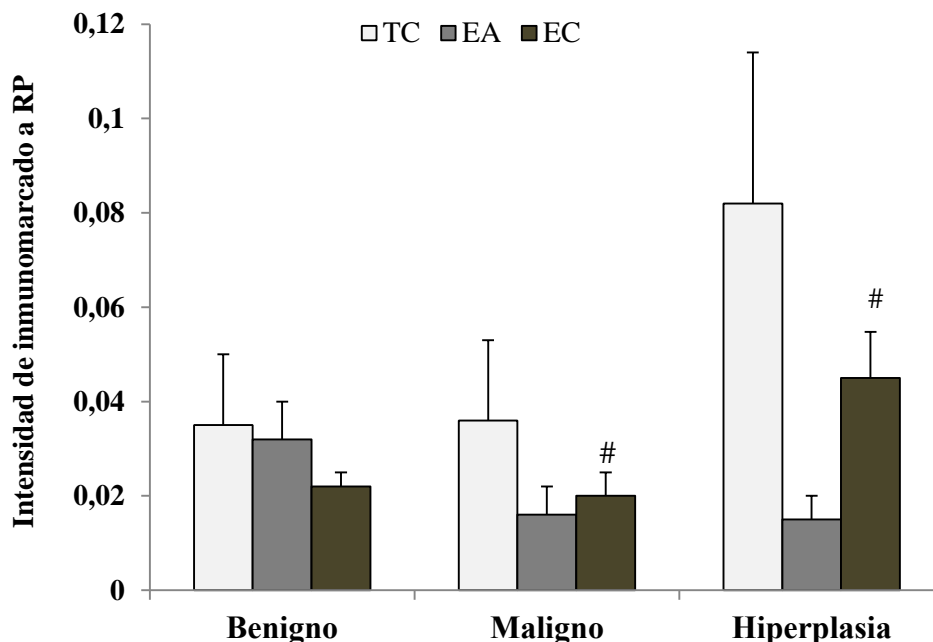
#### 10.4. Distribuci3n e intensidad de inmunomarcado a RP en tumores mamarios de perras enteras

Se detect3 inmunomarcado a RP en el n3cleo de tejido conectivo, epitelios alveolar y de conductos en las muestras de gl3ndula mamaria tumoral inguinal de las perras estudiadas (n=12). Los controles negativos no presentaron inmunomarcado a RP. (Figura 15)



**Figura 15.** A) Intensidad de inmunomarcado a RP en tejido conectivo (TC), epitelio alveolar (EA) y de conductos (EC) 400x; el inmunomarcado a RP se visualiza de color marrón en el núcleo celular con tinción leve, moderada o intensa. B) Control negativo (núcleos de color azul).

No se encontró efecto de tipo de tumor ( $0.030 \pm 0.008$ ,  $0.024 \pm 0.010$ ,  $0.048 \pm 0.025$  inmunomarcado a RP, media  $\pm$  EEM para tumores benignos, malignos e hiperplasias respectivamente), se encontró tendencia de compartimento histológico ( $P=0,089$ ) sobre la intensidad de inmunomarcado a RP. La intensidad de inmunomarcado (media  $\pm$  EEM) a RP tendió a ser mayor en el epitelio de conductos en las hiperplasias que en los tumores malignos (Figura 16).



**Figura 16.** Intensidad de inmunomarcado a RP (media  $\pm$  EEM) en tejido conectivo (TC), epitelio alveolar (EA) y de conductos (EC) en tumores benignos (n=2), malignos (n=8) e hiperplasias (n=2). # indica tendencia ( $P=0,089$ ).

En los 2 animales con pseudopreñez el inmunomarcado a RP (media  $\pm$  EEM) en el tejido conectivo, epitelios alveolar y de conductos fue  $0,013 \pm 0,008$ ,  $0,050 \pm 0,010$ ,  $0,025 \pm 0,020$ ) respectivamente.

No hubo efecto de la etapa del ciclo sobre la distribución ni sobre la concentración de RE ni de RP en perras con tumores mamarios.

### 10.5. Distribución e intensidad de inmunomarcado a RE $\alpha$ y RP en tumores mamarios de perras castradas

De las siete muestras, en una (tumor maligno) no se pudo determinar RE $\alpha$  porque se perdió la misma, en todas las demas, se detectó inmunomarcado. No hubo diferencias en la intensidad de inmunomarcado a RE $\alpha$  (media  $\pm$  EEM) entre tumores benignos ( $0,08 \pm 0,024$  n=3), e hiperplasia ( $0,11 \pm 0,077$  n=3). Tampoco hubo diferencias en la intensidad de inmunomarcado en los tres compartimientos estudiados ( $0,12 \pm 0,06$ ,  $0,05 \pm 0,008$ ,  $0,12 \pm 0,02$  para tejido conectivo, epitelios alveolar y de conductos respectivamente).

En relacion al RP, de las siete muestras de tumores en una (benigno) no se pudo determinar RP porque se perdió la muestra. Se detectó inmunomarcado en las muestras. No hubo diferencias en la intensidad de inmunomarcado (media  $\pm$ EEM) entre tumores benignos ( $0,033 \pm 0,017$  n=2) malignos ( $0,0033$ , n=1) e hiperplasias ( $0,06 \pm 0,047$ , n=3). Tampoco hubo diferencias en la intensidad de inmunomarcado en los tres compartimientos estudiados ( $0,026 \pm 0,012$ ,  $0,042 \pm 0,040$ ,  $0,028 \pm 0,016$  para tejido conectivo, epitelios alveolar y de conductos respectivamente).

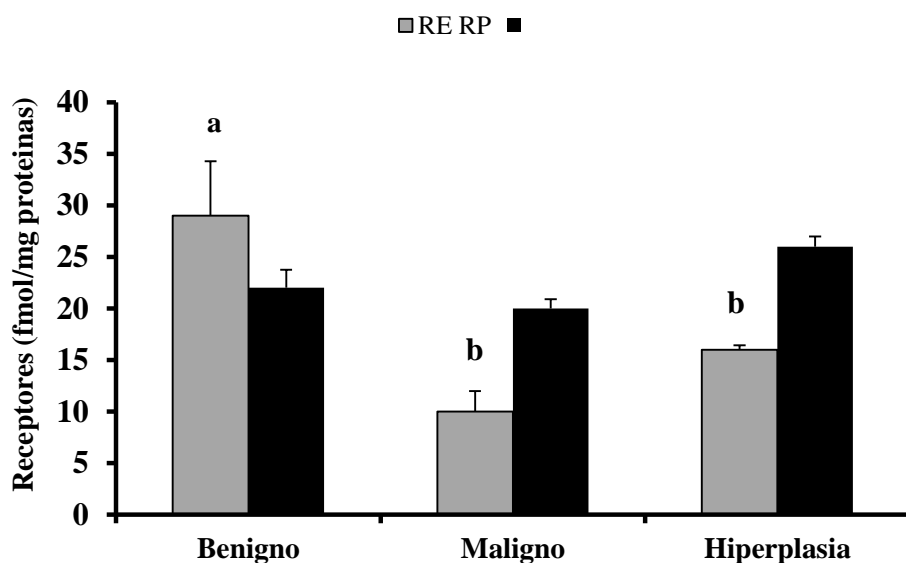
### 10.6. Concentración de RE y RP en tumores mamarios de perras enteras

En todas las muestras de glándula mamaria tumoral se demostró unión específica, saturable y desplazamiento de la unión con las hormonas no marcadas correspondientes. Los valores de Kd para RE y RP fueron similares en los tumores benignos, malignos e hiperplasias (Cuadro VI).

**Cuadro VI** Valores de Kd (nM) de RE y RP en perras enteras con tumores mamarios

<b>Tumores</b>	<b>Kd RE (nM) (media <math>\pm</math> EEM)</b>	<b>Kd RP (nM) (media <math>\pm</math> EEM)</b>
Tumores Benignos (n=3)	$0,75 \pm 0,16$	$1,29 \pm 0,26$
Tumores Malignos (n=8)	$0,52 \pm 0,09$	$1,26 \pm 0,19$
Hiperplasias (n=2)	$0,89 \pm 0,14$	$1,22 \pm 0,26$

Hubo efecto del tipo de tumor sobre la concentración de RE (P=0,002). En los tumores benignos la concentración fue mayor que en malignos (P=0,0005) y que en hiperplasias (P=0,03). La concentración de RE en los tumores malignos y en la hiperplasia fue similar (Figura 17). No hubo efecto del tipo de tumor sobre la concentración de RP (Figura 17). No hubo efecto de la etapa del ciclo sobre la concentración de RE ni de RP en las perras con tumores mamarios.



**Figura 17.** Concentración de RE y RP (fmol/mg de proteínas, media  $\pm$  EEM) en tumores benignos (n=3), malignos (n=8) e hiperplasias (n=2) Para el mismo receptor y diferente tipo de tumor a, b indican diferencias (P<0,05).

Los Kd (nM media  $\pm$  EEM) en las 2 perras con pseudopreñez fueron:  $1,12 \pm 0,49$   $1,67 \pm 0,14$  para RE y RP respectivamente. La concentración de receptores (fmol/mg proteínas, media  $\pm$  EEM) fueron:  $13 \pm 4$ ,  $52 \pm 7$  para RE y RP respectivamente.

### 10.7. Concentración de RE y RP en tumores mamarios de perras castradas

No hubo efecto del tipo de tumor sobre los valores de Kd de RE ni de RP, ni sobre la concentración de RE ni de RP (Cuadro VII).

**Cuadro VII.** Valores de Kd (nM) y concentración de RE y RP (fmol/mg proteínas) en perras castradas con tumores mamarios

Tumores	Kd (nM) (media $\pm$ EEM)		Concentración (fmol/mg proteínas) (media $\pm$ EEM)	
	RE	RP	RE	RP
Benignos (n=3)	$1,33 \pm 0,18$	$1,94 \pm 0,06$	$22 \pm 2$	$36 \pm 8$
Malignos (n=1)	0,30	1,23	11	13
Hiperplasias (n=3)	$0,81 \pm 0,19$	$1,23 \pm 0,18$	$42 \pm 14$	$52 \pm 20$

Considerando todos los animales con tumores (enteras y castradas), no se encontró correlación entre los niveles circulantes de P4 y la concentración de RE ni

de RP. Se encontró correlación positiva entre la concentración de RP y RE ( $r=0,72$ ,  $n=22$ ,  $P=0,0002$ ).

Considerando todos las perras enteras con tumores ( $n=13$ ) y las sanas adultas ( $n=12$ ); la concentración de RE (fmol/mg proteínas, media  $\pm$ EEM) en las perras con tumores fue menor ( $16 \pm 2.58$ ) que en perras normales ( $46 \pm 5.74$ ) ( $P<0,0001$ ) y la concentración de RP no se diferenci6.

## **11. DISCUSIÓN DE RESULTADOS EN TUMORES MAMARIOS**

Del estudio y clasificaci6n de las muestras de tejido tumoral surge que en las perras enteras el 60% de los tumores fueron malignos, este porcentaje es similar al reportado por P6rez Alenza et al. (2000) que encontraron entre un 41 y 53%. En las perras castradas la frecuencia de tumores malignos fue muy baja en acuerdo con el efecto beneficioso de la ovariectomía (Misdorp, 1988; Rutteman, 1988; Gobello & Corrada, 2001).

La concentraci6n de P4 circulante fue mayor al diestro que en las dem6s etapas del ciclo estudiadas, estos resultados est6n en acuerdo con lo reportado por (Manee-in et al. 2010; Concannon, 2011).

En nuestro trabajo se detect6 inmunomarcado a RE $\alpha$  y RP en los n6cleos de las c6lulas del tejido conectivo, tejido epitelial alveolar y de conductos en las muestras de tumores mamarios, benignos, malignos e hiperplasias de perras enteras y castradas. Nuestros resultados est6n de acuerdo con reportes previos donde tambi6n se encontr6 inmunomarcado a RE $\alpha$  y RP en tejido conectivo, epitelios alveolar y de conductos (Millanta et al. 2005, Mariotti et al 2013) y c6lulas positivas a RE $\alpha$  en tejido conectivo y epitelial (Graham et al. 1999). Sin embargo otros autores solo detectaron inmunomarcado a RE $\alpha$  y RP en epitelios alveolar y de conductos (Martín de las Mulas et al. 2005; Manee-in et al. 2009; Port Louis et al. 2012) e inmunomarcado a RE $\alpha$  solo en las c6lulas epiteliales alveolares y de conductos (Nieto et al. 2000). Los trabajos que reportan inmunomarcado en conectivo y epitelios utilizan el mismo anticuerpo primario y los que no reportan inmunomarcado en tejido conectivo utilizan otros anticuerpos primarios, esto sumado a la heterogeneidad de los tumores explica en parte las diferencias antes mencionadas (Peña et al. 2012). Encontramos diferencias en la distribuci6n de la intensidad de inmunomarcado a RE $\alpha$  en tejido conectivo, epitelios alveolar y de conductos en los tumores de perras enteras. Hubo tendencia a diferencias en la distribuci6n de RP en el epitelio de conductos. No encontramos publicaciones que reporten como se distribuye la intensidad de inmunomarcado a RE $\alpha$  ni a RP en tejido conectivo y epitelios alveolar y de conductos en gl6ndula mamaria tumoral.

En los tumores benignos la intensidad de inmunomarcado a RE $\alpha$  fue mayor en el tejido conectivo que en ambos epitelios. La mayor inmunotinci6n a RE $\alpha$  del tejido conectivo que rodea al tumor podría estar vinculada a la capacidad de transformaci6n maligna (Graham et al. 1999). En apoyo de esto nosotros encontramos que la intensidad de inmunomarcado a RE $\alpha$  en tejido conectivo fue menor en tumores malignos que en benignos e hiperplasias. El RP en epitelio de conductos tendió a ser menor en tumores malignos que hiperplasias. Esto est6 parcialmente en acuerdo con Millanta et al. (2005) que reportan que la inmunotinci6n

a RP decrece progresivamente en hiperplasias, tumores benignos y tumores malignos. En tumores malignos el inmunomarcado a RE $\alpha$  fue menor que en benignos, estos resultados están de acuerdo con el menor inmunomarcado a RE $\alpha$  en tumores malignos que benignos reportado por Nieto et al. (2000). Nosotros no encontramos diferencias en el inmunomarcado a RP entre tumores malignos y benignos a diferencia de lo reportado por otros autores (Ruttermann et al. 1988; Millanta et al. 2005; Mariotti. et al. 2012).

En nuestro trabajo todas las muestras tuvieron una concentración de RE y RP mayor a 2 y 5 fmol/mg prot respectivamente, por lo tanto consideramos todas las muestras positivas (Donnay et al. 1995a; Inaba et al. 1984). Similares resultados fueron reportados previamente (Millanta et al. 2005; Mariotti et al. 2013). Sin embargo Manee-in et al. (2009) reportaron que solo el 50% de los tumores mamarios fueron positivos a ambos receptores. Por otro lado Martín de las Mulas et al. (2005) encontraron que los tumores benignos fueron RE $\alpha$  y RP positivos y los malignos RE $\alpha$  negativos y RP positivos. Sin embargo Port Louis et al. (2012) reportaron que los tumores benignos fueron RE negativos y RP positivos y los malignos negativos a ambos receptores. Estas diferencias pueden explicarse en parte por el uso de diferentes anticuerpos primarios, aunque nosotros utilizamos un anticuerpo primario diferente al de Millanta et al. (2005). La heterogeneidad de los tumores mamarios así como el número de casos estudiados también explicaría las diferencias en los resultados.

En las perras con pseudopreñez (una con tumor benigno y otra maligno) el inmunomarcado a RE $\alpha$  y RP fue similar al de las perras con tumores malignos. Martín de las Mulas et al. (2005) y Mariotti et al. (2013) no encontraron relación entre la intensidad del inmunomarcado a RE y RP y la condición de pseudopreñez. Sin embargo Nieto et al. (2000) reportaron mayor inmunomarcado a RE $\alpha$  en perras con tumores malignos con historia clínica de pseudopreñez sugiriendo un posible efecto beneficioso del estado hormonal en las perras con pseudopreñez.

En las perras castradas no encontramos diferencias en la intensidad de inmunomarcado a RE $\alpha$  y RP entre tumores benignos malignos e hiperplasias. Sin embargo se reportó que perras ovariectomizadas con tumores mamarios tienen menor inmunomarcado RE $\alpha$  que las enteras Nieto et al. (2000). En nuestro trabajo de 7 animales solo uno presento tumor maligno y esto está de acuerdo con que la castración temprana previene el desarrollo del tumor mamario (Misdorp, 1988; Rutteman, 1988; Gobello & Corrada, 2001). Por el contrario Mariotti (2013) reportó que, el grado de malignidad no se correlaciona con la condición de entera o castrada, ni la edad al momento del diagnóstico del tumor, sin embargo la ovariectomía antes del primer celo se sigue recomendando (Sorenmo et al. 2011).

Los valores de Kd para RE y RP fueron similares en los diferentes tumores estudiados y similares a los de las perras normales. Nuestros resultados son similares a los reportados para ambos receptores en tejido mamario canino tumoral (Inaba et al. 1984; Ruttermann et al. 1988; Donnay, 1995 a), sugiriendo que estamos midiendo la misma proteína y que el factor fundamental en la capacidad de respuesta del tejido es la concentración de proteínas receptoras.

Nosotros detectamos RE y RP en las muestras de tejido tumoral y la concentración de RE fue menor en tumores malignos que en benignos e hiperplasias, y en la de RP no hubo diferencias, esto está en acuerdo con lo reportado por Rutterman et al. (1988) y parcialmente de acuerdo con Donnay et al. (1993) que reportaron que la concentración de RE y RP en carcinomas fue menor que en otros tumores. Donnay et al. (1995 a) reportaron que aproximadamente el 80% de los tumores fueron positivos a RE a RP o ambos y menos de un 20% de los tumores expresa un solo tipo de receptor. Sin embargo Inaba et al. (1984) reportaron que solo 13 de 27 tumores fueron RE y RP positivos considerando benignos y malignos y Hamilton, (1977) reportó que solo 34 de 65 malignos y 16 de 64 benignos fueron RE positivo. El desacuerdo en los porcentajes de tumores positivos o negativos reportados por los diferentes autores, puede ser debido a diferencias en los puntos de corte utilizados para el criterio de inclusión como positivos (Inaba et al. 1984; Rutterman et al. 1988; Donnay et al. 1995 a) y a la heterogeneidad en la presentación de los diferentes tumores mamarios (Peña et al. 2012).

En las dos perras con pseudopreñez la concentración de RP fue más alta que la que encontramos en las perras normales y con tumores mamarios. Sin embargo Donnay et al. (1995 a) en once animales estudiados no encontraron diferencias en la concentración de RP entre perras con tumores y normales; estas diferencias pueden explicarse por el número de animales estudiados. Por otro lado no se ha podido comprobar otros factores reproductivos como la irregularidad en los ciclos, pseudogestaciones, gestaciones o edad del primer parto que influyan de manera significativa en el riesgo de padecer tumores mamarios (Brodey et al. 1966; Scheneider et al. 1969).

En las perras castradas no encontramos diferencias en la concentración de RE ni RP entre tumores benignos malignos e hiperplasias. Se reportó una casuística de tres (Rutterman et al. 1988) y cuatro animales (Graham et al. 1999) ovariectomizados con tumores mamarios, pero los autores no reportan las concentraciones de receptores por lo tanto no tenemos información con la cual comparar nuestros resultados.

## **12. DISCUSIÓN GENERAL**

En este trabajo encontramos que la concentración de RE fue menor en glándula mamaria tumoral que normal, y en la de RP no encontramos diferencias. Similares resultados fueron reportados por Rutterman et al. (1988). Menor expresión de RE y RP en tejido tumoral maligno que en tejido mamario normal fue reportado por (Millanta et al. 2005; Mariotti et al. 2013). Por el contrario Manee-in et al. (2009) no encontraron diferencias en la expresión de RE y RP entre el tejido normal y tumoral. Diferencias entre los resultados pueden ser debidas a que algunos autores se refieren a tejido mamario normal cuando utilizan tejido contiguo a la lesión, controlateral y/o separado de la lesión por una glándula no afectada (Rutterman et al. 1988; Donnay et al. 1993; 1995; Millanta et al. 2005). La menor expresión de RE y RP en tumores en relación al tejido normal concuerda con el hallazgo de que los RE y RP están presentes en lesiones benignas de tipo hiperplásico o en tumores benignos, pero disminuyen o no se expresan en los tumores malignos (Ortega et al. 2013).

La menor expresión de receptores de hormonas esteroides ováricas en tumores mamarios caninos malignos que benignos estaría vinculada con la progresión hacia la malignidad (Geraldtes et al. 2000) y con una disminución tisular de P4 y un aumento en la proliferación celular del tejido tumoral (Thuróczy et al. 2007). En acuerdo con esto, Geraldtes et al. (2000) no detectaron inmunomarcado a RE $\alpha$  en tejido mamario normal ni tumoral pero los tumores malignos RP negativos tuvieron una tasa mayor de proliferación que los RP positivos (medida en términos de antígeno nuclear Ki-67), sugiriendo que la progresión a la malignidad estaría vinculada a una pérdida de la hormono dependencia y aumento en el crecimiento autónomo del tumor. En apoyo de esto, se reportó que tumores mamarios humanos RE negativos tuvieron una tasa de proliferación mayor que los positivos sugiriendo que la tumorigenesis es paralela con la progresiva hormono independencia (Schmitt, 1995). Esto concuerda con que la desregulación entre la expresión de RE $\alpha$  y la proliferación del tejido mamario ocurre a etapas muy tempranas del desarrollo tumoral mamario humano (Anderson, 2002).

En nuestro trabajo en la glándula mamaria normal la concentración de RE se correlacionó negativamente con la de P4, pero no la de RP y P4. Pero no se encontró correlación entre la concentración de RE ni de RP y los niveles circulantes de P4 en la glándula mamaria tumoral. Estos resultados sugieren que la expresión de al menos el RE en las perras normales está vinculada a los niveles circulantes de P4 sin embargo en las perras con tumores mamarios no se pudo demostrar este vínculo con los niveles circulantes de hormonas probablemente debido a la heterogeneidad tumoral y al bajo de animales estudiados. La correlación positiva que encontramos entre la concentración de RP y RE en perras normales (tendencia) y con tumores mamarios sugiere una interdependencia entre ambos receptores. Similar correlación positiva entre RP y RE en tejido mamario normal y tumoral de perra (tomados del mismo o diferente animal) fue reportada previamente por algunos autores (Rutterman et al. 1988; Donnay et al. 1993; 1995 a; Manee-in et al. 2009) mientras que otros no la encontraron (Millanta et al. 2005; Port Louis et al. 2012) la falta de correlación puede ser debida al alto porcentaje de muestras negativas a uno o a ambos receptores. La dependencia entre RE $\alpha$  y RP indica que ambos receptores pueden ser usados para la predicción de una terapia hormonal (Manee-in et al. 2009).

Diferencias en el porcentaje de muestras de tejido mamario, positivas a RE $\alpha$  y/o RP entre diferentes trabajos, pueden deberse a: que se tome el 5% de inmunomarcado (Millanta et al. 2005; Martín de las Mulas et al.2000; Mariotti et al. 2013), 5% del promedio de intensidad ponderado (Nieto et al.2000) o 5 fmol/mg prot (concentración por ensayos de unión, Inaba et al. 1984; Rutterman et al. 1988; Donnay et al. 1995a). En nuestro trabajo considerando solo el porcentaje de inmunomarcado solo 7 de 32 y 2 de 32 muestras fueron positivas, mientras que considerando el promedio de intensidad ponderado 21 de 32 y 6 de 32 fueron positivas para RE $\alpha$  y RP respectivamente y por ensayos de unión todas las muestras fueron positivas para ambos receptores, por lo tanto el análisis de los ensayos de inmunohistoquímica que consideren en promedio de intensidad ponderado se aproximan más a los estudios de la concentración de los receptores y serían más adecuados para estimar la positividad de las muestras.

Los grupos más frecuentes de tumores mamarios reportados son RE $\alpha$  y PR positivo entre los benignos y RE $\alpha$  negativo y PR positivo los malignos, sugiriendo



que las vías relacionadas con los estrógenos y con las progestinas pueden proporcionar dianas eficaces para el tratamiento del cáncer de mama (Martín de las Mulas et al 2005). El tamoxifeno (inhibidor selectivo de receptores de estrógenos) es una de las drogas más usadas en el mundo en el tratamiento de cáncer de mama humano (Gelman, 1996), sin embargo su uso en el tumor mamario canino tiene efectos secundarios tales como piometra, hiperplasia vaginal, incontinencia urinaria, fiebre y alopecia, que limitan su uso (Misdorp. 1988; Rutterman & Misdorp, 1993). A pesar de esto, considerando el potencial terapéutico para aumentar la tasa de supervivencia de perras con tumores mamarios se recomendó una dosis de 0,8 mg de tamoxifeno/kg peso corporal/día durante al menos 120 días combinado con ovariectomía para evitar la aparición de efectos secundarios (Tabares et al. 2010). Más recientemente se desarrollaron nuevas drogas que tienen en cuenta que las formas de ER $\alpha$  difieren entre humano, perro y gato, pero el principal sitio de unión al ligando es el mismo. El bazedoxifeno, un nuevo SERM demostró ser el mejor antagonista de los estrógenos e inhibidor de ER $\alpha$  en todas las especies (humano, perro, gato). Para los perros y gatos también son recomendados Neohesperidina, dihidrochalcona y Schreiber2 (Toniti et al. 2011).

Por otro lado en el tratamiento de tumores de glándula mamaria de caninos positivos a RP se ha planteado el uso de antiprogesterinas (Misdorp, 1988). El aglepristone (antiprogesterina) no prolongó el tiempo de supervivencia general en perras con metástasis pulmonares (con historia de mastectomía previa), sin embargo los autores del trabajo no descartan que con otro esquema de tratamiento pudiera tener un efecto beneficioso (Hermo et al. 2010). Recientemente se planteó que la ausencia de la expresión de RP en el cáncer de mama debe ser re-evaluada, considerando el RP como un biomarcador de mal pronóstico incluso en muestras RE positivas y dichos pacientes deben ser considerados para una terapia sistémica adicional (Purdie et al. 2013). En el tumor mamario canino la mastectomía aun es casi exclusivamente el tratamiento de elección (Lana et al. 2007; Pérez Alenza & Pena, 1999). Además, la ovariectomía realizada en el momento de la extirpación del tumor mamario en perras adultas reduce el riesgo de aparición de nuevos tumores en un 50 % (Kristiansen et al. 2013). Considerando que la cirugía facilita el desprendimiento y diseminación de células tumorales viables (sanguínea o linfática) desarrollando metástasis también se podría establecer el tratamiento con desmopresina (DDAVP, 1-diamino-8-D-arginina, análogo sintético de vasopresina) que disminuye la diseminación de células metastásicas a ganglios y pulmón (Giron, et al. 2002; Hermo et al 2006; Hermo et al. 2008). El auge de la oncología veterinaria, el desarrollo de técnicas diagnósticas y el uso de marcadores moleculares, implica un beneficio sustancial tanto en los pacientes animales, como para pacientes humanos (Salas & Romero, 2011).

### 13. CONCLUSIONES

La distribución de inmunomarcado a ER $\alpha$  y RP en la glándula mamaria normal fue diferente de acuerdo al compartimiento histológico y estadio del ciclo, sugiriendo roles específicos de compartimiento histológico.

Los valores de Kd para RE y RP en glándula mamaria normal y tumoral fueron similares, lo que sugiere que las variaciones en la capacidad de respuesta de la glándula mamaria a los E y P4 pueden depender de los cambios en la capacidad de unión (concentraciones RE y RP) y no de la afinidad.

En la glándula mamaria tumoral la distribución e intensidad de inmunomarcado a RE $\alpha$  y RP vario con el compartimiento histológico y con el tipo de tumor. La mayor intensidad de inmunomarcado a RE $\alpha$  en tumores benignos, y la tendencia a ser mayor el RP en hiperplasias, sugieren que estas dos patologías tienen una mayor hormono dependencia que los tumores malignos.

El perfil de concentración de RE y RP en la glándula mamaria normal varió durante el ciclo reproductivo, fue menor en diestro que en proestro y estro en acuerdo con los mayores niveles circulantes de progesterona encontrados en diestro. En perras prepúberes la concentración de ambos receptores estuvo en el límite de detección en acuerdo con el escaso desarrollo de tejido mamario.

La concentración de RE varió de acuerdo al tipo de tumor, fue menor en tumores malignos que benignos e hiperplasias; la concentración de RP fue similar en los tumores estudiados. En las perras castradas no hubo diferencias en la concentración de RE ni de RP. Estos resultados sugieren que en las perras con tumores benignos se podría instaurar una hormono terapia complementaria a la cirugía ablatoria mamaria.

## 14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alarid E. (2006). Lives and Times of Nuclear Receptors. *Mol Endocrinol* 20:1972-1981. Doi:10.1210/me.2005-0481.
- Anderson E. (2002). The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Res* 4:197-201.
- Argyle DJ. (2000). La glándula mamaria. En: Simpson GM, England GCW y Harvey H. *Manual de Reproducción y Neonatología en Pequeños Animales*. Ed España. Cap 5, pp 69-78.
- Argyle D & Khanna C. (2009). Biología y Patogénesis del Cáncer. En: Withrow SJ. and Vail DM. *Oncología Clínica de Pequeños Animales*. Ed. Multimédica Ediciones Veterinarias 4<sup>ta</sup> ed. Cap 2, pp 40-41, 55-56.
- Banks WJ. (1986). Aparato tegumentario. En: *Histología Veterinaria Aplicada*. Ed. El Manual Moderno. D.F., México. Cap 18; pp 430-438.
- Boos A, Meyer W, Schwarz R, Grunert E. (1996). Immunohistochemical assessment of estrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. *Anim. Reprod Sci* 44:11-21.

- Bramley T. (2003). Non-genomic progesterone receptors in the mammalian ovary: some unresolved issues *Reproduction* 125:3-15.
- Braunsberg H. (1984). Mathematical analysis of data from receptor assay. Clinical interest of steroid hormone receptors. Breast cancer. Recent results in cancer research. Eds: G. Leclerq, S. Toma, R. Paridaens, J. C. Heuson, Berlin: Springer-Verlag. p.9.
- Barrios E, Vasallos JA, Alonso R, Garau M, Musetti C. (2010). III Atlas de incidencia del cáncer en el Uruguay 2002-2006. Montevideo: Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer, Registro Nacional de Cáncer,
- Brodey RS, Fidler IJ, Howson AF. (1966). The relationship of Estrous Irregularity pseudopregnancy and pregnancy to the development of canine mammary neoplasm. *J Am.Vet Med Assoc* 149 107-1049
- Brodey RS, Goldschmidt MH, Roszel JR. (1983). Canine mammary gland neoplasms. *J Am Anim Hosp Assoc* 19:61-90.
- Chandra SA, Cline JM, Adler RR. (2010). Cyclic morphological changes in the beagle mammary gland. *Toxicol Pathol* 38:969-983. Doi: 10.1177/0192623310374327.
- Clark JH, Schrader WT. & O'Malley BW. (1992). Mechanisms of steroid hormones action. En: Textbook of Endocrinology. Eds: Wilson, J.D. & Foster, D.W. W.B. Saunders, Philadelphia, PA. 35–90 pp.
- Clark JH, Mani SK. (1994). Actions of ovarian steroid hormones. En: The Physiology of Reproduction. Eds: Knobil, E, Neill, JD. Raven Press, New York, USA. 2<sup>nd</sup> ed. Vol. 2 Cap, 17, pp 1011-1059.
- Colitti M, Parillo F. (2013). Immunolocalization of estrogen and progesterone receptors in ewe mammary glands. *Microsc Res Tech* 76:955-962. Doi:10.1002/jemt22254.
- Concannon PW. (1983). Reproductive physiology and endocrine patterns of the bitch. En: Current Veterinary Therapy VIII. Small Anim Pract Kirk, R.W. Ed. WB Saunders Co, Ph, EEUU. Section 12, pp 886-893.
- Concannon PW. (2011). Reproductive cycles of the domestic bitch. *Anim Reprod Sci* 124:200-210.
- Concannon PW, Castracane VD, Temple M, Montanez A. (2009). Endocrine control of ovarian function in dogs and other carnivores. *Anim Reprod* 6:172-193.
- Concannon PW, Spraker TR, Casey HW, Hansel W, (1981). Gross and histopathologic effects of medroxyprogesterone acetate and progesterone on the mammary gland of adult beagle bitches. *Fertil Steril* 36:373-387.

- Conneely OM, Mulac-Jericevic B, Arnett-Mansfield R. (2008). Progesterone Signaling in mammary gland development. Ernest Shering Foundation Symposium Proceeding, Vol.1, pp 45-54. Doi: 10.1007/2789-2008-075.
- Conneely OM, Mulac-Jericevic B, Lydon JP. (2003). Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids* 68:771-778. Doi: 10.1016/S0039-128X (03)00126-0.
- Conneely OM. (2001). Perspective female steroid hormone action. *Endocrinol* 142:2194-2199.
- Connor EE, Wood DL, Sonstegard TS, da Mota AF, Bennett GL, Williams JL, Capuco AV. (2005). Chromosomal mapping and quantitative analysis of estrogen-related receptor alpha-1, estrogen receptors alpha and beta and progesterone receptor in the bovine mammary gland. *J Endocrinol* 185:593-603. Doi: 10.1677/joe.1.06139.
- Couse JF. & Korach KS. (1999). Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocrine Reviews* 20, 358–417.
- Cunningham J. (2003). La glándula mamaria. En: Cunningham J. *Fisiología Veterinaria*. Ed Elsevier. 3<sup>era</sup> ed. Madrid, España, Cap 38, pp 406-420.
- Cheng G, Li Y, Omoto Y, Wang Y, Berg T, Nord M, Vihko P, Warner M, Piao Y-S, Gustafsson J-A. (2005). Differential regulation of estrogen receptor ER $\alpha$  and ER $\beta$  in primate mammary gland. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90. pp. 435–444.
- Derivaux J, Ectors F. (1984). Recuerdo fisiológico. En: Derivaux J, Ectors F. *Fisiopatología de la gestación y obstetricia veterinaria*. Editorial Acribia. España. Cap 2, pp 15-23-28.
- Di Fiore M. (1981). Aparato genital femenino En: Di Fiore Manual diagnóstico histológico. Tomo I. Ed. Ateneo Buenos Aires, Argentina. 8<sup>va</sup> ed. Cap 10, pp 361-363.
- Donnay I, Rauis J, Devleeschower N, Wouters-Ballman P, Leclercq G, Verstegen J. (1995a) Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. *Am J Vet Res* 56:1188-1194.
- Donnay I, Rauis J, Wouters-Ballman P, Devleeschower N, Leclercq G, Verstegen JP. (1993). Receptors for oestrogen, progesterone and epidermal growth factor in normal and tumorous canine mammary tissues. *J Reprod Fert Suppl* 47:501-512.

- Donnay I, Wouters-Ballman P, Devleeschouwer N, Leclercq G, Verstegen J. (1995b). Changes in oestrogen, progesterone and epidermal growth factor receptor concentrations and affinities during the oestrous cycle in the normal mammary gland and uterus of dogs. *Vet Res Com* 19:101-113.
- Edens MSD. & Health AM. (2005). Manejo de la reproducción en la perra y la gata. Root Kustritz, M.V. Manual de reproducción del perro y del gato. Editorial Multi-Médica. Barcelona, España. pp. 15-22.
- Ehrhart EJ, Powers B. (2009) Patología de la neoplasia. (2009). En: Withrow SJ, Vail DM. Oncología clínica de pequeños animales. Multimédica Ed.Veterinarias 4<sup>ta</sup> ed. Cap 3, pp 55-56.
- Else RW, Hannant D. (1979). Some epidemiological aspects of mammary neoplasia in the bitch. *Vet Rec* 104:296-304.
- Feldman E, Nelson R. (2007). Ciclo ovárico y citología vaginal. En: Feldman E, Nelson R. Endocrinología y reproducción canina y felina. Ed. Inter-médica. Buenos Aires, Argentina. 3<sup>ra</sup> ed. Cap 19, pp 834-854.
- Ferreira E, Gobbi H, Saravia BS, Cassali GD. (2010). Columnar cell lesions of the canine mammary gland: pathological features and immunophenotypic analysis. *BMC Cancer* 10:61-67. <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/10/61>.
- Geraldes M, Gärtner F, Schmitt F. (2000). Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. *Vet Rec* 146:403-406.
- Giles RC, Kwapien RP, Geil RG, Cassey HW. (1978). Mammary nodules in Beagle dogs administered investigational oral contraceptive steroids. *J Natl Cancer Inst* 60:1351-1364.
- Giron S, Tejera AM, Ripoll GV, Gómez DE, Alonso DF. (2002). Desmopressin inhibits lung and lymph node metastasis in a mouse mammary carcinoma model of surgical manipulation. *J Surg Oncol* 81:38-44.
- Gobello C, Corrada Y. (2001). Canine mammary tumors: An Endocrine Clinical Approach. *Small Animal/Exotics Compendium* 23:705-710.
- Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R and Zappulli V. (2011). Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol* 48:117-131. Doi: 10.1177/0300985810393258.

- Graham JC, O'Keefe DA, Gelberg HB. (1999). Immunohistochemical assay for detecting estrogen receptors in canine mammary tumors. *AJVR* 60:627-630.
- Garófalo EG, Tasende C. (1996). Uterine estrogen and progesterone receptors in prepubertal ewes: distributions in myometrium, endometrium and caruncles. *Vet Res* 27:177-183.
- Hamilton JM. (1977). Oestrogen receptors in canine mammary tumours. *Vet Rec* 101:258-260.
- Hampe JF, Misdorp W. (1974). IX. Tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bull World Health Organ.* 50:111-133.
- Haslam SZ, Shyamala G. (1981). Relative distribution of estrogen and progesterone receptors among the epithelial, adipose, and connective tissue components of the normal mammary gland. *Endocrinology* 108:825-830.
- Hedlund CS. (2009) Neoplasia mamaria. En: Fossum TW. Cirugía en pequeños animales. Ed. Elsevier España 3<sup>era</sup> ed. Cap. 26, pp 729-735.
- Henderson BE, Ross R, Bernstein L. (1988). Estrogens as cause of human cancer: The Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award lecture. *Cancer Research* 48:246-253.
- Hermo GA, Torres P, Ripoll GV, Scursoni AM, Gómez DE, Alonso DF, Gobello C. (2008). Perioperative desmopressin prolongs survival in surgically treated bitches with mammary glands tumours: A pilot study. *The Vet J* 178:103-108.
- Hermo G, Soldati R, Wargon V, Scursoni A, Lanari C, Gobello C. (2010) Inmunohistoquímica y expresión de receptores de estrógenos y progesterona en neoplasias mamarias malignas caninas en distintos estadios clínicos. *Revista Científica, FCV-LUZ / 20:* 245-253.
- Hermo G, Villanueva M, Segura P, Alonso D, Gobello C. (2009). Evaluación del efecto del antiprogéstágeno, aglepristone, sobre la regresión tumoral y sobrevida en perras con tumores mamarios estadio V. *An Vet* 25:87-96.
- Humphreys RC, Lydon J, O'Malley BW, Rosen JM. (1997). Mammary gland development is mediated by both stromal and epithelial progesterone receptors. *Mol End* 11:801-811.

- Inaba T, Takahashi N, Matsuda H, Imori T. (1984). Estrogen and progesterone receptors and progesterone metabolism in canine mammary tumours. *Jpn. J Vet Sci* 46:797-803.
- Ing NH, Massuto DA, Jaeger LA. (2008). Estradiol up-regulates AUF1p45 binding to stabilizing regions within the 3'-untranslated of estrogen receptor  $\alpha$  mRNA. *J Biol Chem* 283:1764-1772. Doi: 10.1074/jbc.M704745200.
- Ing NH, Spencer TE, Bazer FW. (1996). Estrogen enhances endometrial estrogen receptor gene expression by a posttranscriptional mechanism in the ovariectomized ewe. *Biol Reprod* 54:91-599.
- Ing NH. & Ott TL. (1999). Estradiol up-regulates estrogen receptor- $\alpha$  messenger ribonucleic acid in sheep endometrium by increasing its stability. *Biol Reprod* 60, 134-139
- Ing NH, Tsai SY, Tsai MJ. (1993). Progesterone and estrogen. En: Genes in mammalian reproduction. Ed: Gwatkin, R. B. L. Wiley-Liss Inc. New York, NY. pp 271-291.
- Ing NH. (2005). Steroid hormones regulate gene expression posttranscriptionally by altering the stabilities of messenger RNAs. *Biol Reprod* 72:1290-1296. Doi: 10.1095/biolreprod.105.040014.
- Ithurralde J, Costas AL, Pessina P, Cueto E, Fila D, Meikle A. (2013). Immunohistochemical determination of estrogen receptor- $\alpha$  in canine vaginal biopsies throughout proestrus, estrus, and early diestrus. *Theriogenology* xxx 1-7 Doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.07.007
- Jeffcoate I. (2000). Fisiología y endocrinología de la reproducción en la perra. En: Simpson, G.M., England, G.C.W., Harvey, M. Manual de Reproducción y Neonatología en Pequeños Animales. Ed. S. 1ª ed. España. Cap.1. 1-13 pp.
- Knapp DW, Waters DJ, Schmidt BR. (2002) Tumores del Sistema urogenital y glándulas mamarias En: Ettinger SJ & Feldam EC Tratado de medicina interna veterinaria enfermedades del perro y el gato. Ed Intermedica 5ª ed Buenos Aires Argentina Cap 102 pp-602-608.
- Kitchel B. (2003) New chemotherapy agents in veterinary medicine. En: Veterinary clinics of north america. small animal practice advance in medical oncology. Ed. W: B Saunders Company, Philadelphia United States of America. Vol. 33.Number 3, pp 629-649.
- Kristiansen VM, Nodtvedt A, Breen AM, Langeland M, Teige J, Goldschmidt M, Jonasdottir TJ, Grotmol T, Sorenmo K. (2013). Effect of ovariohysterectomy at the time of tumor removal in dogs with benign mammary tumors and hyperplastic lesions: a randomized controlled clinical trial. *J Vet Intern Med* 27:935-942. Doi: 10.1111/jvim.12110.

- Kuiper GGJM, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:5925-5930.
- Lana SE, Rutterman GR, Withrow. (2007). Tumors of the mammary glands. En: Withrow SJ, Mc Ewen EG. *Small Animal Clinical Oncology* Ed. WB Saunders, Philadelphia. 4<sup>ta</sup> ed. Cap 26, pp 605-628.
- Lantiga-van Leeuwen IS, Garderen E, Rutteman GR, Mol JA. (2000). Cloning and cellular localization with growth hormone in the mammary gland. *J Steroid Biochem Mol Biol* 75:219-228.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:205–275.
- MacEwen EG, Patnaik AK, Harvey HJ, Panko WB. (1982). Estrogen receptors in canine mammary tumors. *Cancer Res* 42:2255-2259.
- Manee-in S, Srisuwatanasagul S, Lohachit C, Suwimonteerabutr J, Sirivaidyapong S. (2009). The number of ER $\alpha$  and PR in the mammary glands of bitches with and without tumor mass using immunohistochemical assay. *Comp. Clin. Pathol* 18:221-227. Doi: 10.1007/s00580-008-0786-3.
- Manee-in S, Srisuwatanasagul S, Lohachit C, Suwimonteerabutr J, Sirivaidyapong S. (2010). Estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) and progesterone receptor (PR) in the mammary gland of bitches during different stages of estrous cycle. *Comp Clin Pathol* 19:173–178. Doi 10.1007/s00580-009-0847-2.
- Mangieri J, Gomez H, Ciralo J, Ontiveros L. (1994). Neoplasias mamarias. En: *Oncología veterinaria*. Ed. Prensa Veterinaria Argentina, Buenos Aires, Argentina, Cap 2, pp 129-138.
- Mangieri J, Ontiveros L, Toledo, M. (1994). Examen del paciente oncológico. En: *Oncología veterinaria* Ed. Prensa Veterinaria Argentina, Buenos Aires, Argentina. Cap 1, pp 3-20.
- Manteca X. (2003). Origen del perro. En: *Etología clínica veterinaria del perro y del gato*. Ed: Multimedica. Barcelona España. Cap.2, pp 9-11.
- Mariotti F, Giacomo R, Subeide M. (2013). Immunohistochemical evaluation of ovarian hormonal receptors in canine mammary tumors. *Open J Vet Med* 3:104-110. Doi: 10.4236/ojvm.2013.32017.
- Martín de las Mulas J, Reymundo C. (2000). Animal models of human breast carcinoma: canine and feline neoplasms. *Rev Oncol* 2:274-281.
- Martín de las Mulas J, Millán Y, Dios R. (2005). A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor  $\alpha$  and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free



- period in mammary tumors of the dog. *Vet Pathol* 42:200. Doi: 10.1354/vp.42-2-200.
- Martín de las Mulas J, Ordas J, Millan Y, Chacon F, De Lara M, Espinosa De Los Monteros A, Reymundo C, Jover A. (2004). Immunohistochemical expression of estrogen receptor  $\beta$  in normal and canine mammary glands. *Vet Pathol* 41:269-272.
- Martin PM. & Sheridan PJ. (1982). Towards a new model for the mechanism of action of steroids. *J Steroid Biochem* 16, 215–229.
- Meikle A, Tasende C, Sosa C, Garófalo EG. (2004). The role of sex steroid receptors in sheep female reproductive physiology. *Reprod Fertil Dev* 16:385-394.
- Meikle A, Bielli A, Masironi B, Pedrana G, Wang H, Forsberg M, Sahlin L.(2000). An immunohistochemical study on the regulation of estrogen receptor  $\alpha$  by estradiol in the endometrium of the immature ewe. *Reprod. Nutr Dev* 40:587-596.
- Millanta F, Calandrella M, Bari G, Niccolini M, Vannozzi I, Poli A. (2005). Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Res Vet Sci* 79:225-232. Doi: 10.1016/j.rvsc.2005.02.002.
- Miller BG, Murphy L, Stone GM. (1977). Hormone receptor levels and hormone, RNA and protein metabolism in the genital tract during the oestrous cycle of the ewe. *J Endoc* 73:91-98.
- Misdorp W. (2002). Tumors of the mammary gland. En: Meuten JD Tumors in domestic animals. Ed. Iowa State Press Ames, Iowa, 4<sup>ta</sup> ed. USA Cap 12, pp 575-605.
- Misdorp W. (1988). Canine mammary tumours: protective effect of late ovariectomy and stimulating effect of progestins. *Vet Quart* 10:26-33.
- Misdorp W, Else RW, Hellmén E, Lipscomb TP. (1999). Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. WHO International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. AFIP Washington DC, 2<sup>nd</sup> series Vol. VII, pp 11-29.
- Mol JA, van Garderen E, Rutterman GR, Rijnberk A. (1996). New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary gland of dogs, cats and humans. *J Steroid Biochem Molec. Biol.* 57:67-71.
- Moroni P, Pisoni G, Savoini G, van Lier E, Acuña S, Damián JP. and Meikle A. (2007). Influence of estrus of dairy goats on somatic cell count, milk traits, and sex steroid receptors in the mammary gland. *J Dairy Sci* 90. pp. 790-797.

- Morris J, Dobson J. (2001). Mammary gland. En: Morris J, Dobson. J Small Animal Oncology. Ed. Blackwell Science Ltd 1<sup>era</sup> ed. Cap.12, pp 184-191.
- Morris JS, Dobson J, Bostock DE. (1993). Use of Tamoxifen in the control of canine mammary neoplasia. *Vet Record* 133:539-542. Doi: 10.1136/vr.133.22.539.
- Moulton J. (1990) Tumours of the mammary gland. En: Tumours in Domestic animals. Ed University of California Press. Berkeley Los Angeles California 2<sup>nd</sup> ed. pp 346-350.
- Munson L, Moresco A. (2007). Comparative pathology of mammary gland cancers in domestic and wild animals. *Breast Disease* 28:7-21.
- Nelson LW, Kelly WA. (1974). Changes in canine mammary gland histology during the estrous cycle. *Toxicology and applied pharmacology* 27:113-122.
- Nelson RW, Couto CG. (1998). En: Nelson RW, Couto CG. Medicina interna de pequeños animales. Ed Intermédica. Buenos Aires, Argentina 2<sup>a</sup> ed. Cap 58, pp 933-935.
- Nieto A, Peña L, Pérez-Alenza MD, Sánchez MA, Flores JM, Castaño M. (2000) Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet Pathol* 37:239-247. Doi: 10.1354/vp.37-3-239.
- Nilsson S, Gustafsson JA. (2002). Biological role of estrogen and estrogen receptors *Critical Reviews in Biochem Mol Biol* 37:1-28.
- Ortega García MV, Galán Torres JA, Millan Ruiz T, Sánchez Céspedes, R, Martín de las Mulas J, González-Albo J (2013). Clasificación en subtipos moleculares de tumores de mama de pequeños animales mediante métodos inmunohistoquímicos. *Sanid.mil*; 69: 6-12:ISSN: 1887-8571.
- Peña L, De Andrés PJ, Clemente M, Cuesta P, Pérez-Alenza MD. (2012) 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. *Vet Pathol* 50:94-105. Doi: 10.1177/030098.
- Pérez Alenza MD, Peña L, Del Castillo N, Nieto AI. (2000) Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *J Small Animal Practice* 41:287-291.
- Pérez Alenza & Martí Angulo. (2011). Tumores mamarios caninos: manejo clínico *Reduca (Recursos Educativos). Serie Congresos Alumnos.* 3 (3): 142.
- Perrot-Applanat M, Guiochon-Mantel A & Milgrom E. (1992). Growth regulation by nuclear hormone receptors. immunolocalization of steroid hormone receptors in normal and tumour cells: mechanisms of their cellular traffic. Ed: Parker, M. G. *Cancer Surveys* CSHL Press, New York, NY. vol 14, 5–30pp.

- Pessina P, Elgue V, Piaggio J, y Amaral C. (2012). Factores asociados a la presentación del tipo de cáncer en caninos atendidos en el Hospital de la Facultad de Veterinaria. *Veterinaria (Montevideo)* 48 (187) 25-30.
- Pintos J, Pérez-Galán A. (2000). Cáncer de mama: costo-efectividad de la determinación de receptores hormonales y tratamiento adyuvante con tamoxifeno en estadios I y II. *Rev Med Uruguay*; 16:114-122.
- Port Louis LR, Varshney KC, Nair MG. (2012). An immunohistochemical study on the expression of sex steroid receptors in canine mammary tumors. *Vet Sci*, ID 378607. Doi:10.5402/2012/378607.
- Powers GL, Ellinson-Zelski SJ, Casa AJ, Lee AV, Alarid ET. (2010). Proteasome inhibition represses ER $\alpha$  gene expression in ER + cells: a new link between proteasome activity and estrogen signaling in breast cancer. *Oncogene* 29:1509-1518. Doi: 10.1038/onc2009.434.
- Preisler-Mashek MT, Solodin N, Stark BL, Tyrivier MK, Alarid ET.(2002). Ligand-specific regulation of proteasome-mediated proteolysis of estrogen receptor  $\alpha$ . *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:891-898.
- Purdie CA, Quinlan P, Jordan LB, Ashfield A, Ogston S, Dewar JA, Thompson AM. (2014). Progesterone receptor expression is an independent prognostic variable in early breast cancer: a population-based study. *Br J Cancer* 110:565-572, Doi:10.1038/bjc.756.
- Queiroga FL, Raposo T, Carvalho MI, Prada J, Pires, I. (2011) Canine mammary tumours as a model to study. *iv.iiarjournals.org* 25:455-465. <http://www.iiar-anticancer.org/>.
- Rehm S, Stanislaus, DJ, Williams AM. (2007). Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. *Birth Defects Research (Part B)* 80:233-245.
- Revelli A, Massobrio M, Tesarik J. (1998). Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocr Rev*.9(1):3-7. doi.org/10.1210/edrv.19.1.0322.
- Rexroad CE Jr. (1981b). Estrogen and progesterone binding in the myometrium of the ewe. II. Regulation by estradiol and progesterone. *J Anim Sci* 53:1070-1076.
- Rodríguez-Piñón M, Tasende, C, Puime P, Garófalo EG. (2008). Oestrogen and progesterone receptor binding capacity and oestrogen receptor alpha expression (ERalpha mRNA) along the cervix of cycling ewes. *Reprod Fertil Develop* 20:350-356.
- Rutteman GR, Misdorp W, Blankenstein MA, van den Brom WE. (1988). Oestrogen (ER) and progestin receptors (PR) in mammary tissue of the female dog: different receptor profile in non-malignant and malignant states. *Br J Cancer* 58:594-599.

- Rutterman GR, Misdorp W. (1993). Hormonal background of canine and feline mammary tumours. *J Reprod. Fert Suppl.* 47:483-487.
- Salas Y, Romero L. (2011). Cáncer de mama en perras (*Canis lupus familiaris*): Causas, factores de riesgo y marcadores moleculares en su clasificación y pronóstico. Similitud con el cáncer de mama humano. Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" UCLA Decanato de Ciencias Veterinarias Barquisimeto, Venezuela. *Gaceta de Ciencias Veterinarias* 16:56-64.
- Santos M, Marcos R, Faustino AMR. (2010). Histological study of canine gland during the oestrous cycle. *Reprod Dom Anim* 45:46-54. Doi:10.1111/j. 1439-0531.2009.01536.x.
- Schafer KA, Kelli G, Schrader R, Griffith WC, Muggenburg BA, Tierney LA, Lechner JF, Janovitz EB, Hahn FF. (1998). A canine model of familial mammary gland neoplasia. *Vet Pathol* 35:168-177.
- Schams D, Kohlenberg S, Amselgruber W, Berisha B, Pfaffl MW. (2003). Expression and localization of oestrogen and progesterone receptors in the bovine mammary gland during development, function and involution. *J Endocrinol* 177:305-317.
- Schneider R. (1970). Comparison of age, sex and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer.* 26:419-426.
- Schimtt FC. (1995) Multistep progression from on Oestrogen-dependent growth towards an autonomous growth in breast carcinogenesis. *Europ J Cancer* 31 A: 2049-2052.
- Schneider R, Dorn CR, Taylor DON. (1969) Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J Natl Cancer Inst.;* 43:1249-1261.
- Shyamala G, Chou Y.-C., Louie SG, Guzman RC, Smith GH, Nandi S. (2002). Cellular expression of estrogen and progesterone receptors in mammary glands: regulation by hormones, development and aging. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80:137-148.
- Soderqvist G, von Schoultz B, Tani E. and Skoog L. (1993). Estrogen and progesterone receptor content in breast epithelial cells from healthy women during the menstrual cycle. *American Journal Obstetric Gynecology* 168. pp. 874-879.
- Solano-Gallego L. (2010). Citología canina y felina. En: Raskin R, Meyer D. Atlas en color y guía de interpretación. Ed Multimedia Ediciones veterinarias 2<sup>da</sup> ed. Cap 12, pp 291-329.

- Sonnenschein EG, Glickman LT, Goldschmidt MH, and. McKee LJ. (1991) Body Conformation, Diet, and risk of breast cancer in pet dogs: A case-control study. *Am J Epidemiol* Vol 133, No 7 694-703.
- Sorenmo K, Shofer FS, Goldschmidt MH. (2000). Effect of spaying and timing of spaying on survival of dog with mammary carcinoma. *J Vet Intern Med*: 14:266-270.
- Sorenmo KU, Kristiansen VM, Cofone MA, Shofer FS, Breen A-M, Langeland M, Mongil CM, Grondahl AM, Teige J, Goldschmidt MH. (2009). Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Vet and Comp Oncol* 7:162-172. Doi:10.1111/j.1476-5829.2009.00184.x.
- Sorenmo KU, Rasotto R, Zapulli V, Goldschmidt MH. (2011). Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Vet Pathol* 48:85-97. Doi: 10.1177/0300985810389480.
- Sorenmo KU. (2003). Canine mammary gland tumors. *Vet Clin Small Anim Pract* 33:573-596. Doi: 10.1016/S0195-5616(03)00020-2.
- Sosa C, Lozano JM. Viñoles C, Acuña S, Abecia JA, Forcada F, Forsberg M. & Meikle A. (2004). Effect of plane of nutrition on endometrial sex steroid receptor expression in ewes. *Anim Reprod Sci* 84: 337–348.
- Stabenfeldt GH, Edqvist LE. (1999). Procesos de la reproducción de la hembra. En: Swenson MJ, Reece WO. *Fisiología de los animales domésticos de Dukes*. Ed. UTHEA Noriega 2<sup>da</sup> ed. Cap 36, pp 678-710.
- Stormshak F & Bishop CV. (2007) Estrogen and progesterone signaling: genomic and nongenomic actions in domestic ruminants. *J.Anim.sci* 86:299-315.Doi: 10.2527/jas.2007-0489.
- Stovring M, Moe L, Glattre E. (1997). A population-based case-control study of canine mammary tumours and clinical use of medroxyprogesterone acetate. *APMIS* 105:590-596.
- Tasende C, Rodríguez-Piñón M, Acuña S, Garófalo EG, Forsberg M. (2005). Corpus luteum life span and pituitary oestrogen and progesterone receptors in cyclic and GnRH-treated anoestrous ewes. *Reprod Fertil Develop* 17:721-726.
- Tavares WLF, Lavallo GE, Figueiredo MS, Souza AG, Bertagnolli AC, Viana F AB, Paes PRO, Carneiro RA, Cavalcanti GAO; Melo MM. (2010). Evaluation of adverse effects in tamoxifen exposed healthy female dogs. *Vet Scan Acta* 52:1-6.
- Theilen G, Madewell BR. (1979). Tumors of the Mammary Gland. En: Theilen G & Madewell BR. *Veterinary Cancer Medicine*. Ed Lea & Febiger Philadelphia. Cap 12, pp 192-203.

- Thuróczy J, Reisvaag GJK, Perge E, Tibold A, Szilágyi J, Balogh L. (2007). Immunohistochemical detection of progesterone and cellular proliferation in canine mammary tumours. *J. Comp. Path.* Vol 137:122-129. Doi:10.1016/j.jepa.2007.05.005.
- Toniti W, Suthiyotha N, Puchadapirom P, Jenwitheesuk E. (2011). Binding capacity of ER- $\alpha$ , ligands and SERMs: comparison of the human, dog and cat. *Asian Pacific J Can Prevent* 12:2875-2879.
- Torres Vidales G, Eslava Mocha PR. (2007). Tumores mamarios en caninos: adenocarcinoma complejo de glándula mamaria con metástasis a ganglio linfático regional. *Colombia. Orinoquia* 11:99-110.
- Vermeirsch H, Van Den Broeck W, Coryn M. Simoens P. (2002). Immunolocalization of sex steroid hormone receptors in the canine uterine tube and their relation to sex steroid hormone concentrations. *Reprod Fertil Develop* 14:241-250.
- Wanke M, Gobello C. (2006). Ciclo estral canino. En: Wanke, M, Gobello, C. *Reproducción en caninos y felinos domésticos*. Ed. Inter-Médica. Buenos Aires, Argentina, Cap 1, pp 1-10.