



Hermo G. ^{1*},
Gomez D.E. ¹,
Alonso D.F. ¹,
Gobello C. ²

¹ Laboratorio de Oncología Molecular, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes,
R. Saenz Peña 180, Bernal B1876BXD Buenos Aires, Argentina.
ghermo@unq.edu.ar
² Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

PEQUÑOS



Receptores hormonales en tumores de mama caninos

Resumen

Las glándulas mamarias de la perra son asiento frecuente de tumores de diversos grados de malignidad, representando el 42 % de todos los tumores caninos y el 82% de los tumores que afectan los órganos reproductivos. Los receptores nucleares forman parte de una gran familia de factores de transcripción que pueden ser regulados por asociación con otras proteínas, por fosforilación, o por unión a ciertos metabolitos celulares. Los receptores nucleares participan en diversos procesos biológicos, como diferenciación, crecimiento, homeostasis celular y crecimiento tumoral. La síntesis de compuestos agonistas u antagonistas de los receptores nucleares han llevado al desarrollo de drogas potencialmente útiles en el tratamiento y prevención del cáncer de mama en caninos.

La presencia o ausencia de receptores esteroideos permite identificar aquellos pacientes que podrían beneficiarse con la terapia adyuvante endocrina. La cuantificación de estos receptores también indica el pronóstico. Se espera que la determinación de receptores hormonales se vaya imponiendo en la clínica diaria en la medida que aparezcan nuevos estudios que demuestren la utilidad de drogas que puedan ser administradas en perras con tumores mamarios, sin tener efectos colaterales serios.

Introducción

La interacción de moléculas extracelulares (hormonas, drogas) con sus respectivos blancos nucleares han sido objeto de numerosos estudios en las últimas décadas. Es de importancia fundamental entender adecuadamente las bases moleculares de la acción de drogas y su interacción con receptores, ya que ello ayudará al diseño racional de fármacos, así como también permitirá estudiar posibles alteraciones en estados fisiológicos relacionados con los receptores nucleares.

Es ampliamente aceptado que la exquisita diversidad de tipos y funciones celulares observada en eucariotes superiores es el resultado del efecto combinatorio de la activación de distintas cascadas de transducción de señales sobre el programa ge-

nético celular. Uno de esos sistemas transductores es el de los receptores nucleares.

Los receptores nucleares forman parte de una gran familia de factores de transcripción que pueden ser regulados por asociación con otras proteínas, por fosforilación, o por unión a ciertos metabolitos celulares. Estos receptores funcionan como dímeros. En el caso que el dímero esté formado por dos proteínas iguales, las estructuras se llaman *homodímeros*. Si los dos monómeros que constituyen el complejo son distintos, se denominan entonces *heterodímeros* (Kazanietz, 2000). En la mayoría de los casos, la interacción con sus respectivos ligandos permite la unión del receptor al ADN, donde se comporta como activador o represor de la transcripción de genes. Los ejemplos más destacados de este tipo de receptores lo constituyen los receptores de glucocorticoides, andrógenos mineralocorticoides, hormonas tiroideas, ácido retinoico, retinoide X, vitamina D, receptores activados por agentes proliferadores de peroxisomas, y de estrógeno (RE) y progesterona (RP) que son los de mayor interés en relación a los tumores mamarios. También existen receptores cuyos ligandos aún no han sido identificados, y por ende se los denomina receptores huérfanos.

Funciones y mecanismos de acción

Los receptores nucleares participan en diversos procesos biológicos, como diferenciación, crecimiento y homeostasis celular. La unión del complejo receptor esteroideo-hormona con el ADN puede hacerse directamente o a través de otras proteínas a las que se une el complejo receptor-hormona. En ambos casos hay proteínas asociadas al receptor (coactivadores y correpresores) que modulan (activan o inhiben) su unión al ADN (Levin, 2003; Fig.1).

Cuando se trata de proliferación celular los RE y los RP están directamente involucrados, y la integridad funcional de los mismos es fundamental para la multiplicación, crecimiento y diferenciación normal de las células de los tejidos sensibles a la hormona. La transformación celular y consecuentemente la adquisición del fenotipo neoplásico —incluyendo inmortalidad, alteraciones nucleares y citoplasmáticas, crecimiento descon-

trolado— puede deberse a distintas causas difíciles de precisar, pero también pueden deberse a la desregulación hormonal.

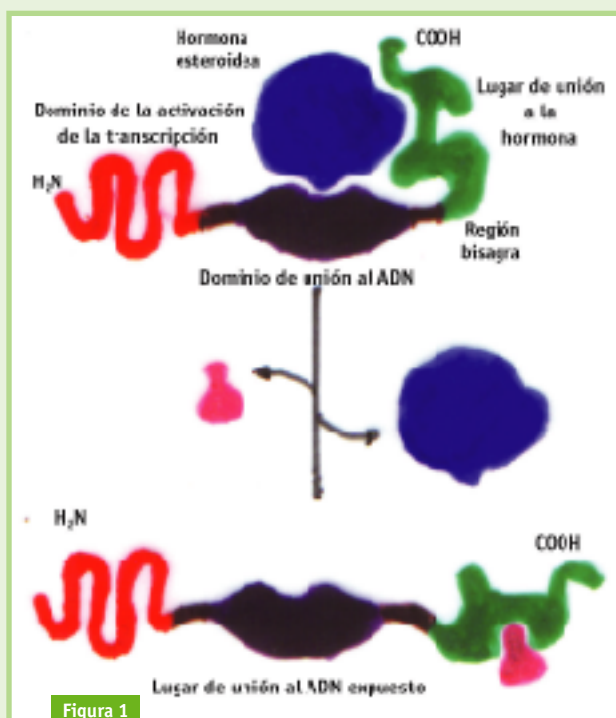


Figura 1

Modelo de proteína receptora de hormonas esteroideas. En su estado inactivo el receptor se halla unido a un complejo proteico inhibidor que contiene una proteína activada por estrés térmico (*heat shock protein*) denominada Hsp 70. La unión del ligando al receptor hace que la proteína inhibidora se disocie, de forma que el receptor se activa exponiendo su lugar de unión al ADN (modificado de Alberts, 1996).

Alteraciones en la estructura y función de los receptores esteroideos en los tejidos blanco se encuentran entre los factores desencadenantes. Los primeros conocimientos sobre este tema se produjeron en la década del 60 y se refieren al RE. Se pensaba que para cada receptor había una molécula natural única. Luego apareció el concepto de variantes o de isoformas de los receptores, con algunas modificaciones estructurales, pero que permitían la unión a la hormona. En 1983 se describió la existencia de los RP A y B (Horwitz, 1983) y este hallazgo abrió las puertas para explicar una serie de paradojas en el funcionalismo del RP, ya sea en efectos farmacológicos como en situaciones fisiológicas (Horwitz y McGuire, 1977; Horwitz 1992; Horwitz y col. 1996). En 1996 se descubrió el RE de tipo beta (RE β), una nueva especie biológica constitutiva de RE (Kuiper, 1996), lo cual representa un punto de inflexión en el conocimiento sobre este campo.

Localización subcelular

Por su carácter de factores transcripcionales, los receptores esteroideos se encuentran en el núcleo de las células, donde ejercen su función regulatoria sobre la expresión de proteínas. Su posible localización citoplasmática, con pasaje al núcleo ante la llegada de la hormona, ha sido objeto de discusión (Nigg y col. 1991, Levin y col., 1993).

Sin embargo, no era fácil explicar cómo las hormonas, estradiol o progesterona, llegaban al núcleo en ausencia de receptores citoplasmáticos. Se propuso que estas hormonas, por ser liposolubles, luego de penetrar en la célula, pasaban libremente al núcleo. Actualmente se acepta la existencia de receptores esteroideos en la membrana celular (Karthikeyan y Thampam, 1996), lo cual permite la selección de entrada de la hormona sólo en aquellas células que posean el receptor. También se acepta la presencia de RE y RP en el citoplasma, donde no se encuentran libres, sino unidas a proteínas llamadas de shock térmico o hsp (*heat shock proteins*). Quizás la presencia de estos receptores actúe como una atracción para la hormona cuando se halla en el medio extracelular. Al llegar la hormona, la hsp se separa de la molécula receptora, permitiendo la unión con su ligando hormonal (Pratt, 1993). Algunas de estas hsp (las de menor peso molecular, especialmente las *hsp 70*) se vuelven a fijar al receptor nuclear y lo acompañan en su unión al ADN, con lo que contribuyen a la acción del proceso transcripcional (Landel y col., 1995).

Por otro lado se encontró que los receptores esteroideos, incluyendo los RE y RP, contienen una secuencia de aminoácidos básicos, NLS (*nuclear localization signal*), necesaria para el pasaje de proteínas del citoplasma al núcleo (Nigg 1991). Este hallazgo es de gran importancia, porque permite explicar el «ida y vuelta» (*shuttling*) o pasaje rápido de los receptores al núcleo y, viceversa, al citoplasma (Guiochon-Mantel y col., 1991). Esta posibilidad de movimiento rápido o translocación de los receptores entre los compartimentos nuclear y citoplasmático se convierte así en un nuevo modelo de regulación genómica (Weis, 1998).

Tumor de mama en caninos

Debido a las características de sus ligandos, moléculas pequeñas y fácilmente modificables, los receptores nucleares se han convertido en blancos de agentes farmacológicos de interés terapéutico. La síntesis de compuestos agonistas o antagonistas de los receptores nucleares han llevado al desarrollo de drogas que actualmente son usadas como contraceptivos o potencialmente útiles en el tratamiento y prevención del cáncer de mama en caninos.

Las glándulas mamarias de la perra son asiento frecuente de tumores de diversos grados de malignidad representando el 42 % de todos los tumores caninos y el 82% de los tumores que afectan los órganos reproductivos (Brodey y col., 1983; Moulton, 1990). Algunos tumores crecen y se desarrollan de manera lenta. Este hecho ocasiona que a veces lleve cierto tiempo de desarrollo antes de ser advertido por el propietario. El diagnóstico precoz de los tumores mamarios eleva las posibilidades de supervivencia. En otros casos, son tumores de crecimiento muy rápido, alcanzando a veces grandes tamaños en muy poco tiempo.

En el momento de establecer el tratamiento de pacientes con cáncer de mama, uno de los mayores problemas es determinar si la enfermedad está localizada y será controlada con el tratamiento locoregional sobre el territorio donde asienta el tu-

mor primario, o si ya está generalizado y por lo tanto necesita tratamiento sistémico (Helman y Harris, 1987).

Para identificar pacientes con carcinomas de mama de mal pronóstico, se usan diferentes parámetros relacionados con el tumor primario son: (a) tamaño del tumor primario, (b) presencia de metástasis en ganglios linfáticos axilares, (e) pleomorfismo nuclear, (f) índice mitótico, (g) necrosis, (h) invasión vascular, (i) infiltración linfoplasmocitaria, y sería conveniente también que la determinación de receptores hormonales (Luque y col., 1993; Martín de las Mulas J, 2002; Martín de las Mulas J, 2004; Nieto, 2000).



Fundamento para la utilización de determinación de receptores hormonales en la clínica

La presencia o ausencia de ER permite identificar aquellos pacientes que podrían beneficiarse con la terapia adyuvante endocrina. La cuantificación de estos receptores también indica el pronóstico, tal lo demuestra el estudio de Sartin y col., donde el tiempo de supervivencia es mayor en pacientes con tumores de mama que contienen solamente ER o combinación con PR, intermedio en pacientes con tumores solo con PR y una corta supervivencia en pacientes con tumor sin ER ni PR (Sartin y col., 1992).

Aproximadamente el 80% de los tumores mamarios caninos expresan ER, PR o ambos (Donnay y col., 1995). La expresión de ER fue más alta en tumores de mama de perras enteras y en hembras jóvenes. La expresión de ER fue significativamente más alta en tumores mamarios malignos de perras cuya historia clínica previa incluía pseudogestaciones. Además, la expresión de ER decreció significativamente con respecto al tamaño del tumor y la presencia de úlceras en piel. Los tumores malignos tenían una expresión más baja de ER con respecto a los tumores benignos. Bajos niveles de ER en tumores malignos primarios se asociaron con ocurrencias de metástasis (Nieto y col., 2000).

¿Se puede predecir si un paciente va a responder a la terapia seleccionada?

En oncología clínica la posibilidad de predecir la respuesta a determinadas drogas antes de establecer una terapéutica, es de suma importancia. En medicina humana esto resulta muy importante, incluyendo habitualmente el tratamiento sistémico con hormonoterapia y quimioterapia. Para el primer caso las drogas más utilizadas son los antiestrógenos (como el tamoxifeno), y también se pueden administrar bloqueadores de la aromatización periférica de andrógenos, análogos de LHRH o análogos de somatostatina, entre otros. En medicina veterinaria no sucede lo mismo, ya que hay muy pocos estudios hechos sobre terapia hormonal. En medicina humana, el uso de antiestrógenos en tumores positivos a RE es rutinario; sin embargo, en la perra los antiestrógenos tienen un efecto estrogénico sobre el aparato genital que limita severamente su aplicación (Kitchell y Fidel, 1992; Morris y col., 1993; Hoffmann y Schuler, 2000).

En cuanto a trabajos publicados, no existe una aceptación unánime si la castración aporta beneficios en la perra con tumores mamarios. Hay trabajos que reportan que la ovariectomía realizada conjuntamente con la mastectomía redundante en una mayor supervivencia (Sorenmo y col., 2000), mientras que otros no notan beneficio alguno (Schneider y col., 1969; Yamagami y col., 1996).

Tampoco está claro el impacto que tendría la castración de una perra con tumores mamarios en cuanto a la regulación del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), ya que los estrógenos regulan negativamente la expresión de este receptor. Los tumores mamarios caninos que expresan EGFR o una variante oncogénica del c-erbB son uno de los de peor pronóstico (Matsuyama y col., 2001), por lo tanto sería importante tenerlo en cuenta cuando se decide realizar una ovariectomía u ovariectomía conjuntamente a la mastectomía.

En el caso del trabajo de Sorenmo y col. no hay una estratificación de los estadios clínicos y los tumores más anaplásicos entraron dentro del grupo control. Quizás esas diferencias entre los trabajos citados se deban a que no fueron evaluados los puntos comentados y/o tampoco fueron evaluados los receptores hormonales y/o otros marcadores hormonodependientes de valor predictivo.

Determinación de receptores hormonales

Determinación de hormonodependencia. El concepto moderno que establece que las hormonas regulan el crecimiento y la diferenciación celular ya fue enunciado hace un siglo por E. Starling (Starling, 1905), en el mismo momento que introdujo el término «hormona». La heterogeneidad de la población tumoral (células positivas y negativas para el ER coexisten en un mismo tumor), la presencia de ER con alteraciones moleculares que modifican su funcionalidad, se presentaron como posibles causas de errores. Dentro de éstas, también pueden mencionarse las relacionadas con el procesamiento del tejido tumoral y con el método utilizado para revelar la presencia del RE y/o RP (ver Tabla 1). Cuando se usa el método del carbón-dextran o de desplazamiento, se debe tener precaución en no incluir tejido graso o mama normal junto con el tumor, puesto que pueden obtenerse «falsos resultados positivos». Utilizando anticuerpos monoclonales anti-receptor se pueden evitar «falsos resultados negativos» debidos a la unión del receptor con estrógenos endógenos, ya que el anticuerpo reconoce tanto el receptor libre como el unido a hormona. Si se usan anticuerpos monoclonales contra el ER en cortes de tejido, se obtiene una buena sensibilidad sobre material fresco congelado; pero en muestras procesadas rutinariamente e incluidas en parafina, con el mejor de los tratamientos enzimáticos, la sensibilidad disminuye al 53% (Cohen y col., 2001). Esta disminución de la sensibilidad ocurre, preferentemente, en tumores cuya concentración de ER es menor de los 100 fmol/mg (medida por el método del Carbon-Dextran); teniendo en cuenta que concentración entre 3 o 10 fmol/mg del ER en el tumor se considera positivo, muchos de estos tumores serán «falsos negativos» si se utiliza inmunohistoquímica con anticuerpos anti-receptor en muestras

incluidas en parafina (Cohen y col., 2001). La Tabla 1 muestra las ventajas, desventajas y limitaciones de los diferentes métodos utilizados para el dosaje del ER. Estas características son

compartidas casi en su totalidad, cuando los mismos métodos son utilizados para dosar el PR.

TABLA 1. MÉTODOS PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE RECEPTORES DE ESTRÓGENO (ER)

Método de Estudio	V entajas	Desventajas o limitaciones
Carbón-Dextrán o de Desplazamiento. <ul style="list-style-type: none"> Utiliza estrógeno tritiado. Necesita tejido fresco para obtener el extracto citosólico. 	<ol style="list-style-type: none"> Método universalmente aprobado («gold standard»). Programas de control de calidad en EE.UU. y Europa. Método cuantitativo. 	<ol style="list-style-type: none"> Necesita aproximadamente 1 gr. de tejido fresco. Manejo de material radioactivo. Gran variabilidad intra e interensayo. Mide receptores libres.
Enzimoimmunoensayo (EIA) <ul style="list-style-type: none"> Utilizaba anticuerpo anti-ER. Necesita tejido fresco para obtener el homogenado. 	<ol style="list-style-type: none"> Mide receptores libres y ocupados. Buena sensibilidad y especificidad. Método cuantitativo. 	<ol style="list-style-type: none"> Necesita aproximadamente 1 gr. de tejido fresco.
En tejido fresco <ul style="list-style-type: none"> Utiliza anticuerpo- anti ER. Necesita cortes 5 um de tejido fresco congelado. 	<ol style="list-style-type: none"> Tumores pequeños y material de punción. Mide receptores libres y ocupados. Visualización de la distribución de receptores (heterogeneidad). Buena sensibilidad y especificidad. 	<ol style="list-style-type: none"> Necesita tejido fresco. Semicuantitativo (se expresa en porcentaje de células e intensidad de tinción).
En tejido incluido en parafina <ul style="list-style-type: none"> Utiliza anticuerpo anti-ER. Necesita cortes 5 um Digestión enzimática para recuperar antigenicidad. 	<ol style="list-style-type: none"> Tumores pequeños. Mide receptores libres y ocupados. Visualización de la distribución de receptores (heterogeneidad). Fácil derivación de muestras. Estudios retrospectivos. Los preparados se archivan y pueden ser reevaluados 	<ol style="list-style-type: none"> Sensibilidad disminuida aun con el mejor tratamiento enzimático. En tumores con menos de 100 fmol/mg se observó hasta un 47% de «falsos resultados negativos». Semicuantitativo



Tratamientos hormonales

Progestágenos

Es corrientemente sabido los mecanismos por los cuales el estradiol y la progesterona regulan la proliferación y diferenciación de las células del epitelio uterino y esto mismo es aplicado «igualmente» a la mama.

Mientras que algunos estudios sugieren que tumores de mama RP + responden tan bien como tumores RP - (deduciendo que el RP no estaría involucrado en esta respuesta), otros sugieren problemas metodológicos producidos por falsos RP - en estos respondedores (McGuire y col., 1985), y que los RP por supuesto, para obtener una respuesta a las progestinas.

Antiestrógenos y antiprogestagenos

En medicina humana, el uso de antiestrógenos en carcinomas mamarios con receptores de estrógenos (RE) positivos es rutinario, sin embargo, en la perra los antiestrogénos tienen un efecto agonista sobre el aparato genital que limita severamente su uso (Hoffmann y Schuler, 2000). Este es el caso del tamoxifeno (antiestrógeno no esteroide), el cual presenta potentes y beneficiosos efectos antitumorales (inhibición de proteinquinas A y C, inhibición de calmodulina -canales de calcio-, modificaciones de la fluidez de la membrana plasmática de las células tumorales, estimulación de las fosfolipasas, inhibición

de P-glicoproteína, inhibición de angiogénesis, estimulación de la apoptosis, regulación de factores de crecimiento, y demás efectos que el lector puede incursionar en la bibliografía correspondiente), pero a su vez posee efectos netamente estrogénicos en la hembra canina, que cuestionan fuertemente su extrapolación.

Por otra parte, los competidores de los receptores de progesterona (RP) como el onapristone (ZK 98.299), el mifepristone (RU 486) y el ZK 112.993 demostraron ser potentes inhibidores de los tumores mamarios y sus metástasis en roedores (Schneider y col., 1992; Montecchia y col., 1999; Vanzulli y col., 2005) y en líneas celulares humanas (Schneider y col., 1990). También los antiprogestágenos se han utilizado en pacientes humanos con metástasis de tumores mamarios con resultados favorables. Un estudio con mifepristone demostró regresión parcial o estabilización de las metástasis en un 53 % de las mujeres afectadas (Maudelonde y col., 1987). Otros trabajos con estas drogas en humanos evidenciaron estabilización de la enfermedad (Maudelonde y col., 1987; Michna y col., 1989; Baker y col., 1990, Horwitz, 1992).

No existen, en la hembra canina, estudios similares usando antiprogestágenos. El aglepristone (RU 534) es un bloqueante de los RP disponible en el mercado veterinario mundial. En la perra, el aglepristone compite con los receptores uterinos para la progesterona (P4), con una tasa de fijación tres veces mayor que la hormona endógena sin tener actividad antiglucocorticoide (Philibert, 1994). En cuanto al rol de antipro-

gestágenos, hacen su aparición los de última generación por no tener efectos antigluco corticoide como presentaban los compuestos de primera generación como el RU486.

Considerando que la progesterona, por intermedio de sus receptores tiene efectos proliferativos y carcinogénicos sobre los tejidos mamarios de las perras (Frank y col., 1979), se están llevando a cabo estudios clínicos para describir su eventual efecto adyuvante en perras con neoplasias mamarias en distintos estadios clínicos (Hermo, 2005).



Agonistas GnRH

Agonistas sintéticos de GnRH tales como nafarelina, leuproli- de, deslorelina, buserelina y goserelina estimulan la producción y liberación, con diferente potencia, de gonadotropinas por la glándula pituitaria. Inversamente, agonistas de GnRH, cuando son utilizados a dosis sostenidas en el tiempo inhiben reversiblemente el eje gonadal, luego de un corto período de estimulación. Esta inhibición es producida por la downregulation de los receptores de GnRH en la glándula pituitaria anterior (McRae y col., 1985).

La continua administración o la formulación de agonistas GnRH de depósito mostraron una supresión reversible de la función reproductiva en caninos machos y hembras durante más de un año en algunos estudios (Dube y col., 1987; Corrada y col 2005; Gobello y col., 2003; Inaba y col., 1996; McRae y col., 1985; Trigg y col., 2001; Vickery y col., 1989).

La goserelina se uso satisfactoriamente cada 21 días por 12 meses en perras con tumores mamarios (Lombardi y col., 1999). Un significativo avance en este campo ha sido el desarrollo de formulaciones de liberación lenta, en donde estos agonistas GnRH pueden ser fácilmente implantados subcutáneamente cada varios meses o cada año, dependientemente del componen- te con que hallan sido formulados.

Conclusiones

La presencia o ausencia de receptores esteroideos en el tejido tumoral mamario no solo contribuye al pronóstico sino también permite identificar aquellos pacientes que podrían beneficiarse con la terapia adyuvante endocrina.

La determinación de receptores hormonales se irá imponiendo en la clínica diaria en la medida que aparezcan laboratorios especializados en la determinación de receptores hormonales que cuenten con anticuerpos específicos e infraestructura segura, ya que algunos de los reactivos que se utilizan son mielotóxicos o cancerígenos. También es muy importante contar con recursos humanos idóneos organizados de manera que procesen las muestras lo más rápido posible ya que los receptores hormonales son muy lábiles, en especial el de progesterona.

La síntesis de compuestos agonistas u antagonistas de los receptores nucleares ha llevado al desarrollo de drogas potencialmente útiles en el tratamiento y prevención del cáncer de mama en caninos. No obstante, son necesarios nuevos estudios que demuestren cuales drogas, podrían ser utilizadas en perras

con tumores mamarios con receptores hormonales, sin tener efectos colaterales serios.

Glosario

TRANSCRIPCIÓN: La formación o síntesis de proteínas es un proceso multise- riado que, en su etapa genómica, comienza con la transcripción, que con- siste en la generación de un ARN mensajero específico, con nucleótidos complementarios al ADN del cual provienen. Los genes son segmentos de- finidos de ADN que en un momento determinado, por acción de una enzi- ma, la ARN polimerasa II, desdoblán sus dos hebras o filamentos, uno de los cuales copiará los nucleótidos que se van desenrollando. Se forma así el ARN mensajero nuclear que llevará el mensaje genético al citoplasma. Cada 3 nucleótidos del ARN mensajero (codon) se codifica un aminoácido que se va ensamblando con el siguiente ribosoma citoplasmático. Es lo que se denomina traducción, es decir, la clave o código de nucleótidos que seña- la el tipo y secuencia de aminoácidos que se van eslabonando para consti- tuir polipeptidos.

FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN: Lo que desencadena el proceso de transcripción es la llegada y unión al ADN de ciertas proteínas nucleares que reciben el nom- bre de factores transcripcionales. Una proteína puede unirse al ADN cuando en su estructura contiene una serie de aminoácidos con una configura- ción determinada. Es esta configuración la que permiten que se ligan con el ADN en alguno de los pliegues o surcos que presenta.

DIMEROS: Muchas proteínas, incluso los receptores nucleares, están forma- das por dos o más polipeptidos (subunidades). La cantidad y posiciones relativas de las subunidades determinan la estructura cuaternaria de la pro- teína. Si esas unidades son 2 se las denomina dímeros, si esas 2 unidades son iguales se las denomina homodímeros (Ej. RP-A/RP-A) y si en cambio esas 2 unidades son diferentes se las denomina heterodímeros (Ej. RP- A/RP-B).

FOSFORILACIÓN: Reacción mediante la cual un grupo fosfato queda unido co- valentemente a una molécula y produce un cambio conformacional en la proteína.

Bibliografía

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. (1996) *Biología molecular de la célula*. 3ª Ed. Omega. Barcelona. España. Pp 780.
- BERLINER, J.A.; GERSCHENSON L.E. (1976) *Sex steroid induced morphological changes in primary uterine cells cultures*. J Steroid Biochem 7:153-158.
- BRESCIANI, F. (1971) *Ovarian steroid control of cell proliferation in the mammary gland and cancer*. En: Basic Actions of Sex Steroids on Target Organs. Karger Publishing Company, Baael, Pp 130.
- BRODEY, R. S.; GOLDSCHMIDT, M.A.; ROSZEL, J.R. (1983) *Canine mammary gland neoplasms*. J.Am.Anim. Hosp. Assoc. 19:61-90.
- CORRADA Y; HERMO G; JOHNSON CA; TRIGG TE; GOBELLO C. *Short-term proges- tin treatments prevent estrous induction by a GnRH agonist implant in anes- trous bitches*. Theriogenology. 2006 Jan 20;65(2):366-73. Epub 2005 Jun 21.
- COHEN, C.; UNGER, E.; SGOUTAS, D; BRADLEY, N.; CHENGGIS, M. (1991) *Auto- mated immunohistochemical estrogen receptor in fixed embedded breast car- cinomas*. Am J. Pathol 95:335-339.
- DANGUY, A; LEGROS, N; DEVELEESCHOUWER, N; HEUSON-STENNON, JA; HEUSON, JC. (1980) *Effects of medroxyprogesterone acetate (MPA) on growth of DM- BA-induced rat mammary tumors: histopathological and endocrine studies*. En: Iacobelli S, Di Marco A (eds) Role of Medroxyprogesterone in Endocri- ne-Related Tumors. Raven Press, New York. Pp 21.
- DONNAY, I.; RAUIS, J.; DEVELEESCHOUWER, N.; WOUTERS-BALLMAN, P.; LECLERCQ, G.; VERSTEGEN, J. (1995) *Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs*. Am J Vet Res. 56(9):1188-1194.
- DUBE, D.; ASSAF, A.; PELLETIER, G.; LABRIE, F. (1987) *Morphological study of the effects of an GnRH agonist on the canine testis after 4 months treat- ment and recovery*. Acta Endocrinol 116: 413-417.

10. FIENI F.; BRUYAS J.F.; BATTUT I.; TAINTURIER D. *Uso clínico de las anti-progestinas en la perra*. En: Recent Advances in Small Animal Reproduction, Concannon P.W., England G., Verstegen III J. and Linde-Forsberg C. (Eds.) International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), 2001; A1219.0201.ES.
11. FRANK, D.W.; KIRTON, K.T.; MURCHISM, T.E.; QUINTAN, W.J.; COLEMAN, T.J.; GILBERTSON, T.J.; FEENSTRA, E.S.; KIMBALL, F.A. (1979) *Mammary tumors and serum hormones in the bitch treated with medroxyprogesterone acetate and progesterone for four years*. Fertil Steril 31:340-346.
12. GUIOCHON-MANTEL, A.; LESCOP, P.; CHRISTINMAITRE, S.; LOOSFELT, H.; PERROTAPLANAT, M.; MILGROM, E. (1991) *Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor*. EMBO J 10:3851-3859.
13. GOBELLO, C.; CORRADA, Y.; TRIGG, T. (2003) *Reversible prolongation of anestrus in the bitch with deslorelin acetate*. Revista Brasileira de Reprodução Animal. 27: 518-519.
14. KAZANIETZ, M. (2000) *Farmacología Molecular: Receptores, transducción de señales y activación de genes*. pp 9-23.
15. HASLAM, S.Z. (1988) *Progesterone effects on deoxyribonucleic acid synthesis in normal mouse mammary glands*. Endocrinology 122:464-470.
16. HELLMAN, S.; HARRIS, J.R. (1987) *The appropriate breast cancer paradigm*. Cancer Res. 47:339-342.
17. HERMO G. (2005) *Estudio de terapias adyuvantes con antiprogéstágenos y agentes antimetastásicos en neoplasias mamarias caninas*. Plan de Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias – UNLP Expt. 600/001037/05.
18. HOFFMANN, B.; SCHULER, G. (2000) *Receptors blockers-general aspects with respect to their use in domestic animal reproduction*. Anim. Reprod. Sci. 60-61:295-312.
19. HORWITZ, KB. (1991) *The molecular biology of RU486. Is there a role for antiprogestins in the treatment of breast cancer?* 146-163.
20. HORWITZ, KB; ALEXANDER, P.S. (1983) *In situ photolinked nuclear progesterone receptors of human breast cancer cells: subunit molecular weights after transformation and translocation*. Endocrinol. 113: 2195-2201.
21. HORWITZ, K.B.; MCGUIRE, W.L. (1977) *Progesterone and progesterone receptors in experimental breast cancer*. Cancer Res 37:1733-1738.
22. HORWITZ, K.B.; TUNG L.; TAKIMOTO, G.S. (1996) *Progesterone receptors and breast cancer*. En: Vedeckis WV (Ed), Hormones and cancer. Birkhauser. Boston. p.283.
23. IMAGAWA, W.; TOMOOKA, Y.; HAMAMOTO, S.; NANDI, S. (1985) *Stimulation of mammary epithelial cell growth in vitro: interaction of epidermal growth factor and mammogenic hormones*. Endocrinology 116:1514-1524.
24. INABA, T.; UMERHARA, T.; MORI, J.; TORRI, R.; TANI, H.; GONDA, M.; NAKAGAWA, A.; OHNURA, M.; TAMADA, H.; SAWADA, T. (1996) *Reversible Suppression of Pituitary testicular function by a sustained release formulation of GnRH agonist (leuprolide acetate) in dogs*. Theriogenology. 46: 671-677.
25. KARTHIKEYAN, N.; THAMPAN, R.V. (1996) *Plasma membrane is the primary site of localization of the non activated estrogen receptor in the goat uterus: hormone binding causes receptor internalization*. Arch Biochem Biophys 325: 47-57.
26. KITCHELL, B.E.; FIDEL, J.L. (1992) *Tamoxifen as a potential therapy for canine mammary carcinoma*. Proc Vet Can Soc 91.
27. KUIPERS, G.G.J.M.; ENMARK, E.; PELTO-HUIKKO, M.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J.A. (1996) *Cloning of a novel estrogen receptor expressed in a rat prostate and ovary*. Proc Natl Acad Sci USA 93: 5925-5930.
28. LANDEL, C.C.; KUSHNER, P.J.; GREENE G.L. (1995) *Estrogen receptor associated proteins: effects on receptor DNA interactions*. Environmental Health Perspex. 103:23-28.
29. LEVIN, E.; ACTIS, A.M.; LOPEZ, S. (1993) *Characterization of rat uterine progesterone receptor in vivo*. J Steroid Biochem Mo Biol 44:277-285.
30. LEVIN, E.; LEVIN, R. (2003) *Modulación de receptores esteroideos. Clave en el tratamiento de cáncer de mama*. Fundación Oncológica Encuentro.
31. LOMBARDI, P.; FLORIO, S.; PAGNINI, U.; CRISPIDO, A.; AVALLONE, L. (1999) *Ovarian function suppression with a GnRH analogue goserelin in hormone dependent canine mammary gland cancer* J Vet Pharmacol Therap 22: 56-61.
32. LUQUE, E.H.; MUÑOZ DE TORO DE LUQUE, M.; ROMERO ACUÑA, L.; LANGHI, M.; ROMERO ACUÑA, J. (1993) *Marcadores moleculares para predecir el pronóstico del cáncer de mama*. Medicina. 53:1551-1560.
33. MARTIN DE LAS MULAS J; ORDAS J; MILLAN MY; CHACON F; DE LARA M; ESPINOSA DE LOS MONTEROS A; REYMUNDO C; JOVER A. *Immunohistochemical expression of estrogen receptor beta in normal and tumoral canine mammary glands*. Vet Pathol. 2004 May;41(3):269-72.
34. MARTIN DE LAS MULAS J; VAN NIEL M; MILLAN Y; ORDAS J; BLANKENSTEIN MA; VAN MIL F; MISDORP W. *Progesterone receptors in normal, dysplastic and tumorous feline mammary glands. Comparison with oestrogen receptors status*. Res Vet Sci. 2002 Apr;72(2):153-61.
35. MATSUYAMA S.; NAKAMURA M.; YONEZAWA K.; SHIMADA T.; OASHI F.; TAKAMORI Y.; KUBO K. 2001. *Expresión Patterns of the erbB Subfamily mRNA in Canine Benign and Malign Mammary Tumors*. J. Vet. Med. Sci. 63(9):949-954.
36. MC GUIRE, W.L.; JOHNSON, P.A.; MUSS, H.B.; OSBORNE, C.K. (1989) *Megestrol acetate in breast cancer-a panel of discussion*. Breast Cancer Res Treat. 14:33-38.
37. MC RAE, G.I.; ROBERTS, B.B.; WORDEN, A.C.; BAJKA, A.; VICKERY, B.H. (1985) *Long term reversible suppression of estrus in bitches with nafarelin acetate, a potent LHRH agonist*. J Reprod Fertil. 74:389-387
38. MICHNA, H.; NISHINO, Y.; SCHNEIDER, M.R.; LOUTON, T.; EL ETREBY, M.F. (1991) *A bioassay for the evaluation of antiproliferative potencies of progesterone antagonists*. J Steroid Biochem Mol Biol 38:359-365.
39. MORRIS, J.S.; DOBSON, J.M.; BOSTOCK, D.E. (1993) *Use of tamoxifen in the control of canine mammary neoplasia*. Gynecol Oncol 39: 82-84.
40. MOULTON, J.E. (1990) *Tumors of the mammary gland*. En: Tumours in Domestic Animals, 3rd eds. Ed. Moulton JE. University of California Press, Berkeley. Pp 518-552.
41. NIETO, A.; PENA, L.; PEREZ-ALENZA, M.D.; SANCHEZ, M.A.; FLORES, J.M.; CASTANO, M. (2000) *Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance*. Vet Pathol. 37(3):239-247.
42. NIGG, E.A.; BEAURLE, P.A.; LUHRMAN R. (1991) *Nuclear import-export: In search of signal mechanisms*. Cell 66 15-22.
43. PRATT, W.B. (1993) *The role of heat shock proteins in regulating the function, folding and trafficking of the glucocorticoid receptor*. J Biol Chem 268, 21455-21458.
44. ROMAGNOLI S., CONCANNON P. W. *Uso clínico de progestinas en perras y gatas: una revisión*. In: Recent Advances in Small Animal Reproduction, Concannon P.W., England G., Verstegen III J. and Linde-Forsberg C. (Eds.). International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), Last updated: 9-Sep-2003; A1206.0903.ES
45. SARTIN, E.A.; BARNES, S.; KWAPIEN, R.P.; WOLFE, L.G. (1992) *Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs*. Am J Vet Res. 53(11):2196-2200.
46. SCHNEIDER, R.; DORN, C.R.; TAYLOR, D.O.N. (1969) *Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival*. J. Natl Cancer Inst 43:1249-1261.
47. SORENMO, K.; SHOFER, F. S.; GOLDSCHMIDT, M. H. (2000) *Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma*. J.Vet. Int Med. 14: 266-270.
48. STARLING, E.H. (1905) *The croonian lectures: The chemical correlation of the functions of the body*. Lecture 1. Lancet 2: 339.
49. TRIGG, T.E.; WRIGHT, P.J.; ARMOUR, A.F.; WILLIAMSON, P.E.; JUNAIDI, A.; MARTIN, G.B.; DOYLE, A.G.; WALSH, J. (2001) *Use of a GnRH analogue implant to produce reversible, long term suppression of reproductive function of male and female domestic dogs*. J. Reprod. Fertil 57: 255-261.
50. VICKERY, B.H.; MC RAE, G.I.; GOODPASTURE, J.C.; SANDERS, L.M. (1989) *Use of potent LHRH analogues for chronic contraception and pregnancy termination*. J. Reprod. Fertil, 39: 175-187.
51. WEIS, K. (1998) *Importins and exportins: how to get in and out of the nucleus*. Trends Biochem Sci. 23, 185-189.
52. YAMAGAMI, T.; KOBAYASHI, T.; TAKAHASHI, K.; SUGIYAMA, M. (1996) *Influence of ovariectomy at the time of mastectomy on the prognosis for canine malignant mammary tumors*. J. Small Anim Pract 37: 462-464.

