

TUMORES DE MAMA EN LA PERRA

Hermo G.¹, Ripoll G.¹, Lorenzano Menna P.¹, Farina H.¹, Gabri M.¹, Turik E.², Lamb C.³, Novaro V.³, Scursioni A.⁴, Gómez D.¹, Alonso D.¹, Gobello C.⁵,

¹. Laboratorio de Oncología Molecular, Departamento de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Quilmes. ²Laboratorio Biogénesis-Bago. ³. Laboratorio de Carcinogenesis Hormonal, IBYME. ⁴. Hospital Harragan . ⁵. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Resumen

Los tumores mamarios caninos (TMC) representan casi la mitad de las neoplasias en la perra. La etiopatogenia de los TMC es multifactorial. En perras el efecto protector de la ovariectomía temprana y la presencia de receptores para hormonas esteroideas en los tejidos tumorales indican que el factor hormonal está involucrado en el desarrollo de los tumores mamarios. La presentación clínica de los TMC es muy variable, pudiendo ser únicos o múltiples. En los casos múltiples pueden ser del mismo o diferente tipo histológico. En esta revisión se presenta la clasificación histopatológica de los tumores, junto a una breve descripción de las características particulares de cada una. Si bien la cirugía es el método de elección para las neoplasias mamarias caninas, actualmente se cuenta con diferentes modalidades de terapias adyuvantes que podrían mejorar el pronóstico de la enfermedad. El objetivo del presente trabajo fue realizar una revisión y actualización de los tumores de mama en la perra, poniendo especial énfasis en la etiopatogenia, tratamiento y nuevas perspectivas creadas a partir de los avances adquiridos en oncología molecular.

Palabras claves: Tumores mamarios. Caninos. Etiopatogenia. Terapia. Oncología molecular

Summary

MAMMARY TUMORS IN THE BITCH

Canine mammary tumors (CMT) represent nearly half of bitch's neoplasias. The etiopathogeny of CMT is multifactorial. Both the protective effect of early ovariectomy and steroid hormone receptors present in the tumor tissues show that the hormonal factor is involved in the development of mammary tumors. Clinical presentation of CMT may be unique or multiple, being the latter of the same or different histological type. The histopathological classification of tumors together with a brief description of their particular features is presented in this review. Although surgery is the best treatment for CMT, there are different adjuvant therapies that could improve the prognosis of the disease. In the present study, the goal was to make an updated review of CMT, with special emphasis on the etiopathogeny, treatment and new options resulting from advances in molecular oncology.

Key words: Canine. Mammary Tumors. Etiopathology. Treatment. Molecular Oncology.

Introducción

La perra posee 4-6 pares de mamas divididos en dos cadenas (derecha e izquierda) y se designan, según su localización, como torácicas (craneal y caudal), abdominales (craneal y caudal) e inguinales. Las glándulas mamarias son glándulas cutáneas modificadas, tubuloalveolares compuestas. Su desarrollo comienza en el embrión pero su crecimiento total no se produce hasta la pubertad y concluye luego de la primera parición (Claver *et al.*, 1985)

Los tumores mamarios caninos (TMC) representan casi la mitad de los tumores en la perra. La edad promedio de aparición es de 10 años, son raros en los machos y animales jóvenes de ambos sexos. (Van Garderbiblio, 1997). La etiopatogenia de los TMC es multifactorial. El desarrollo de cáncer mamario canino en gran medida es hormonodependiente. El objetivo del presente trabajo fue realizar una revisión y actualización y de los tumores de mama en la perra, poniendo especial énfasis en la etiopatogenia, tratamiento y nuevas perspectivas creadas a partir de los avances adquiridos en oncología molecular.

Prevalencia

Los TMC son excepcionales en animales menores de 2 años. La incidencia aumenta en forma marcada a partir de los 6 años y continúa haciéndolo hasta los 10 años, pasada esta edad el riesgo disminuye. La ovariectomía temprana es una firme protección contra el desarrollo de tumores mamarios, el riesgo es de 0,5 % para las perras esterilizadas antes del primer estro, 8 % para las esterilizadas después del primer ciclo y 26 % para aquellas esterilizadas después de 2 o más ciclos.(Loar, 1989; Misdorp, 1988). La administración de progestágenos se asocia con incremento en la aparición de tumores mamarios benignos en la perra (Misdorp, 1988; Donnay, *et al.*,1994; Rutteman, 1990; Selman, 1994). Los tratamientos con estrógenos utilizados para la interrupción de la preñez también aumentan el riesgo de aparición de tumores mamarios (Donnay, *et al.*,1994; Rutteman, 1990). Se ha sugerido que los frecuentes episodios de pseudopreñez podrían incrementar la aparición de lesiones preneoplásicas. (Donnay, *et al.*,1994; Murrel, 1991; Rutteman, 1990; Selman, 1994). La obesidad y la dieta rica en grasas en los primeros años de vida también fueron asociadas con un peor pronóstico e incremento del riesgo de padecer tumores mamarios, respectivamente (Kitchell, 1995; Sonnenschein, 1991). Los tumores mamarios benignos aparecen en la vida mas tempranamente que los malignos (Misdorp, 1988) y en animales jóvenes a menudo pueden presentarse displasias o hiperplasias. (Perez Alenza, *et al.*, 2000).

Etiopatogenia

La etiopatogenia de los TMC es multifactorial, en perras el efecto protector de la ovariectomía temprana y la presencia de receptores para hormonas esteroideas en los tejidos tumorales indicarían que el factor hormonal podría estar involucrado en el desarrollo de tumores mamarios (Battistacci, 1974; Hellmén, 1993). Se han encontrado receptores para estrógenos y progesterona (ERs y PRs), en el 50% de los tumores de

glándula mamaria malignos y en el 70% de los tumores de glándula mamaria benignos, como así también en el tejido glandular mamario normal (Corrada y Gobello, 2001). Este hallazgo concuerda con la idea de que una desviación del mecanismo normal de expresión de dichos receptores produciría un progresivo desarrollo de tumores malignos. Los tumores que no presentan receptores son los más agresivos, así como también son más indiferenciados que aquellos que si expresan. Además la presencia de receptores es muy poco frecuente en las metástasis, lo que podría indicar un patrón de crecimiento autónomo. En humanos, los tumores ricos en Ers o Ers y PRs (Mc Guire, 1980; Nerurkar, 1987; Rooney y Henry, 1993) responden a la terapia de ablación endocrina, pero los tumores que carecen de tales receptores no lo hacen y se consideran de peor pronóstico. (Donnay *et al.*, 1996).

Otros factores de crecimiento que podrían participar en el desarrollo de tejidos mamaros normales y neoplásicos son el factor de crecimiento epidérmico (EGF), los factores de crecimiento transformante (TGFs) (Blood y Zetter, 1990; Donnay, *et al.*, 1994; Ettinger y Felman, 1997), factor tipo insulínico I (IGF-I) y la proteína relacionada a la hormona paratiroidea (PTHrP) (Gilbertson *et al.*, 1983; Okada *et al.*, 1997; Weir, *et al.*, 1998; Weir *et al.*, 1998). Dichos factores están asociados con la presencia de Ers y PRs en tumores de glándula mamaria. (Gobello y Corrada, 2001; Rutteman *et al.*, 1989).

Además, existen otros mecanismos muy importantes para el avance del proceso neoplásico que se manifiestan especialmente en los tumores Ers negativos (Ers-), en los que la progresión de la enfermedad es mas independiente de las hormonas esteroideas. Los productos de oncogenes, entre los que se encuentran los factores de crecimiento y sus receptores, cumplen un papel fundamental en los procesos de malignidad celular.

El IGF-I se sintetiza en el hígado y se encuentra en la circulación unido a proteínas transportadoras. En los tejidos se hallan los receptores para este factor (IGF-Ir) que, al unirse al ligando inician una serie de reacciones bioquímicas en cadena que finalmente se expresan sobre la proliferación celular sin intervención del circuito Ers o bien, simultáneamente, con el mismo.

El rol desempeñado por las hormonas hipofisarias mamotróficas en la tumorigenesis mamaria todavía es controversial. La prolactina (Gobello, *et al.*, 2001; Rutteman *et al.*, 1989; Rutteman, 1995) y hormona del crecimiento (GH) fisiológicamente estimulan el desarrollo y diferenciación de la glándula y también la lactogénesis. La secreción de GH inducida por la progesterona podría influenciar el desarrollo de tumores, que ocurriría por la proliferación de células epiteliales mamaras susceptibles (Ettinger y Felman, 1997; Hahn, 2001; Hampe y Misdorp, 1974; Rutteman *et al.*, 1989). Las mamas neoplásicas producen, a su vez, GH que autoperpetuaría su desarrollo (Corrada, *et al.*, 2002). El riesgo de desarrollar un tumor mamario es más elevado para las perras que presentaron muchas pseudogestaciones. Este aumento del riesgo ligado a muchas pseudopreñeces podría ser secundario a la asociación del efecto de la edad y a la acumulación de productos de secreción dentro de la mama. Estos productos no se eliminan como en la lactancia fisiológica. Habría una combinación de hipoxia ligada a la distensión de los acinos, liberación de radicales libres carcinogénicos y acumulo de productos carcinogénicos de origen alimenticio o derivados de la degradación de la misma leche. Estos productos estarían en un contacto prolongado con el epitelio mamario y podrían inducir lesiones preneoplásicas o influenciar la evolución de lesiones preexistentes. Dentro de todo esto la prolactina jugaría un rol indirecto por inducción a la pseudogestación (Corrada y Gobello, 2001).

En ciertos tumores de glándula mamaria también se encontraron receptores para glucocorticoides (Parodi, *et al.*, 1984) y dihidrotestosterona (D'Arville y Pierrepoint

1979). Existen diversas enzimas involucradas en la etiopatogenia tumoral, este es el caso de las metaloproteinasas de matriz (MMPs), las cuales juegan un rol fundamental en los mecanismos de degradación durante los procesos de invasión y metástasis. Estas enzimas forman parte de una familia de más de 10 endopeptidasas que son expresadas en niveles bajos en los tejidos adultos normales, pero cuya expresión se eleva rápidamente en procesos de remodelación tisular normales y patológicos tales como el desarrollo embrionario, la reparación tisular, la inflamación y durante la diseminación tumoral. Varios trabajos reportan la elevada expresión de dichas enzimas en tumores mamarios caninos y la directa correlación con el grado de malignidad (Hirayama *et al.* 2002; Papparella *et al.*, 2002; Yokota *et al.*, 2001). Todas estas enzimas son secretadas como proenzimas y requieren calcio y zinc para desempeñar su función. Los factores de crecimiento que promueven el crecimiento tumoral también inducen la producción de diversas MMPs. Dada la importancia de las MMPs, es lógico que se haya observado con atención los avances en el conocimiento sobre los inhibidores tisulares naturales de MMPs, los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs), el TIMPs-1 es el inhibidor mas conocido y ha sido aislado de una amplia variedad de tejidos y fluidos corporales. Dentro de un modelo estocástico, la disminución de los niveles de TIMP-1 no solo iniciaría la oncogenesis, sino también predispondría a la célula a cambios posteriores conducentes a la progresión tumoral (Gomez y Alonso, 1998; Gomez 1997).

La cathepsina D es una de las proteasas que regula la cohesión del medio extracelular. Resulta de importancia porque la génesis y desarrollo de las metástasis depende, entre otros factores, de la integridad o ruptura de las proteínas que la célula metastásica encuentra en su movilidad (Rochefford *et al.*, 1992). Conjuntamente con otras proteasas (colagenasa, metaloproteinasas, etc.) la cathepsina D a pasado a ser un marcador de recurrencia y metástasis en las neoplasias. Su aumento se correlaciona con mayor fluidez extracelular por proteólisis de cadherina, actina, vinculina y otras moléculas de adhesión celular. Esta enzima también actúa sobre las proteínas de la membrana basal de las células endoteliales, la cual favorece el desplazamiento de células neoplásicas que irán a anidar a otros tejidos. Su síntesis es estimulada por estrógenos, que aumenta el contenido circulante. No obstante esta presente en el tejido mamario neoplásico, tanto de tumores Ers (+) como Ers (-).

La vinculación entre el colesterol y la biología tumoral se estableció hace tiempo, cuando se observó que ciertas células neoplásicas sintetizaban grandes cantidades de colesterol. Más tarde, se comprobó que la principal enzima reguladora de la síntesis de colesterol, la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa), se encontraba significativamente aumentada en los tejidos tumorales (Gomez y Alonso 1998; Alonso y Gomez, 1998). Las células tumorales tendrían una demanda mucho mayor de colesterol y sus moléculas precursoras, que las células normales. La enzima HMG-CoA reductasa intervendría en la duplicación celular proporcionando cantidades suficientes de colesterol para la conservación de la integridad de las membranas celulares, y activando la DNA polimerasa, enzima de la cual depende la síntesis del ácido desoxirribonucleico (DNA). La observación de que en animales de experimentación el descenso del colesterol en sangre -inducido sea por la dieta o por tratamiento con fármacos- disminuye el crecimiento de la masa tumoral, corrobora que la inhibición de la biosíntesis del colesterol representa una estrategia atractiva para bloquear procesos relacionados con la transformación neoplásica (Gomez y Alonso 1998). La lovastatina es un antibiótico fúngico que inhibe en forma competitiva la actividad de la HMG-CoA reductasa, porque su estructura es semejante al sustrato, el HMG-CoA. Las propiedades de la lovastatina no se limitan a sus efectos sobre la

proliferación de las células tumorales, puesto que también se comporta como un potente inhibidor de los procesos de adhesión, migración e invasión, de los cuales depende la capacidad de establecer metástasis de un tumor.

¿Que acontece para que la célula se libere de los frenos normales sobre el crecimiento celular? En los últimos años comenzaron a surgir algunas respuestas. Se descubrieron genes de cáncer en los cromosomas de las células tumorales. Estos genes, llamados oncogenes, representan la fuerza impulsora en el crecimiento descontrolado de muchas células cancerosas. Presentes en la célula normal como proto-oncogenes, estos genes reguladores del crecimiento se activan de manera inapropiada y redundan en la conversión de la célula fundadora normal en otra cancerosa. Una vez activados, los genes actúan en forma continua dirigiendo las células hacia la división incontrolada, un comportamiento que se conoce como cáncer.

Resumiendo, se llama proto-oncogenes a los distintos genes que normalmente se encargan, a través de las correspondientes proteínas que codifican, de gobernar la replicación y la diferenciación celular. Esta denominación surge de la idea que el desarrollo de determinadas alteraciones en un protooncogen, por más pequeñas que estas pudieran ser, lo transforman en su contrapartida patológica, u oncogen. El oncogen c-erbB2 se encuentra en cánceres mamarios y ováricos. Su amplificación se asocia a un elevado índice mitótico y se correlaciona con una pobre respuesta clínica a la quimioterapia. El oncogen c-erbB2 codifica una forma alterada y truncada de un receptor de membrana de factores de crecimiento, con actividad intrínseca de tirosina kinasa que puede llevar acabo autofosforilaciones que encienden señales intracelulares de proliferación (Gomez y Alonso, 1998). El c-erbB2 fue mapeado en caninos mediante FISH (Fluorescence In Situ Hybridization), técnica genética utilizada en el mapeo de genes, ubicado en el cromosoma 1q13.1. Su expresión fue correlacionada con una mas rápida progresión y mal pronostico en cáncer de mama en perras (Murua Escobar *et al.*, 2001). Un estudio realizado por Matsuyama *et al.* (2001) ha demostrado que c-erbB juega un importante papel en la carcinogénesis de la glándula mamaria canina, este estudio revela que c-erbB no se expresa en glándulas mamarias normales mientras que si es expresado en tumores mamarios benignos y malignos, no habiendo correlación entre el tipo de receptor expresado (c-erbB1, c-erbB2, c-erbB3, c-erbB4) y tipo histopatológico de tumor (Matsuyama *et al.*, 2001). También reportan que el protooncogen c-kit es frecuentemente expresado en tumores mamarios de perras y en otros tipos de tumores caninos (Kubo *et al.*, 1998). Es sabido que el producto de c-kit, como de c-erbB pertenecen a la superfamilia de receptores tirosina quinasa (Chui *et al.*, 1996) se relacionan con la proliferación y diferenciación celular (Natali *et al.*, 1992). De esta manera, es muy interesante notar que una variedad de receptores tirosina quinasa son expresados en tumores mamarios caninos. Otro grupo de genes normales que codifican proteínas que modulan el ciclo celular a través de un efecto inhibitorio sobre la progresión del mismo, son los denominados genes supresores de tumor. Las evidencias sobre la existencia de los genes supresores de tumor – también llamados antioncogenes – provino de distintas líneas de trabajo. Este es el caso del gen p53, que codifica una fosfoproteína que regula la replicación del ADN, la proliferación celular y la muerte celular. Este gen actuaría como un “policía molecular” que impide la propagación de células dañadas genéticamente. También se encontraron mutaciones de dichos genes, p53 en un numero de cánceres mamarios caninos espontáneos los que podrían contribuir a incrementar alteraciones citogenéticas y formación de tumor (Veldhoen, *et al.*, 1999).

Los pacientes caninos con alteraciones de p53 son considerados como los de peor pronostico (Wakui *et al.*, 2001). Se detectaron mutaciones puntuales en el gen de la p53

en diversos tipos de tumores, entre ellos carcinoma de glándula tiroides, papilomas orales, adenoma de glándulas anales, osteosarcoma y linfoma mamario en caninos (Lee *et al.* 2002; Koenig *et al.* 2002). La proteína p53 se comporta como un freno para la división de las células, aunque de manera indirecta. Se secuenció un gen llamado WAF1, que se expresa por efecto de la p53. El producto proteico del WAF1 (la proteína p21) se une a las kinasas dependientes de ciclinas y detiene la progresión del ciclo celular.

Cuando el agente mutágeno actúa sobre la célula normal, aumenta la expresión del p53. Puede suceder que el ADN sea reparado por la célula o que detecte la falla en la célula, no se repare y entonces el producto de p53 (fosfoproteína) estimule a otro gen, WAF-1 y el producto de este (proteína p21) induzca la entrada en apoptosis (muerte celular programada) de la célula dañada y no reparada. En ambas situaciones no hay formación tumoral. Sin embargo en células con pérdida de la función p53 el ADN no puede ser reparado ni iniciar la apoptosis, apareciendo células mutantes o transformadas.

Otro gen involucrado en la etiopatogenia tumoral es el BRCA1, productor de una fosfoproteína que participa en la regulación del ciclo celular. El rol del gen BRCA1 no ha sido todavía bien estudiado en tejido mamario normal ni en tumores mamarios en caninos. La pérdida de la expresión de BRCA1 fue asociada con una alta proliferación del marcador ki-67 y ERs alfa. La reducción y distribución de BRCA1 en tumores mamarios caninos fue significativamente asociado con características malignas. Los resultados podrían indicar que BRCA1 tendría un comportamiento maligno en esos tumores (Nieto *et al.*, 2003; Tsuchida *et al.*, 2001)

La proteinquinasa C (PKC) pertenece a una familia de proteínas quinasas que fosforilan aminoácidos serina y treonina en una gran variedad de proteínas. La importancia de la PKC radica en que está involucrada en los mecanismos de transducción de señales de algunos receptores hormonales y factores de crecimiento.

La función inmune alterada puede jugar un rol importante en la patogénesis de las neoplasias mamarias en la perra. Se han identificado antígenos no tumorales específicos que causan una inefectiva respuesta inmune humoral y celular. Los complejos inmunes identificados en perras con tumores mamarios generalmente impiden ejercer la respuesta inmune antitumoral (Misdorp, 1988).

También otro factor involucrado en la progresión tumoral en los tumores mamarios caninos es la pérdida de una molécula denominada E-cadherina, perteneciente a la familia de moléculas de adhesión celular (CAM). Estas moléculas facilitan la adhesión entre sí de muchas células animales, con firmeza y especificidad (Lodish *et al.*, 2002). Hay 5 clases diferentes de CAM: cadherinas, la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig), selectinas, mucinas e integrinas. La adhesión intercelular en la que intervienen cadherinas y selectinas dependen de calcio. Las integrinas intervienen en las interacciones entre las células y la matriz, mientras que los demás tipos de CAM participan de la adhesión intercelular (Lodish *et al.*, 2002).

Las cadherinas de expresión más amplia son la E, P, y N. Se conocen más de 40 cadherinas diferentes. En algunas enfermedades, como ser algunos tumores de mama canino se modifica la cantidad o naturaleza de la E-Cadherina de su superficie celular (Restucci *et al.*, 1997; Brunetti *et al.*, 2003; Gama *et al.*, 2004; Sarli *et al.*, 2004), lo cual afecta muchos aspectos de la adhesión intercelular y la migración celular. Por ejemplo, las metástasis de células tumorales se correlacionan con la pérdida de cadherina de superficie celular.

Los tumores se malignizan debido a que las células tumorales invaden tejidos vecinos y sobreviven en un sitio ectópico. El término invasión indica la penetración en un territorio adyacente y su ocupación. Esta invasión permite a las células tumorales entrar

a la circulación sanguínea, a partir de donde pueden colonizar órganos distantes y eventualmente formar un tumor secundario, llamado metástasis.

El gen que codifica a la E-cadherina fue uno de los primeros en ser considerado como un gen supresor de invasión, ya que la pérdida de este gen predispone el fenotipo invasivo. Interesantemente, un experimento in vitro ha demostrado como la pérdida de E-cadherina induce un fenotipo invasivo en un cultivo celular de células no cancerosas inmortales. (Mareel y Leroy, 2003)

La correlación positiva entre agresividad tumoral como evidencia de una pobre supervivencia y disturbios de la expresión de E-cadherina provee un soporte clínico para E-cadherina como un supresor de invasión (Oka *et al*, 1993).

Hoy, el estudio de la invasión tumoral se beneficia enormemente a partir de los avances en genómica y proteómica, que caracterizan estructuralmente y funcionalmente a genes y proteínas.

Ciclo celular y cáncer

El ciclo de replicación celular normal se divide en 5 fases discretas. Comenzando con la finalización de la mitosis (M), las células pueden ingresar en una fase pre-sintética G1 de duración variable. Luego de esto, las células ingresan en una fase de síntesis de ADN (S). Una vez que las células dejan de sintetizar ADN ingresan en la fase G2 previa a la reiniciación de la mitosis. G1 y G2 son brechas entre 2 eventos de mitosis y síntesis identificables a nivel morfológico. El termino G0 fue introducido para las células que no ciclan pero que pueden ser reclutadas e ingresar en periodos G1.

El rol crítico de la familia de las ciclinas en la regulación del ciclo celular esta bien establecido. Las ciclinas son proteínas especializadas que activan las distintas fases del ciclo celular. La mayoría de las células son capaces de proliferar en base a estímulos externos tales como factores de crecimiento y hormonas que actúan a través de receptores de superficie celular. Estos receptores transducen la señal, con la división celular como resultado final. Las tirosinquinazas son una parte esencial de la cascada de señales proliferativas. Las ciclinas se combinan, activan y dirigen la acción de unas proteínas especializadas llamadas “tirosin kinasas dependientes de ciclinas”(CDK). (Bird *et al.*, 2002). Las ciclinas son categorizadas dentro de 3 grupos: Tipo A, Tipo B y Ciclinas G1 (ciclinas C, D, E).

En el ciclo celular hay varios puntos de control. Estos puntos de control son moléculas llamadas ciclinas y kinasas dependientes de ciclinas (CDK), los cuales forman complejos (tabla 1). Los CDK como su nombre lo indica, son kinasas que fosforilan diversos sustratos involucrados en la progresión del ciclo celular. Son las unidades catalíticas del complejo. Las ciclinas son las unidades regulatorias, y su nombre se debe a que varían a lo largo del ciclo celular. Los CDK solos no tienen acción, dependen si o si de las ciclinas.

Tabla 1: Ciclinas y CDK en el ciclo celular.

Fases del Ciclo Celular	CDK	Ciclinas
G1	CDK4 y CDK6 CDK2	D (D1, D2, D3) E (E1, E2)
S	CDK2 CDK2	E (E1, E2) A (A1, A2)
M	CDK1 (cdc2,cdc28) CDK1 (cdc2,cdc28)	A (A1, A2) B (B1, B2)

Un estudio demostró un porcentaje de expresión muy alto de ciclina A con respecto a ciclina D1 en tumores mamarios caninos (Murakami *et al.*, 2000). Este dato contrasta con el presumible rol de la ciclina D1 en la tumorigénesis mamaria humana, que suele estar mas aumentada que la ciclina A. Sin embargo otros estudios demuestran una correlación positiva entre expresión de ciclina D y cáncer mamario canino (Spacteria *et al.*, 2003), mas que al aumento de ciclina A.

Angiogenesis tumoral

En los tumores, la proliferación de vasos de neoformación es un proceso necesario para el crecimiento tumoral. Los nuevos grupos de células neoformadas necesitan el aporte vascular para continuar su crecimiento. La angiogénesis tumoral involucra múltiples pasos y vías dependientes del balance local entre factores regulatorios positivos y negativos. Existen interacciones entre el tumor, su vasculatura, y la matriz extracelular circundante. Mientras está ausente el fenotipo angiogénico, un tumor permanece en estado latente, con el ritmo de proliferación celular balanceado por el ritmo apoptótico, incapaz de crecer en tamaño mas allá de unos pocos milímetros. Al establecer un aporte sanguíneo, se reduce la tasa de muerte celular y el tumor crece con rapidez (Casciato *et al.*, 2001).

Varias sustancias son necesarias para promover la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), en tejidos normales. De todas formas, casi todos los tumores medibles se limitan a producir solo uno de estos factores, llamado factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), que induce la formación de vasos sanguíneos. El VEGF tiene algunas propiedades interesantes que pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer, incluyendo las siguientes:

1. Induce receptores para sí mismo en células endoteliales de vasos sanguíneos maduros, no proliferantes. Estas células endoteliales normales, que están en reposo, no tienen el receptor hasta que no son expuestas al VEGF.
2. Puede ser inducido por el oncogen c-ras, por otros oncogenes y factores de crecimiento, que a su vez inducen mayor producción de VEGF. Por lo tanto, drogas que modulen la acción de c-ras pueden inhibir la angiogenesis.
3. Induce la producción y activación de muchos otros factores de crecimiento que contribuyen a la formación de vasos sanguíneos. Entonces, al bloquear la actividad de VEGF también se bloquea la acción de otros factores de crecimiento involucrados en la progresión tumoral.
4. A diferencia de los vasos sanguíneos normales que requieren otros factores para su desarrollo normal, los vasos sanguíneos inducidos por VEGF “tienen goteras”, o sea, aumento de la permeabilidad vascular. Las proteínas plasmáticas inducidas por el VEGF, como el fibrinógeno, pueden salirse de los nuevos vasos, formando un gel esponjoso alrededor del tumor. Este gel contiene VEGF, que induce mayor angiogénesis.
5. El VEGF parece evitar la apoptosis en las células endoteliales inducidas. Por lo tanto al inhibir la acción de VEGF se esta inhibiendo una de las vías de escape tumoral.

Los tumores también elaboran inhibidores de la angiogénesis, que pueden disminuir el crecimiento del tumor en lugares distantes (Casciato *et al.*, 2001). En muchas circunstancias, la remoción quirúrgica del tumor primario es seguida por un rápido

desarrollo de metástasis. Se ha demostrado que ciertos tumores experimentales elaboran un inhibidor endógeno de la angiogénesis, denominado angiostatina. Este factor es liberado al torrente sanguíneo e inhibe a distancia la vascularización de focos metastásicos y por ende su crecimiento. La extirpación del tumor primario produce una caída brusca en los niveles circulantes de angiostatina, que facilita el crecimiento rápido de las metástasis (Gomez y Alonso, 1998).

Receptores para VEGF han sido identificados en tumores mamarios caninos benignos y malignos mediante inmunohistoquímica (Restucci *et al.*, 2002; Restucci *et al.*, 2004). Los macrófagos intratumorales también pueden sintetizar VEGF. Se ha demostrado que la angiogenesis y la malignidad tumoral incrementan juntas. VEGF aparece como un poderoso factor angiogénico en tumores mamarios caninos (Restucci *et al.*, 2002; Restucci *et al.*, 2004; Graham *et al.*, 1999).

PTEN fosfatasa supresora de tumores

En 1997, dos grupos publicaron el descubrimiento de un gen supresor de tumores en este locus, al que llamaron PTEN (“phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten”) o MMAC (“mutated in multiple advanced cancers”)

Para identificar este gen supresor tumoral, realizaron un análisis diferencial en 12 tumores mamarios primarios.

La mutación de PTEN fue publicada en el año 2006 en tumores mamarios caninos (Kanae y col., 2006).

PTEN contiene el motivo que define a la familia de fosfatasa en tirosina, que elimina grupos fosfato de proteínas. Originalmente se la describió como una fosfatasa dual, reconociendo residuos tirosina, como también serina/treonina. Curiosamente, PTEN, también muestra una especificidad inusual para sustratos altamente ácidos.

Una observación más detallada de los sustratos fisiológicos, apareció cuando se demostró la capacidad de PTEN para desfosforilar PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5 trisfosfato). Estas moléculas son segundos mensajeros cruciales en los caminos de señalización que controlan proliferación y supervivencia.

Mucha información se obtuvo con la disrupción de PTEN en ratones y en *Caenorhabditis Elegans*, junto con la expresión de esta fosfatasa en células tumorales con alelos PTEN mutantes, demostrando que PTEN actúa como una fosfatasa lipídica *in vivo*.

Estructura de PTEN y PI3K: Señalización fosfolipídica y cáncer. Los fosfoinosítidos PI(3,4,5)P3 y PI(3,4)P2, que son fosforilados en la posición 3 del inositol, se generan en respuesta a diversos estímulos, incluyendo factores de crecimiento y supervivencia, luego de la activación de la PI3 quinasa en la membrana plasmática.

Estos fosfolípidos son ligandos para el dominio PH (homología con plestrina) en proteínas. La interacción con PIP3 o PIP2 sirve para reclutar proteínas tales como PKB/Akt hacia la membrana, donde se activan y transducen señales promotoras de supervivencia y proliferación.

Lo que es importante notar es que estas señales dependientes de fosfoinosítidos, son controladas continuamente mediante la acción de la fosfatasa supresora de tumores (PTEN), que los desfosforila en la posición 3 del anillo inositol.

La estructura cristalina de PTEN revela la presencia de un dominio C2 hacia el extremo COOH terminal de la proteína (Lee y col., 1999).

PTEN: El supresor de tumores. El producto del gen supresor de tumores (PTEN) actúa como una fosfatasa de fosfolípidos. En condiciones de crecimiento normal, señales

estimuladoras que salen del receptor para insulina, activan la enzima PI3-K, la que fosforila fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) para generar fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP3), una molécula lipídica de señalización. “Downstream”, PIP3 activa diversos efectores, incluyendo al producto del protooncogen PKB/Akt. El papel de PTEN es desfosforilar PIP3, actuando como un control negativo en la activación de PKB/Akt.

Si una mutación en PTEN le impide realizar la desfosforilación, PIP3 no podrá ser inactivado y, por consiguiente, continuará propagando su señal “río abajo” (downstream). Esto podría resultar en la activación continuada de PKB/Akt, que, en combinación con otros factores, podría llevar a un crecimiento celular aumentado y un posible desarrollo de un tumor.

Galectinas

Las galectinas constituyen una familia de proteínas extremadamente conservadas a través de la evolución que participan en diversos eventos biológicos. Son capaces de descifrar glucocódigos específicos en macromoléculas complejas situadas en las membranas celulares o en la matriz extracelular, a través de un dominio de 135 aminoácidos filogenéticamente intacto desde invertebrados inferiores hasta mamíferos, denominado dominio de reconocimiento de carbohidratos (DRC), el cual interacciona con estructuras disacáridicas del tipo (Gal (β 1—4 GlcNAc)_n).

Hasta el presente, se describieron 14 subfamilias de galectinas localizadas en un amplio espectro de tejidos y especies del reino animal que han sido clasificadas de acuerdo a su estructura bioquímica.

Su amplia distribución en la naturaleza y sus secuencias conservadas a través de la evolución sugieren que estas proteínas cumplen papeles fisiológicos esenciales para la vida. De hecho, diferentes miembros de esa familia han sido involucrados en procesos inflamatorios agudos y crónicos, adhesión celular, proliferación y diferenciación, apoptosis, progresión tumoral y regulación del *splicing* alternativo. Cabe acotar que la mayoría de estas funciones biológicas han sido asignadas a galectina-1 (Gal-1) y galectina-3 (Gal-3), mientras que el significado funcional de las restantes galectinas es aún tierra virgen para explorar (Rabinovich, 2004).

La apoptosis es un mecanismo fisiológico cuyo objetivo final es lograr la homeostasis en los tejidos del organismo. Actualmente se sabe que diversos procesos patológicos surgen por una disfunción de los mecanismos de regulación de la maquinaria apoptótica de las células. El primer indicio de que Gal-1 podría estar asociada con la apoptosis fue provisto por Goldstone y Lavin en 1991, quienes demostraron un incremento en la transcripción del gen de Gal-1 durante la muerte celular inducida por glucocorticoides.³¹

La segunda evidencia del papel de estas proteínas en procesos de apoptosis fue su localización preferencial en sitios inmunológicamente privilegiados del organismo, como placenta, retina³⁶ y testículo. En estos órganos, múltiples factores operan para asegurar una rápida eliminación de células inflamatorias del propio organismo. En este sentido, la apoptosis de células T inducida por Gal-1 constituiría un mecanismo natural a través del cual sería posible proteger del daño tisular a los sitios más vulnerables del organismo.

El análisis de funcionalidad, reveló que Gal-1 producida por estas células induce la apoptosis de células T activadas, contribuyendo a la formación de un microambiente favorable para el desarrollo tumoral.

Gal-3 revelo en lineas generales propiedades antagonistas a las descritas para Gal-1 respecto de la regulacion de los mecanismos de muerte celular programada (Rabinovich, 2004). La interaccion entre Gal-1 y Gal-3 en los diferentes tejidos permitiria establecer un balance entre proliferacion, diferenciacion y muerte celular.

En perras con tumores mamarios malignos se ha observado que la progresion tumoral fue asociada con la perdida de la expresion de Gal-3 (Choi y col., 2004).

Telomerasa

Otro de los mecanismos por los cuales los tumores mamarios siguen progresando y terminando con la vida del animal, involucra a los telómeros. Cuando los telómeros de los cromosomas se acortan hasta cierta longitud, transmiten instrucciones a la célula para su autodestrucción; suministran así un mecanismo para que el cuerpo se desembarace de las células envejecidas. En la mayoría de las células normales falta la telomerasa, pero en el cáncer es activa y bloquea el acortamiento de los telómeros. En consecuencia, las células cancerosas no mueren.

La actividad telomerasa ha sido detectada en tumores mamarios caninos (Funakoshi y col., 2000; Argyle y col., 2003). Algunas de las estrategias contra la telomerasa son basadas en la identificación de agentes que inhiban la actividad de la telomerasa. El 3'-azido-2', 3-dideoximidina (AZT) es un inhibidor de la transcriptasa inversa, y ha mostrado inhibir la actividad telomerasa en celulas tumorales (Gomez y col.,1998).

Metastasis

Las metastasis son implantes tumorales separados del tumor primario. La metastasis caracteriza de forma inequivoca como maligno a un tumor, debido a que las neoplasias malignas no dan metastasis. La capacidad de invacion de los tumores les permite penetrar en el interior de los vasos sanguineos, linfaticos y cavidades corporales, lo que les da la oportunidad de diseminacion. Con pocas excepciones todos los tumores pueden metastatizar. En general, cuanto mas agresivo, mas rapido crezca y mayor sea el tumor primitivo, mas probable es que metastatice o lo halla ya hecho. Sin embargo, existen innumerables excepciones. Algunas lesiones bien diferenciadas de crecimiento lento a veces metastatizan ampliamente, y a la inversa, lesiones de rapido crecimiento permanecen localizadas durante años. Por tanto, no puede hacerse un juicio sobre la probabilidad de metastasis por el examen anatomopatologico del tumor primario. Como se señalara mas adelante, estan implicados muchos factores, tanto del invasor como del portador. Una vez que el diagnostico de cancer esta establecido, la urgencia es establecer si la enfermedad esta localizada al sitio primario o ya se ha diseminado a los ganglios regionales o a un organo distante.

A pesar de los avances en el diagnostico temprano, tecnicas quirurgicas, terapias adyuvantes o neoadyuvantes, la mayoría de los animales mueren como resultado de las metastasis, las cuales son resistentes a las terapias convencionales (Fidler y col., 1978). La excision quirurgica del tumor primario no es curativa en muchos pacientes porque en ese momento la metastasis ya ha ocurrido (Sugarbaker, 1979). Las metastasis pueden estar localizadas en diferentes organos y/o en diferentes regiones de un mismo organo haciendo que una erradicacion completa por medio de cirugia, radioterapia o drogas se vuelva ineficaz. Ademas el microambiente del organo afectado condiciona significativamente la respuesta de la terapia contra las celulas tumorales (Fidler, 1995), ya que las drogas antitumorales deberian llegar al foco en cantidades suficientes para

destruir las células tumorales sin producir efectos colaterales en el resto de los órganos. Para designar una terapia efectiva para la enfermedad metastásica se requiere un mayor conocimiento de mecanismo molecular interno que regula la patobiología de este proceso (De Vita y col., 1997).

Al momento del diagnóstico, el tumor contiene múltiples subpoblaciones de células con diferentes características genéticas, bioquímicas, inmunológicas y estructurales (Fidler, 1990; Fidler, 1995; Fidler, 1978; Fidler 1982; Nicolson, 1984; Heppner, 1984; Radinsky y col., 1996). Esta heterogeneidad es también prominente dentro y entre las metástasis (Radinsky y col., 1996; Fidler y col., 1985).

Patogenesis

Las metástasis consisten en múltiples, complejos, interactivos e interdependientes pasos. Las células tumorales, eventualmente deben sobrevivir a una serie de interacciones letales contra los mecanismos homeostáticos del hospedador. El balance entre esas interacciones puede variar entre diferentes pacientes con diferentes tumores aun entre diferentes pacientes con un mismo tumor (Sugarbaker, 1979).

Aspectos clínicos

La presentación clínica de los TMC es muy variable; pueden ser únicos (42%) o múltiples (58%). Cuando existen varios, éstos pueden ser del mismo (33%) o diferente (66%) tipo histológico. (Castillo Magan, 2001). Aproximadamente dos tercios de los tumores mamarios ocurren en el cuarto y quinto par, probablemente debido al mayor volumen de tejido mamario presente en las mismas (Kurzman y Gilbertson, 1986). En más del 50 % de los casos se afectan múltiples glándulas. Pueden estar fijados a la piel pero por lo general no se adhieren a la pared corporal subyacente. Los malignos (más que los benignos) tienen mayor probabilidad de fijarse a la pared corporal y estar cubiertos por piel ulcerada (Nelson y Couto, 1995) El tamaño de los tumores mamarios es muy variable, desde unos pocos milímetros hasta varios centímetros. Se presentan como nódulos aislados o múltiples dentro de la glándula mamaria y pueden o no asociarse con el pezón. Es frecuente exprimir secreciones anormales desde los pezones de las mamas afectadas.

Las perras con tumores mamarios benignos generalmente son asintomáticas. Pueden presentarse signos clínicos de neoplasia mamaria debido a la molestia ocasionada por el crecimiento de la masa, que incluye excesivo lamido de la masa, dificultad para acostarse, y resistencia a la manipulación del área abdominal (Jordan, 1998). Los signos clínicos pueden referirse a los sitios de metástasis de los tumores mamarios malignos. Los órganos más afectados en los perros son los ganglios linfáticos regionales y los pulmones. El 70 % o más del parénquima pulmonar puede estar afectado antes que los signos clínicos se hagan evidentes (Brodey, 1983). Las hembras pueden exhibir intolerancia al ejercicio, disnea, fatiga, rales pulmonares y cianosis. (Brodey, 1966; Owen, 1966). Los tumores de las glándulas posteriores parecen diseminarse a los pulmones con mayor frecuencia que los presentes en las mamas anteriores. Los ganglios linfáticos regionales (axilares o inguinales) se muestran agrandados en casos de metástasis. Ocasionalmente pueden presentarse signos de osteoartropatía hipertrófica

pulmonar, tales como cojera, nueva formación de hueso en las extremidades distales de los miembros, manifestándose como protuberancias palpables (Brodey, 1983).

La metástasis de los tumores mamarios malignos es mediante las rutas hematógena y linfática (Theilen y Mandewell, 1987; Weiss, 1990). Las metástasis en otros órganos ocasionan signos clínicos específicos al sitio de metástasis, por ejemplo en el ojo ocasiona hipema e iridociclitis, y provoca ataxia, convulsiones, caminar en círculos cuando asienta en el cerebro (Brodey, 1983). Con menor frecuencia se interesan las glándulas adrenales, riñones, corazón, hígado y piel. El resto del examen físico no muestra particularidades de interés. En la neoplasia avanzada puede evidenciarse caquexia tumoral. El carcinoma mamario inflamatorio constituye una entidad clínica distintiva. Estos tumores tienden a mostrar edema difuso, interesan a glándulas múltiples a menudo bilaterales, y pueden ser dolorosos y calientes. Puede haber edema del miembro por oclusión linfática y crecimiento tumoral retrógrado (Ettinger y Feldman, 1997).

Diagnostico

La diagnosis de neoplasia mamaria debe ser la primera consideración para cualquier nódulo de hembra añosa. La biopsia escisional y su posterior estudio histopatológico es el método de elección para confirmar el diagnostico. El examen citológico de especímenes obtenidos mediante aspiración por aguja fina suele rendir resultados ambiguos. Diez criterios citológicos de malignidad se correlacionan significativamente con conclusiones histopatológicas de malignidad (Allen et al., 1986). En un ensayo, solo de 8 de 19 carcinomas mamarios confirmados por histología fueron identificados como tales mediante citología por aspiración con aguja fina (Griffiths, et al., 1984). Esto demuestra que la citología debe usarse para el diagnóstico tentativo, con la histopatología como un procedimiento definitivo. La radiología y palpación minuciosa permiten evaluar la carga tumoral.

Manejo clínico

Cuando un animal llega a consulta, lo primero que hay que realizar es una historia clínica completa que incluya: sexo, raza, edad, administración de hormonas sexuales en el pasado, si es entera o castrada, cuando se realizó la ovariectomía, estado del ciclo estral, pariciones, episodios de pseudopreñez, fecha del servicio y velocidad del crecimiento del tumor (Gobello y Corrada, 2001). Un cuestionario preimpreso de preguntas frecuentes y un esquema de las glándulas mamarias puede ser de gran ayuda al momento de describir las lesiones.

Una vez terminada la exploración general se procede a la evaluación de las glándulas mamarias y linfonódulos regionales (axilar e inguinal). Se debe identificar la localización de cada nódulo mamario, fecha de aparición y ritmo de crecimiento, diferencias de tamaño relacionadas con el celo, tamaño del nódulo en el momento de la consulta (en tres dimensiones), estado del linfonódulo regional, adherencia a planos profundos y/o piel y la presencia de ulceración de la piel implicada en la lesión (Tabla 2 y 3). Los propietarios suelen reconocer tumores mamarios en sus mascotas varios meses antes de la consulta.

Tabla 2: Resumen modificado de la Organización Mundial de la salud (WHO) del sistema de estadios clínicos para TMC (modificado Owen 1980)..

ESTADIOS DE LOS TUMORES DE GLANDULA MAMARIA EN CANINOS			
ESTADIO	TUMOR PRIMARIO (T)	ESTADO DEL LINFONODULO REGIONAL (N)	METASTASIS A DISTANCIA (M)
1	Diámetro – 3cm.	No afectado	No metástasis a distancia detectada
2	Diámetro e/ 3-5 cm.	No afectado	No metástasis a distancia detectada
3	Diámetro + 5 cm.	No afectado	No metástasis a distancia detectada
4	Cualquier T	Metástasis diagnosticada por histopatológica	No metástasis a distancia detectada
5	Cualquier T	Cualquier N	Metástasis a distancia detectada

La evaluación diagnóstica se completa con un hemograma y perfil químico prequirúrgico. Las radiografías torácicas se indican para buscar enfermedad pulmonar metastásica antes de escisión quirúrgica. La radiología abdominal también es útil para detectar adenopatía sublumbar, la cual es de particular interés cuando las neoplasias se ubican en las glándulas caudales, lo cual implicaría una prognosis grave, incluso sin confirmación histológica de la neoplasia mamaria. La biopsia escisional es el método de elección para confirmar el diagnóstico.

Histopatología

Aproximadamente el 50 % de las neoplasias mamarias caninas son benignas. El adenocarcinoma es el tipo histológico maligno más común en los tumores mamarios caninos (Nelson y Couto, 1995). Todas las masas escindidas deberían enviarse al laboratorio de histopatológica y estas deben estar perfectamente identificadas con el registro del sitio de extracción, si el informe histopatológico demuestra “bordes sucios” u otra característica importante de malignidad, la cirugía puede retomarse desde el lugar apropiado. Por esto, el clínico debe pedir el análisis de los márgenes de la muestra enviada. Es importante considerar que en los TMC pueden presentarse múltiples tipos histológicos concurrentemente. (Allen y Mahaffey, 1989; Brodey *et al.*, 1983)

El reporte de histopatología debe incluir siempre el grado de infiltración y el grado histológico de malignidad (por ejemplo el grado de diferenciación, grado nuclear, índice mitótico, invasión linfática o vascular). Estos valores pueden ser usados para indicar malignidad y el alto riesgo de recurrencia y metástasis pulmonar. El grado de malignidad histológica usualmente se expresa en una escala de 1 a 3 grados, donde el grado 3 tiene los peores pronósticos (Dhame y Weiss, 1989; Hampe y Misdorp, 1974; Jubb y Kennedy, 1970; Misdorp, 1988; Misdorp *et al.*, 1999).

Tratamiento

Quirúrgico

La cirugía es el método de elección para las neoplasias mamarias caninas, salvo en presencia de enfermedad metastásica o carcinoma inflamatorio. Las técnicas incluyen nodulectomía, mastectomía, mastectomía en bloque, mastectomía radical uni o bilaterales (Bojrab *et al.*, 1993; Wilkinson, 1971; Withrow S. J. 1975). Los pro y los contras de la escisión radical versus la local son ampliamente discutidos. La elección de la técnica adecuada depende del tamaño del tumor, del número de mamas afectadas, la localización, fijación a los tejidos circundantes y el estado sanitario general del paciente (Rosenberg *et al.*, 1989). La remoción de los linfonodos regionales esta indicada si el examen citológico de los mismos revela la presencia de células tumorales.

Un estudio indicó que la ovariectomía desarrollada conjuntamente con la remoción del tumor mamario, prolongaría el tiempo de supervivencia no solamente en perras con tumores benignos sino también en malignos (Sorenmo *et al.*, 2000). Este estudio mostró que en perras castradas con un periodo inferior de 2 años desde el momento de la ablación quirúrgica la supervivencia fue de un 45% más que si no se hubiera hecho. Por consiguiente, la castración de todas las hembras al tiempo de la remoción del tumor mamario debe ser considerada.

Quimioterapia

El uso de quimioterápicos es controversial y solo se implementaría en pacientes que presenten un alto riesgo de metástasis. Con frecuencia no se indica por sus efectos tóxicos. Los protocolos incluyen doxorubicina en dosis de 30mg/m² intravenosa (IV) cada 3 semanas con un mínimo de 2 aplicaciones, combinación de ciclofosfamida en dosis de 1 mg/kg/día oral, vincristina 0,0125 mg/kg IV una vez por semana y metotrexato 0,3-0,5 mg/kg IV semanalmente. (Hahn, 2001; Harvey y Gilbertson, 1977). La doxorubicina se ha descrito que produjo remisión parcial de metástasis pulmonar en dos perras con adenocarcinoma a los 12-18 meses luego de la terapia (Hahn, 2001). También se puede suplantar la doxorubicina por mitoxantrona, es similar a la primera pero su toxicidad es menor. Las dosis utilizadas son: mitoxantrona (combinada o no) 3-5 mg/m²; doxorubicina 30 mg/m²; vincristina, 0,75 mg/m²; ciclofosfamida, 150-200 mg/m² (Brodey, 1966). Siempre hay que realizar un análisis de sangre (recuento de leucocitos) y electrocardiograma previo al tratamiento. Si el tratamiento va a estar compuesto solo por mitoxantrona o doxorubicina, esta debe administrarse cada 21 días. Si se usa en combinación con otros fármacos la frecuencia varia (Hahn *et al.*, 1992; Ogilvie *et al.*, 1989; Tilley y Smith, 1998). La quimioterapia ocasiona en los animales que la reciben inmunodepresión, quedando en consecuencia más expuestos a las enfermedades infecciosas. Debido a ello, se indica en estos pacientes antibioticoterapia y control permanente de plaquetas y leucocitos.

Hormonales

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.

Antiestrogenos: El tamoxifeno, es un anti-estrógeno administrado como terapia de sostén, está actualmente atrayendo el interés de los especialistas, dado sus potenciales beneficios en el control del cáncer. Es un anti-estrógeno sintético no esteroide análogo al clomifeno y mixto, con efectos agonistas y antagonistas. La manifestación de estas diferentes acciones depende de la especie y del tejido considerado (Gottardis *et al.*, 1988; Misdorp W. 1988; Mol *et al.*, 1997; Jordan, 1998). Por ejemplo, en humanos existen efectos antagonistas en la glándula mamaria mientras que en el útero se observan efectos agonistas (Morris *et al.*, 1993) El preciso mecanismo de acción de tamoxifeno es todavía incierto, se piensa que podría deberse a un bloqueo competitivo de ERs pero posiblemente tenga otros mecanismos de acción desconocidos (Kitchell,1995). Puesto que no todas sus acciones farmacológicas pueden ser explicadas en base a su actividad antagonista del receptor de estrógeno, se ha sugerido que parte del efecto antitumoral podría estar relacionado con la actividad inhibitoria de la proteína quinasa C (PKC). El tamoxifeno tiene la capacidad de unirse al dominio catalítico de la PKC. Es importante remarcar que la actividad de la PKC puede estar alterada en ciertos tumores. Los tumores de mama tienden a presentar mayores niveles de PKC que el tejido normal. En muchos casos el potencial metastático de células cancerosas se correlaciona con la actividad de la PKC. Las células mas agresivas tienen la actividad de la PKC mas alta en comparación con las células menos agresivas (Kazanietz 2000; Kitchell, 1995). El tamoxifeno es utilizado en mujeres para el tratamiento de tumores positivos al ERs. Por el momento la información disponible acerca de la eficacia del tamoxifeno en el tratamiento de tumores de glándula mamaria caninos es insuficiente. En un estudio, de respuestas a corto plazo se observaron diferencias significativas en 16 perras con carcinomas mamarios que recibieron tamoxifeno a una dosis de 0,4 a 0,8 mg/kg/día vía oral durante 4 a 8 semanas. (Kitchell, 1995). No obstante, son necesarios más estudios para ajustar el régimen de administración; efectos colaterales como piometra, hiperplasia vaginal, incontinencia urinaria, fiebre y alopecia pueden limitar el uso de tamoxifeno en perras (Ettinger y Felman, 1997; Misdorp W. 1988; Morris *et al.*, 1993)

La disponibilidad de antiprogestagenos como agliprestone en el mercado europeo (Misdorp, 1988) plantea su potencial beneficio en el tratamiento de tumores de glándula mamaria caninos positivos a los receptores de progesterona.

Dado que muchas veces el tumor de glándula mamaria se presenta conjuntamente con pseudopreñez, puede darse un desarrollo adicional del mismo. En este caso, el manejo con drogas antiprolácticas esta indicado para permitir la evaluación detallada del tumor antes de la cirugía. Puede emplearse cabergolina a 5 ug/kg/día PO 1 semana antes de la cirugía. (Murrel, 1991).

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; Bakker 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 (P_4), con una tasa de fijación tres veces mayor que la hormona endógena sin tener actividad antiglucoide (Philibert, 1994). En cuanto al rol de antiprogestágenos, hacen su aparición los de última generación por no tener efectos antiglucoide 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, leuprolide, deslorelina, buserelina y goserelina estimulan la producción y liberación, con diferente potencia, de gonadotrofinas 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. 2006; Inaba y col., 1996; McRae y col., 1985; Trigg y col., 2001; Vickery y col., 1989).

La goserelina se usó 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 componente con que hallan sido formulados.

¿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 ésto 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 antiestrogénos 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 redonda 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.

Radioterapia

La radioterapia puede emplearse como terapia adyuvante posquirúrgica o en el tratamiento de tumores inoperables o en metástasis óseas (Mc Leod y Thrall Da 1999). No hay muchos datos referidos a su eficacia en el tratamiento de tumores mamarios caninos.

La falla en el tratamiento quirúrgico se debe entre otras cosas a una ablación incompleta, debido a restos tumorales que pueden quedar en el margen operatorio. La radiación a menudo fracasa en el centro del tumor, donde existen grandes volúmenes de células, muchas en condiciones hipóxicas pero rara vez falla en la periferia, donde las células están en cantidades reducidas y bien vascularizadas. En contraste, el alcance de la cirugía está limitado por la necesidad de preservar tejidos normales vitales adyacentes al tumor. Si la cirugía fracasa en estas circunstancias, en general se debe a la presencia de células cancerosas residuales en la periferia del campo quirúrgico (Mc Leod y Thrall Da 1999). La radioterapia puede practicarse antes o después de la resección quirúrgica de un tumor. Si la demora entre cirugía y radioterapia es prolongada, las células tumorales residuales pueden tener el tiempo suficiente para repoblar el campo quirúrgico perdiéndose las ventajas de la misma. Si la radioterapia es demasiado precoz

en el periodo postoperatorio, puede afectarse el periodo cicatrizal. En líneas generales, un retraso de 1,5 a 3 semanas antes de iniciar la radioterapia parece ser lo más conveniente. La radioterapia preoperatoria también posee ciertas ventajas, reduciendo el tamaño tumoral previo a la cirugía, puede facilitar la ablación. La radiación ionizante también puede influir sobre la viabilidad de las células tumorales y reducir la probabilidad de implantación o diseminación neoplásica que podría acontecer como secuela de la manipulación operatoria (Perez y Brady, 1987).

Inhibidores proteasicos

Si bien la invasión tumoral es el atributo que, en última instancia, determina la agresividad biológica y la progresión de la enfermedad, la mayoría de las estrategias terapéuticas tradicionales se basan en la inhibición de la proliferación o en la destrucción de las células neoplásicas, pero no en la reducción de sus propiedades invasivas. Se ha desarrollado un grupo de inhibidores sintéticos de MMPs que actualmente son evaluados en estudios preclínicos. Entre ellos debemos destacar el BB-94 o batimastar, que inhibe las MMPs al ocupar el sitio del Zn en la enzima, y ciertas tetraciclinas modificadas (doxiciclina, minociclina), cuyo mecanismo de acción exacto se desconoce (Gomez y Alonso, 1998).

Inhibidores en la ruta biosintética del colesterol

Las acciones antitumorales de la lovastatina en modelos experimentales animales de carcinoma mamario, se observaron incluso luego de administrar dosis relativamente bajas de 1 a 2 mg diarios por kilo de peso corporal. La utilidad de la lovastatina, así como el de estrategias alternativas que reduzcan la síntesis del colesterol, en el tratamiento del cáncer mamario, podría incluso extenderse hacia el terreno preventivo (Gomez y Alonso, 1998).

Inmunoterapia

La inmunoterapia fue también descripta para el tratamiento de las neoplasias mamarias. Su finalidad es la de estimular el sistema inmune para posibilitar la inhibición del crecimiento tumoral. Se ha logrado mejores resultados cuando la masa tumoral se reduce previamente con alguno de los métodos anteriores. La estimulación del sistema inmune puede realizarse con levamisol en dosis de 5mg/kg tres veces por semana durante 3 meses (Harvey y Gilbertson, 1977). Otros estudios no lograron demostrar efectos favorables (Mc Ewen *et al.*, 1985; Mc Ewen y Withrow, 1996). La inmunoterapia se ha intentado con *Corynebacterium parvum* y bacilo de Calmette-Guerin, pero esta modalidad no ha sido aprobada.

El elevado número de receptores ErbB2 en tumores mamarios humanos (entre un 25-30% de estos, representan una sobre-expresión del receptor) ha llevado a utilizar a esta molécula como "target" en el tratamiento. Distintas drogas han mostrado ser efectivas en bloquear la señalización originada en la célula por este receptor. Pero el descubrimiento más esperanzador es que un anticuerpo monoclonal y parece ser más efectivo en los estadios avanzados de la enfermedad. La estrategia de intentar bloquear los receptores mediante el empleo de proteína antireceptores (anticuerpos antireceptores) ha sido frecuentemente empleada *in vitro*, pero en el caso de trastuzumab, se ha llegado a estudios clínicos altamente satisfactorios con pacientes humanos. Todavía no se cuenta con estudios de este tipo en veterinaria.

Alimentación

Una teoría publicada en 1989, (Shofer et al 1989) y citada en varios textos (Alenza *et al.*, 1998) sugiere que el consumo de una dieta hiperproteica e hipograsa en perras con cáncer mamario puede prolongar su tiempo de supervivencia.

Control del ciclo celular

Hay potenciales estrategias terapéuticas en estudio intentando controlar el ciclo celular. Ellas son: bloqueantes de la interacción CDK-ciclinas, bloqueo de la fosforilación, inhibición de síntesis de ciclinas, activación de la degradación de ciclinas y inhibición de moléculas CDK (Tabla 4).

Tabla 4: Compuestos terapéuticos que controlan el ciclo celular.

Compuesto	Familia	Especificidad	Características
Olomoucina	Purina	CDK1, CDK2 y CDK5 >> CDK4	Interrupción de crecimiento en G1/S y G2/M. Induce apoptosis
Roscovitina	Purina	CDK1, CDK2 y CDK5 >> CDK4	Interrupción de crecimiento en G1/S y G2/M. Induce apoptosis y diferenciación en algunos casos
Purvalanol	Purina	CDK1, CDK2, CDK5	Interrupción de crecimiento en G1/S y G2/M.
NU 2058 y NU 6027	Purina/Pirimidina	CDK1, CDK2	Inhibición en el crecimiento de células tumorales.
UCN-01*	Alcaloide	CDK1, CDK2, CDK4	Inhibición en el crecimiento y apoptosis. Induce G1/S e interrupción de G2/M. En tratamientos clínicos ha demostrado alguna actividad en melanoma, linfoma y sarcoma
Indirubina-5-ácido sulfónico	Indirubinas	CDK1 > CDK5 > CDK2 >> CDK4	La indirubina es el componente activo de una receta china tradicional contra la leucemia
Flavopiridol*	Flavonoide	CDK1, CDK2, CDK4	Interrupción de crecimiento en G1/S y G2/M. Induce apoptosis y diferenciación. En tratamientos clínicos ha demostrado alguna actividad en linfoma y cáncer de colon y renal.
Kenpaullone	Paullone	CDK1 > CDK2 >> CDK4	Retrasa la progresión del ciclo celular e inhibe el crecimiento de las células tumorales <i>in vitro</i> .
Butirolactona I	Producto natural	CDK1 > CDK2	Aislado del aspergillus. Interrupción de crecimiento en G1/S y G2/M. Induce apoptosis y diferenciación en algunos sistemas.
Himendialdisina	Producto natural	CDK1, CDK5 > CDK2 >> CDK4	Aislado de una esponja marina
SU 9516	Indolinona	CDK2	Disminuye la fosforilación de RB y la activación de Caspasa 3.

			Provoca el bloqueo de G0/G1 y G2/M.
CINK4	Triamino-pirimidina	CDK4/6-ciclina D1	Provoca desfosforilación de RB e interrumpe en cultivos y tumores pequeños en un modelo de xenoinjerto
PD 0183812	Pirido-pirimidina	CDK4, CDK6 > CDK2	Interrupción de G1 en células RB positivas en correlación con hipofosforilación RB
Fascapicina	Producto natural	CDK4	Interrumpe G1 y desfosforilación RB en sitios que son específicos para Kinasa CDK4

- Los asteriscos refieren a compuestos probados en tratamientos clínicos. CDK ciclina dependiente de kinasa, RB, retino blastoma. Modificado Nat. Rev. Cancer 1 (2001), 222

Prevencion de las metastasis

Estudios experimentales en modelos murinos se han orientado a la búsqueda de distintas sustancias con efectos biológicos sobre la invasión y diseminación de las células cancerosas, y han arrojado interesantes resultados como potenciales agentes antiinvasivos o antimetastásicos (Alonso y col. 1999).

Recientemente, se investigó el efecto de la desmopresina, (DDAVP, 1-diamino-8-D-arginina vasopresina), un péptido sintético análogo a vasopresina con propiedades procoagulantes y profibrinolíticas, que actuó previniendo la diseminación metastásica regional y a distancia en un modelo preclínico de manipulación y excisión quirúrgica de tumores subcutáneos de un carcinoma mamario altamente agresivo en ratones. En este estudio, se reportó que, aplicado antes y después la cirugía, este péptido tiene la capacidad de inhibir dramáticamente la diseminación hacia los ganglios linfáticos regionales y también disminuir de manera significativa la colonización hemática en pulmón de células metastásicas del carcinoma mamario (Giron y col., 2002).

Adicionalmente, la producción tumoral de sustancias tromboblásticas (Giger y col., 1982), enzimas proteolíticas (Alonso, 1999), factores inhibidores de la coagulación (Forrester, 1992), factores que dañan el endotelio y exponen el colágeno subendotelial (Honn y Tang, 1992), implicados en la diseminación metastásica, aportan fundamentos importantes para la utilización de análogos sintéticos de vasopresina. El objetivo de este trabajo, fue evaluar el efecto de DDAVP sobre el periodo libre de enfermedad y sobrevida, en perras con TGM sometidas a mastectomía.

Conociendo que, a diferencia de los quimioterápicos, los análogos de la vasopresina a la dosis utilizada (Papich, 2000), no poseen efectos colaterales en el perro y que los resultados preliminares en ratones fueron alentadores (Giron y col., 2002), resultó de interés evaluar el efecto de la DDAVP en caninos hembras con TGM en estadios avanzados. Se evaluó a 26 perras con tumores mamarios en estadio clínico III o IV, de las cuales 13 recibieron DDAVP en forma perioperatoria ($\mu\text{g}/\text{kg}$ 30 minutos antes y 24 hs. después de la cirugía en forma EV) y las 13 restantes recibieron solución fisiológica por la misma vía. Seis de 13 (46 %) de las perras controles tuvieron recidiva locoregional o metastasis dentro de los primeros 3 meses de efectuada la cirugía, mientras que solo 1 de 13 (7 %) de los animales tratados tubo el mismo problema ($p=0,03$ χ^2). La media de tiempo libre de enfermedad fue significativamente mas alta

en los animales tratados con DDAVP (Animales controles: 105 días Vs. Animales tratados con DDAVP: > 318 días; $p < 0,05$ log-rank test) (Hermo y col., 2006).

Las diferencias significativas obtenidas en este trabajo están en línea con las previamente descritos en un modelo murino, en el cual se observó diferencias en la aparición de metástasis entre un grupo tratado con DDAVP y el control de 12 y 87%, respectivamente; (Giron y col., 2002).

Si bien todavía no han determinado el mecanismo preciso antimetastásico de la DDAVP se hipotetiza que la DDAVP podría mejorar la hemostasia en el territorio operatorio favoreciendo la encapsulación de un eventual residuo tumoral, como también reducir la formación y supervivencia de émbolos tumorales que pudieran haber accedido a la circulación sanguínea o linfática (Alonso, y col., 1999; Giron, y col., 2002). La reducción de los émbolos tumorales se debería a que DDAVP incrementa la fibrinólisis intravascular (Mannucci y col., 1975; Gader y col., 1973), disolviendo el escudo protector de fibrina de las células tumorales circulantes y reduciendo la agregación de las células tumorales (Alonso y col., 1999).

La DDAVP puede cambiar la hemodinamia del flujo sanguíneo o modificar la adherencia de células tumorales, por alteración en la expresión de P-selectina en células endoteliales (Kanwar et. al., 1995; Keck et. al., 2001). La DDAVP también puede inducir lisis de células metastásicas tumorales mediante la producción de óxido nítrico por el endotelio vascular (Yamada et. al., 1993; Hirano, et. al. 1997). Por lo tanto DDAVP reduciría la implantación de células metastásicas liberadas durante y después de la manipulación quirúrgica. Por otra parte, se dispone de evidencias preliminares que sugieren que la DDAVP podría inducir la formación de angiostatina al actuar sobre carcinomas mamarios agresivos, inhibiendo la angiogénesis tumoral (Ripoll y col., 2004).

Se concluye que en este grupo de caninos con tumores mamaruios malignos DDVAP redujo significativamente la progresión y la muerte de animales con TGM malignos durante el periodo de estudio. Estos resultados preliminares sugieren un potencial clínico en la aplicación de DDAVP en el tratamiento de TGM caninos lo que justifica futuros estudios en un mayor número de animales.

Crono farmacología y cronoterapia en cáncer

La posibilidad que la acción de un medicamento variara con la hora del día fue planteada en 1814 por el médico francés Julien Virey. Las funciones celulares del organismo están programadas en función del tiempo. No es de extrañar que la eficacia y el metabolismo de un medicamento varíen en función del momento del día en que es administrado. Existe actualmente información sobre variaciones diarias en la actividad de numerosos medicamentos. Los tejidos normales presentan ritmos circadianos en las funciones celulares. Estas funciones rítmicas se pierden o modifican en el tejido tumoral. En el tejido sano los ritmos de las mitosis son de 24 hs. y llega en algunos casos a ser tan breves como 8 horas. Por lo tanto el objetivo de la cronoterapia sería no solo controlar el crecimiento tumoral sino restaurar la naturaleza rítmica perdida de la función celular. Dos estrategias son posibles. Según la primera, el ritmo de vulnerabilidad tumoral será utilizado para administrar el agente anticanceroso en el momento del día en que tenga mejores posibilidades para destruir a las células malignas. Según la segunda, el ritmo circadiano de sensibilidad del paciente a la droga anticancerosa será computado a fin de administrar la mayor cantidad de droga posible en el momento del día en que el paciente mejor tolere el tratamiento (Golombek, 2002).

En los últimos años se ha consolidado la opinión de que es prioridad aumentar la tolerancia a la quimioterapia en los pacientes cancerosos. El aumento en la frecuencia del tratamiento y la utilización de las dosis lo mas elevadas posibles, es la única posibilidad para reducir la aparición de clones de células tumorales quimiorresistentes, causa mayor de la ineficiencia de los tratamientos (Golombek, 2002).

Hay resultados de estudios hechos en base a terapias circadianas utilizando algunos de los principales grupos de agentes citotóxicos en medicina humana. No hay datos concluyentes en medicina veterinaria. Se demuestra la ventaja de los esquemas circadianos en la disminución de los efectos secundarios y el incremento de intensidad de la dosis segura de diversas clases de drogas (Golombek, 2002).

Pronóstico

Existen ciertos factores para la evaluación del pronóstico de un paciente y es importante valorar su influencia en la evolución del mismo. Para que un factor se considere como pronóstico tiene que aportar información fiable que permita predecir la aparición de recidivas y/o metástasis tumorales, es decir, que nos permita establecer el *tiempo libre de enfermedad* (TLE) y la *supervivencia total* (ST). El TLE es el período que transcurre entre el tratamiento quirúrgico de la masa y la aparición de recidivas y/o metástasis. La ST muestra el tiempo entre la extirpación de la masa y la muerte del animal por el tumor u otras causas (Castillo Magan, 2001). Los factores pronóstico que nos revelan información sobre la evolución de pacientes con TMC.

1. Factores clínicos

- Edad: los animales de edad avanzada tienen mayor probabilidad de desarrollar TMC y además un peor pronóstico. Algunos autores han relacionado la edad con un mayor ritmo de crecimiento y con un menor TLE y ST.
- Localización y número de neoplasias: parece que la localización no influye, pero sí el número, pues a mayor número de TMC malignos menor TLE.
- Estadio clínico: basado en el tamaño tumoral, afección de ganglios linfáticos y existencia de metástasis a distancia, está relacionado con la ST.
- La implicación de linfonódulos regionales es un tema de controversia aunque, para la mayoría de los autores, predice un mayor riesgo de metástasis y acorta la ST.
- El ritmo y tipo de crecimiento se ha relacionado con un peor pronóstico cuando es rápido e invasivo.
- El tamaño del tumor es un buen factor pronóstico puesto que la presencia de, al menos un tumor maligno, de gran tamaño está relacionada con más corto TLE y ST.
- La ulceración de la piel indica que se trata de una lesión de peor pronóstico (Castillo Magan, 2001)

2. Factores histológicos.

El tipo histológico es otro factor que influye en el pronostico (Kurzman y Gilbertson, 1986). Los tumores benignos se tratan con facilidad mediante escisión quirúrgica y por lo general con llevan un excelente pronóstico.

Aquellas neoplasias con presencia de células mioepiteliales (complejas) tienen mejor pronóstico que las simples. Los sarcomas son los tumores de peor pronóstico ya que presentan una alta probabilidad de metástasis y bajos TLE y ST. Dentro de los carcinomas simples, existe un orden creciente de malignidad: no infiltrativo, túbulo-papilar, sólido, anaplásico. Los carcinomas tubulares metastatizan con más

frecuencia y con más frecuentemente causan la muerte del animal. El pronóstico empeora en función de la mayor anaplasia de la neoplasia. (Castillo Magan, 2001).

Los sarcomas y carcinomas tienen un pronóstico malo y la mayoría de las perras mueren por la enfermedad dentro de los 9 a 12 meses. Los carcinomas inflamatorios también tienen un pronóstico muy malo (Gilbertson *et al.* 1983).

La sobrevivencia total es de 4 a 17 meses para animales con tumores malignos. Estos suelen dar metástasis durante los 2 años de realizada la cirugía (más comúnmente 1 a 9 meses). Además, las perras que desarrollaron tanto tumores benignos como malignos están en mayor riesgo de desarrollar tumores malignos en un futuro cercano; por lo tanto debe realizarse un seguimiento periódico en todos los casos (con una frecuencia de 3 o 6 meses para tumores benignos o malignos respectivamente) (Clark, 1994).

Los tumores que son menos invasivos y mejor diferenciados tienen bajas recurrencias, como aquellos que existe baja reactividad linfóide. Un diagnóstico histopatológico de tumor mamario maligno no siempre indica una neoplasia clínicamente maligna. Cerca de la mitad de los tumores mamarios “malignos” no recurren ni se diseminan después de la ablación quirúrgica. Aun cuando el pronóstico no puede fundamentarse en el examen histopatológico, existen generalidades. (Loar, 1986).

3. Nuevos factores pronóstico

Se han adaptado a la Medicina Veterinaria técnicas que se utilizan en el cáncer de mama de la mujer. El análisis del ADN mediante citometría de flujo determina el contenido de ADN de un tumor y su ploidía (numero de dotaciones cromosómicas completas que contiene un núcleo celular; Rooney y Henry, 1993). La fracción de la fase S (síntesis de ADN) del tumor permite establecer que los tumores aneuploides (cantidad anormal de ADN) y con elevada fracción de la fase S tienen mal pronóstico. El marcador Ki-67 permite establecer la fracción de crecimiento tumoral o el grado de proliferación nuclear (Gomez D. y Alonso D. 1998). La detección de Ers se puede realizar mediante pruebas inmunohistoquímicas más fáciles que las bioquímicas tradicionales. Un estudio realizado en Berlín, ha demostrado por técnicas de inmunohistoquímica, que en el 84,4% de los nódulos linfáticos analizados presentaban émbolos de células tumorales o micrometástasis. Con esta técnica podrían ser detectadas micrometástasis con más de 50 células tumorales (Busch y Rudolph, 1995).

Prevención

La ovariectomía temprana en las perras que no serán destinadas a reproducción es un elemento clave para disminuir fuertemente el riesgo de contraer tumores de glándula mamaria. Los propietarios deberían ser advertidos acerca de llevar a cabo la rutina de examinar ellos mismos las mamas de sus perras, para aumentar así las chances de realizar un diagnóstico precoz y el tratamiento adecuado.

Conclusiones

Los tumores de glándula mamaria son uno de los principales problemas del aparato reproductivo que nos llega actualmente a la consulta clínica. Debido a su complejo desarrollo, que tiende a la progresión y malignización del tejido mamario a lo largo del tiempo, no quedan dudas que cuanto más rápido se proceda a su extracción quirúrgica, mayores son las posibilidades de sobrevivencia del paciente. En general los tumores

responden de manera dudosa a la irradiación aunque en ocasiones se utiliza para intentar retrasar el crecimiento. De igual manera tienen variable respuesta a la quimioterapia, por lo que tampoco existe un protocolo quimioterápico eficaz que pueda ser utilizado en esta afección. Mucho se ha avanzado últimamente en los mecanismos moleculares de transducción de señales y desarrollo tumoral y parecen promisorias las terapias dirigidas contra estos mecanismos.

Agradecimientos

El presente trabajo es subsidiado por la Morris Foundation, Grant Nro. D05CA-059, Directora C. Gobello.

G. Hermo es Becario Nivel Inicial de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Subsidio PICT 14255/03, Investigador Responsable D.F. Alonso.

Bibliografía

Alenza D.P.; Rutterman G. R.; Pena L.; Beynen A.C.; Cuesta P. 1998. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. *J Vet Int Med* 12:132-139.

Allen S. W.; Mahaffey E. A. 1989. Canine mammary neoplasia: Prognostic indicators and response to surgery. *J Am Anim Hosp Assoc* 25:540-547.

Allen S. W.; Prasse K. W.; Mahaffey E.A. 1986. Cytologic differentiation of benign from malign canine mammary tumor. *Vet Pathol* 23:649-655.

Alonso D.F.; Skilton, G.; Farias E.F.; Bal de Kier Joffe E.; Gomez D. 1999. Antimetastatic effect of desmopressin in a mouse mammary tumor model. *Breast Cancer Res Treat* 57: 271-275.

Alonso D; Farina H; Skilton G; Gabri M; De Lorenzo M; Gomez D. 1998. Reduction of mouse mammary tumor formation and metastasis by lovastatin, an inhibitor of mevalonate pathway of cholesterol synthesis. *Breast Cancer Research and Treatment* 50: 83-93, 1998.

Bakker H.J.; Planken P.C.; Kuipers L.; Lagendijk A. 1990. Phase modulation in second-order nonlinear-optical processes. *Phys Rev A.* 1;42(7):4085-4101.

Baselga J; Gianni L; Geyer C; Perez EA; Riva A; Jackisch C. 2004. Future options with trastuzumab for primary systemic and adjuvant therapy. *Semin Oncol.* 31 (Suppl 10):51-57.

Battistacci M; Calandra M. L. 1974. Quantitative measurement of metabolites of the tryptophane-niacin pathway in healthy bitches and those affected with mammary dysplasia and neoplasia. *Nuova Vet.* 50: 246-252.

Bird C.; DeInnocentes P.; Lynn. K. 2002. Focused Expression Profiling of Cyclin and Cyclin-Dependent Kinase Integration Complex Components and Regulators in a Spontaneous Model of Canine Mammary Cancer. In: Modiano J. F. (Ed.) *International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org) P0410.0902.*

Blood C. H ; Zetter B. R. 1990. Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Acta Bioch Bioph* 1032:89-93

Bojrab M.J.; Birchard S. J.; Tomlinson (h) J. L. 1993. *Técnicas actuales en cirugía de pequeños animales.* 3ra ed. Intermedica. Buenos Aires, Argentina. 447-452.

- Brodey R. S.; Fidler I. J.; Howson A. E.** 1966. The relationship of estrous irregularity, pseudopregnancy and pregnancy to the development of canine mammary neoplasms. *J Am Vet Med Assoc* 149: 1047-1049.
- Brodey R. S.; Goldschmidt M. A.; Roszel J.R.** 1983. Canine mammary gland neoplasms. *J.Am.Anim. Hosp. Assoc.* 19:61-90.
- Brunetti B, Sarli G, Preziosi R, Leprotti S, Benazzi C.** 2003. E-cadherin expression in canine mammary carcinomas with regional lymph node metastases. *J Vet Med A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 50(10):496-500.
- Busch U.; Rudolph R.** 1995. Mammary carcinoma of the female dog: clinical relevance of the immunohistochemical demonstration of micrometastases in the regional lymph nodes. *Tierarztl Prax.* 23(3):280-286.
- Casciato D.; Lowitz B.** 2001. *Oncología clínica.* 4ta ed. Marban (Ed). Madrid. España. 3-28.
- Choi YK, Hong SH, Kim BH, Kim HC, Woo HJ, Kim DY.** Immunohistochemical expression of galectin-3 in canine mammary tumours. *J Comp Pathol.* 2004 Aug-Oct;131(2-3):242-245.
- Chui X.; Egami H.; Yamashita J.; Kurizaki T.; Ohmachi H.; Yamamoto S.; Ogawa M.** 1996. Immunohistochemical expression of c-kit proto-oncogen product in human malignant and non-malignant breast tissues. *Br. J. Cancer* 73:1233-1236.
- Clark J.H.** 1994. Mechanism of action of steroid hormones and antagonists. En: *Golldzierher, JW Fotherby, K (ed). Pharmacology of the contraceptive steroids.* Raven Press, NY . 27-40.
- Claver J. A.; Sanchez A.; Sicardi A.J.; Lawzewitsch I.** 1985. *Lecciones de histología veterinaria.* Vol. 7. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. 59-76.
- Corrada Y.; Castex G.; de la Sota L.; Goya R.; Gobello C.** 2002 Growth hormone serum concentrations in bitches with spontaneous mammary tumors before and after mastectomy. *Anales de Veterinaria de Murcia, España.* 19: 37-42
- Corrada Y.; Gobello C.** 2001 Acromegalia del diestro en la perra. *Analecta Veterinaria.* Vol 21 N° 1:57-62.
- Corrada Y.; Hermo G.; Johnson C.A.; Trigg T.E.; Gobello C.** (2006) Short-term progestin treatments prevent estrous induction by a GnRH agonist implant in anestrus bitches. *Theriogenology.* 20;65(2):366-373.
- D'Arville C.N; Pierrepont C. G.** 1979. The demonstration of oestrogen, androgen and progesterone receptors in the cytosol fraction of canine mammary tumors. *Eur J Cancer.* 875-883.
- Dahme E.; Weiss E.,** 1989 *Anatomía Patológica Especial Veterinaria.* Acribia. Zaragoza. España. 289-291.
- DeVita V.; Hellman S.; Rosenberger S.** 1997. *Cancer: Principles and practice of Oncology.* 5th. ed. Lippincott-Raven.
- Donnay I.; Devleeschower N.; Wouters-Ballman P.; Leclero G.; Verstegen J.** 1996. Relationship between receptors for epidermal growth factor and steroid hormones in normal, dysplastic and neoplastic canine mammary tissues. *Res Vet Sc* 60: 251-254.
- Donnay I.; Rautis J.; Verstegen J.** 1994. Influence des antécédents hormonaux sur l'apparition clinique des tumeurs mammaires chez la chienne. *Étude épidémiologique.* *Ann. Med. Vet.* 138: 109-117.
- 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 of treatment and recovery. *Acta Endocrinol (Copenh).* 116(3):413-7.
- Ettinger S. J.; Feldman E. C.** 1997. *Tratado de medicina interna veterinaria.* 4ta ed. Intermedica. 2053-2056.

- Fiddler I.J.** 1990. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth GHA Clowes memorial award lecture. *Cancer Res* 50:6130.
- Fiddler I.J.** 1995 Modulation of the organ microenvironment for the treatment of cancer metastasis (editorial). *J Natl Cancer Inst* 84:1588.
- Fiddler I.J.** 1978 Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 1978;38:2651.
- Fiddler I.J.; Gersten D.M.; Hart I.R.** 1978. The biology of cancer invasion and metastasis. *Adv Cancer Res*;28, 129.
- Fidler I.; Hart I.R.** 1982. Biological diversity in metastasis neoplasms: origins and implications. *Science* 217, 998.
- Fidler I.J.; Poste G.** 1985. The cellular heterogeneity of malignant neoplasms: implications for adjuvant chemotherapy. *Semin Oncol.* 1985 Sep;12(3):207-221.
- Forrester S.** 1992. Symposium on paraneoplastic disorders. *Vet. Med.* Jan. 26.
- 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.
- Gama A, Paredes J, Albergaria A, Gartner F, Schmitt F.** 2004. P-cadherin expression in canine mammary tissues. *J Comp Pathol.* 130(1):13-20.
- Giger U.; Dodds W.J.** 1989. Effect of desmopressin in normal dogs and dogs with von Willebrand's disease. *Vet Clin Pathol* 18:39.
- Gilbertson S. R.; Kurzman I.D.; Zachrau R.E; Hurvitz A.I ; Black M.M** 1983. Canine mammary epithelial neoplasm: Biologic implications of morphologic characteristics assess in 232 dogs. *Vet Pathol* 20:127-142.
- Giron S.; Tejera A.M.; Ripoll G.M.; Gomez D.E.; Alonso D.F.** 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. *Comp Cont Educ Pract* 23: 705-710.
- Gobello C.; de la Sota R. L.; Goya R. G.** 2001. A review on canine pseudocystis. *Reprod Dom Anim.* 36: 283-288.
- Golombek. D.** 2002. Cronobiología Humana. Ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad. Universidad Nacional de Quilmes. Buenos Aires. Argentina.
- Gomez D.; Alonso D.** 1998. Introducción a la Oncología Molecular. Universidad Nacional de Quilmes. Buenos Aires. Argentina. 113-134.
- Gomez D; Alonso D; Yoshiji H; Thorgeirsson U.** Tissue inhibitors of metalloproteinases; structure, regulation and biological functions. *European Journal of Cell Biology* 74: 111-122, 1997.
- Gottardis M. M.; Robison S. P.; Satyaaswaroop P.G.; Jordan V. C.** 1988. Contrasting actions of tamoxifen on endometrial breast tumor growth in athymic mouse. *Cancer Res.* 48: 218-815.
- Graham J.; Myers R.** 1999. The prognostic significance of angiogenesis in canine mammary tumors. *J Vet Intern Med.* 13(5):416-418.
- Griffiths G. L.; Lumsden J. H.; Valli VEO** 1984. Fine needle aspiration cytologic and histologic correlation in canine tumors. *Vet Clin Pathol*; 13: 13-17.
- Hahn K. A et al.** 1992. Canine Malignant mammary neoplasia: Biologic behavior, diagnosis, and treatment alternatives. *J Am Anim Hosp Assoc* 28:251.
- Hahn K. A.** 2001. Practical indications and contraindications for tamoxifen. *Proceeding The North American Conference. Small Animal and Exotics.* Orlando, Florida. 665-666.

- Hampe J. F.; Misdorp W.** 1974. Tumours and dysplasias of the mammary gland. Bull WHO. 50:111-133.
- Harvey H. J.; Gilbertson S. R.** 1977. Canine mammary gland tumors. Vet Clin North Am. 7: 213-219.
- Hellmén E.** 1993. Canine mammary tumour cell lines established in vitro. J Reprod Fertil Suppl. 47: 489-499.
- Heppner G.H.** 1984 Tumor heterogeneity. Cancer Res. 44(6):2259-2265.
- Hermo G.; Torres P.; Ripoll G.; Gomez D.; Alonso D.; Gobello C.** 2006. Evaluation of perioperative desmopressin in dogs with spontaneous mammary gland tumors. 31st World Small Animal Veterinary Congreso WSAVA. Prague, Czech Republic. October 11-14, 2006. p 848. ISBN 978-80-902595-4-6.
- Hirano S.** (1997) In vitro and in vivo cytotoxic effects of nitric oxide on metastatic cells. Cancer Lett 115:57-62.
- Hirayama K.; Yokota H.; Onai R.; Kobayashi T.; Kumata T.; Kihara K.; Okamoto M.; Sako T.; Nakade T.; Izumisawa Y.; Taniyama H.** 2002 Detection of matrix metaloproteinases in canine mammary tumours: analysis by immunohistochemistry and zymography. J Comp Pathol. 127(4): 249-256.
- 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.
- Honn K.; Tang D.** 1992. Adhesion molecules and tumor cell interaction with endothelium and subendotelial matrix. Cancer Metas Rev. 11: 353-375.
- Horwitz K.B.** 1992. The molecular biology of RU486. Is there a role for antiprogestins in the treatment of breast cancer? Endocr Rev. 13(2):146-63.
- Inaba T, Umehara T, Mori J, Torii R, Tamada H, Sawada T.** (1996). Reversible suppression of pituitary-testicular function by a sustained-release formulation of a gnrh agonist (Leuprolide acetate) in dogs. Theriogenology 46(4):671-677.
- Johnston S. D.** 1980. False pregnancy in the bitch. En: Morrow DA, ed. Current Veterinary Theriogenology. Philadelphia: W.B. Saunders. 623-624.
- Jordan V. C.** 1998. Estrogenos de diseño. Investigación y ciencia. 16-24.
- Jubb K.W.; Kennedy P.C.** 1970. Pathology of Domestic Animals. 2nd Ed. Academic Press. Inc New York. USA. 344-348.
- Kanae Y, Endoh D, Yokota H, Taniyama H, Hayashi M.** 2006 Expression of the PTEN tumor suppressor gene in malignant mammary gland tumors of dogs. Am J Vet Res. 67(1):127-133.
- Kanwar S.; Woodman RC.; Poon M.C.; Murohara T.; Lefer A.M.; Davenpeck K.L.; Kubes P.** 1995. Desmopressin induces endothelial P-selectin expression and leukocyte rolling in postcapillary venules. Blood 86: 2760-2766.
- Kazanietz M.** 2000. Farmacología Molecular Receptores, transducción de señales y activación de genes. 45-66: 211-230.
- Keck T.; Banafsche R.; Werner J.; Gebhard M.M.; Herfarth C.; Klar E.** (2001). Desmopressin impairs microcirculation in donor pancreas and early graft function after experimental pancreas transplantation. Transplantation. 27;72(2):202-209.
- Kitchell G.N.** 1995. Mammary Tumors. In: Kirk's Current Veterinary Therapy XII. Small Animal Practice. Saunders, WB. Philadelphia. 1098- 1103.
- Kitchell, B.E.** 1995. Mammary tumors. En: Bonagura JD (ed). Kirk's current veterinary therapy xii. Philadelphia, WB Saunders. 1098-1102.
- Koenig A.; Bianco S.; Fosmire S.; Wojcieszyn J.; Modiano J.** 2002 Expression and significance of p53, rb, p21/waf-1, p16/ink-4a, and PTEN tumor suppressors in canine melanoma: Vet Pathol. 39(4):458-72.

- Kubo K.; Matsuyama S.; Katayama K.; Tsutsumi C.; Yonezawa K.; Shimada T.; Kotani T.; Sakuma S.; Ohashi F.; Takamori Y.** 1998. Frequent expression of the c-kit proto-oncogene in canine malignant mammary tumor. *J. Vet. Med.Sci.* 60: 1335-1340.
- Kurzman I. D.; Gilbertson S. R.** 1986. Prognostic factors in canine mammary tumors. *Semin Vet Med Surg* 1:25-31.
- Lee CH.; Kweon K.** 2002. Mutations of p53 tumor suppressor gene in spontaneous canine mammary tumors. *J Vet Sci.* 3(4):321- 325.
- Lee J.O.; Yang H.; Georgescu M.M.; Di Cristofano A.; Maehama T.; Shi Y.; Dixon J.E.; Pandolfi P.; Pavletich N.P.** 1999. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell.* 29:99(3):323-334.
- Loar A.S.** 1989. Tumors of the genital tract and mammary gland. En Ettinger SJ (ed):Text Book of Veterinary Internal Medicine.Vol. II 3rd ed. WB Saunders. Philadelphia. 1814-1925
- Lodish H., Berck A., Zipursky SL., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J.** 2002. *Biologia celular y molecular.* Ed. Panamericana. Buenos Aires. Argentina. 968-1002.
- Lombardi P.; Florio S.; Pagnini U.; Crispino A.; Avallone L.** 1999. Ovarian function suppression with a GnRH analogue: D-ser(But[t])[6]-Arzgly[10]-LHRH (Goserelin) in hormone dependent canine mammary cancer. *J Vet Pharmacol Ther.* 22(1):56-61.
- Mac Ewen E. G; Rosenthal R.C.** 1992 Aproximación de los pacientes cancerosos. En: Ettinger S. J. Tratado de medicina interna veterinaria. Intermédica Buenos Aires. Vol 1: 566-568.
- Mannucci P.M.; Vicente V.; Vianello L.; Cattaneo M.; Alberca I.; Coccato M.P.; Faioni E.; Mari D.** 1986. Controlled trial of desmopressin (DDAVP) in liver cirrosis and other conditions associated with prolonged bleeding time. *Blood* 67: 1148-1153.
- Mareel M, Leroy A.** 2003. 2003. Clinical, Cellular, and Molecular Aspects of Cancer Invasion. *Physiological Reviews*, Vol. 83, No. 2. 337-376.
- 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.
- Maudelonde, T.; Romieu, G.; Ulmann, A.; Pujol, H.; Grenier, J.; Khalaf, S.; Cavalie, G.; Rocheford, H.** 1987. First clinical trial on the use of the antiprogesterin ru486 in advanced breast cancer. En: Klijn JGM, Paridaens, R.; Foekens, J.A. (eds) hormonal manipulation of cancer peptides, growth factors and new anti-steroidal agents. Raven Press, New York, p 55.
- Mc Ewen E. G. Withrow S.J.** 1996. Tumors of the mammary glands. En: Withrow SJ, Mc Ewen EG eds, *Small Animal Clinical Oncology* 2nd ed, WB Saunders, Philadelphia. 356-372.
- Mc Guire W.L.** 1980. Un update on oestrogen and progesterone receptors for primary and advanced breast cancer. In: Iacobelli (eds). *Hormones and Cancer*, Raven press, New York. 337-344.
- Mc Guire W.L.; Clark G.M.** 1985 Role of progesterone receptors in breast cancer. *Semin Oncol.* 12:12-16.
- Mc Leod D.A.; Thrall D.A.** 1989. The combination of surgery and radiation in the treatment of cancer. *Vet Surg* 18 (1):1-6 .
- McRae G.I.; Roberts B.B.; Worden A.C.; Bajka A.; Vickery B.H.** 1985. Long-term reversible suppression of oestrus in bitches with nafarelin acetate, a potent LHRH agonist. *J Reprod Fertil.* 74(2):389-397.

- Michna, H.; Scheider, M.R.; Nishino, Y; El Etreby, M.F.** 1989. The antitumor mechanism of progesterone antagonist is a receptor mediated antiproliferative effect by induction of terminal cell death. *J Steroid Biochem* 34:447-453.
- Misdorp W, Else, RW, Hellmén E, Lipscomb TP.** 1990. Histological classification of mammary tumor of the dog and the cat. Vol VII. Armed Forces Institute of Pathology & American Registry of Pathology & the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology, Washington DC, USA. 58-59
- Misdorp W.** 1988. Canine Mammary Tumours: protective effect of late ovariectomy and stimulating effect of progestins. *Vet. Quart.* 10:26-33.
- Mol J. A.; Selman P.J.; Sprang E. P. M.** 1997. The role of progestins, insuline-like growth factor (IGF) and IGF-binding proteins in the normal and neoplastic mammary gland of the bitch: a review. *J Reprod Fertil Suppl.* 51: 339-344.
- Montecchia, M.F.; Molinolo, A.; Lanari, C.** 1999. Reversal of estrogen-resistance in murine mammary adenocarcinomas. *Breast Cancer Res Treat.* 54(2):93-99.
- Morris J.S.; Dabson J. M.; Bostock D. E.** 1993. Use of tamoxifen in control of canine mammary neoplasia. *Vet Rec* 133:539-542.
- Murakami Y.; Tateyama S.; Rungsipipat A.; Uchida K.; Yamaguchi R.** 2000 Immunohistochemical analysis of cyclin A, cyclin D1 and P53 in mammary tumors, squamous cell carcinomas and basal cell tumors of dogs and cats. *J Vet Med Sci.* 62(7):743-50.
- Murrel T.G.C.** 1991. Epidemiological and biochemical support for a theory on the cause and prevention of breast cancer. *Medical Hypotheses.* 36: 389-396.
- Murua Escobar H.; Becker K.; Bullerdiek J.; Nolte I.** 2001. The canine ERBB2 gene maps to a chromosome region frequently affected by aberrations in tumors of the dog (*Canis familiaris*). *Cytogenet Cell Genet.*94(3-4):194-195.
- Natali P.; Nicotra M.; Sures L.; Santoro E.; Bigotti A.; Ullrich A.** 1992. Expression of c-kit receptor in normal and transformed human non-lymphoid tissues. *Cancer Res.* 52:6139-6143.
- Nelson R. W.; Couto C. G.** 1995. *Pilares de Medicina Interna en Animales Pequeños.* Intermedica. Buenos Aires. Argentina. 622-624.
- Nerurkar V.R.; Sehadri R.; Mulherkar R.; Ishward C. S.; Lalitha V. S.; Naik S. N.** 1987. Receptors for epidermal growth factor and estradiol in canine mammary tumors. *Int J Cancer.* 40: 230-232.
- Nicolson G.L.** 1984 Tumor progression, oncogenes and the evolution of metastatic phenotypic diversity. *Clin Exp Metastasis.* 2(2):85-105.
- Nieto A.; Perez-Alenza M. D.; Del Castillo N.; Tabanera E.; Castano M.; Pena L.** 2003. BRCA1 expression in canine mammary dysplasias and tumours: relationship with prognostic variables. *J Comp Pathol.* 128(4):260-268.
- Ogilvie G. K. et al.** 1989. Phase 2 evaluation of doxorubicin for treatment of various canine neoplasms. *J Am Vet Med Assoc.* 195 (11):1580-1583.
- Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K, Inoue M, Tahara H, Kobayashi T, Takatsuka Y, Matsuyoshi N, Hirano S, Takeichi M, and Mori T.** 1993. Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Res* 53: 1696-1701.
- Okada H.; Nishuma Y.; Yoshino T.; Grone A.; Capen C. C.; Rosol T. J.** 1997. Immunohistochemical localization of parathyroid hormone related protein in canine mammary tumors. *Vet. Pathol.* 34: 356-359.
- Owen L. N.** 1966. Mammary neoplasia in the dog and cat. III. Prognosis and treatment of mammary tumours in the bitch. *J Small Anim Pract.* 7: 703-710.

- Papich M.G.** 2000. Table of common drugs: approximate dosages In: Bonagura JD (ed) Kirk's Current Veterinary Therapy XIII. Small Animal Practice. Saunders, WB. Philadelphia. 1241-1264.
- Papparella S.; Restucci B.; Paciello O.; Maiolino P.** 2002. Expression of matrix metalloprotease-2 (MMP-2) and the activator membrane type 1 (MT1-MMP) in canine mammary carcinomas. *J Comp Pathol.* May;126(4): 271-6.
- Parodi A.L.; Mialot J. P.; Martin P. M.** 1984. Canine and feline mammary cancers as animal models for hormone-dependent human breast tumors: relationships between steroid receptor profiles and survival rates. *Progress in Cancer Research and Therapy.* 31: 357-365.
- Perez Alenza M. D.; Peña L.; Del Castillo N.; Nieto A. I.** 2000. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *J Small Anim Pract.* 41: 287-291.
- Perez C.A.; Brady L. W.** 1987. Introduction. Perez CA and Brady LW (eds): Principles and Practice of Radiation Oncology. Philadelphia, JB Lippincott. 148-155.
- Philibert.** RU 46534 (1994) Affinité relative de liaison pour les récepteurs stéroïdiens - activité antiprogéstérone in vivo. Reporte de Studio Interno Roussel Uclaf.
- Rabinovich G.** (2004.) Inmunopatología Molecular Nuevas Fronteras de la Medicina. 1ed. Ed. Panamericana. Buenos Aires. Argentina.
- Radinsky R.; Ellis L.M.** 1996. Molecular determinants in the biology of liver metastasis. *Surg Oncol Clin N Am.* 5(2):215-29
- Restucci B, Papparella S, De Vico G, Maiolino P.** 1997. E cadherin expression in normal and neoplastic canine mammary gland. *J Comp Pathol.* 116(2):191-202.
- Restucci B.; Borzacchiello G; Maiolino P; Martano M; Paciello O; Papparella S.** 2004. Expression of vascular endothelial growth factor receptor Flk-1 in canine mammary tumours. *J Comp Pathol.* ;130(2-3):99-104.
- Restucci B.; Papparella S.; Maiolino P.; De Vico G.** 2002. Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. *Vet Pathol.* 39(4):488-93.
- Ripoll G.V.; Girón G.; Tejera A.M.; Gomez D.E.; Alonso D.F.** 2004. La desmopresina (DDAVP) modifica la producción de angiostatina y reduce la angiogénesis inducida por células tumorales mamarias. *Medicina (Buenos Aires)* 64 (Supl. 2): 364.
- Rocheford H.** 1992. Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer. *Acta oncologica* 31, 125-132.
- Rooney M.T.; Henry J. B.** 1993. Marcadores moleculares de las neoplasias malignas. Diagnostico y tratamiento clínicos. 9 ed. Masson-salva. Medicina. Barcelona. 293-315.
- Rosenberg S. A.** 2001 Principles of cancer management: Biological therapy. En DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds): Cancer: Principles and Practice of Oncology (ed 6). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 307-333.
- Rutteman G. R.** 1990. Hormones and mammary tumour disease in the female dog. An update. *In Vivo.* 4: 33-40.
- Rutteman G. R.** 1995. Mammary Tumors in the Dog. En: Kirk's Current Veterinary Therapy XII. Small Animal Practice. Saunders, WB. Philadelphia. 518- 522.
- Rutteman G. R; Bevers M. M.; Misdorp W.; Van den Brom W. E.** 1989. Anterior pituitary function in female dogs with mammary tumors II: Prolactin. *Anticancer Research.* 9: 241-246.
- Rutteman G. R; Misdorp W.; Blankenstein N. M. A; Van Den Brom W. E** 1988. Oestrogen and progestin receptors in mammary tissue of the female dog: different receptor profile in non-malignant and malignant states. *Breast Cancer Res.* 58: 594-599.

- Rutteman G.R.; Misdorp W.; Van den Brom W. E.; Rijnberk A.** 1989. Anterior pituitary function in female dogs with mammary tumors I: Growth hormone. *Antican. Res.* 9: 235-240.
- Sarli G; Preziosi R; De Tolla L; Brunetti B; Benazzi C.** 2004. E-cadherin immunoreactivity in canine mammary tumors. *J Vet Diagn Invest.* 16(6):542-7.
- Selman P; Mol J; Rutteman G; Rijnberk A.** 1994. Progestin treatment in the dog. I. Effects on growth hormone, insulin-like growth factor I and glucose homeostasis. *Eur. J. Endocrinol.* 131: 413-421.
- Schneider, M.R.; Michna, H.; Habenicht, U.F.; Nishino, Y.; Grill H.J.; Pollow, K.** 1992. The tumour-inhibiting potential of the progesterone antagonist onapristone in the human mammary carcinoma t61 in nude mice. *J Cancer Res Clin Oncol.* 118 (3):187-189.
- Schneider, M.R.; Michna, H.; Nishino, E.L.; Etreby, M.F.** 1990. Antitumor activity and mechanism of action of different antiprogestins in experimental breast cancer models. *J Steroid Bioch Mol Biol.* 20; 37 (6): 783-787.
- Selman P.; Mol J.; Rutteman G.; Rijnberk A.** 1994. Progestin treatment in the dog. II. Effects on the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Eur J Endocrinol.* 131(4):422-430. Department of Clinical Sciences of Companion Animals, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, The Netherlands.
- Selman P.; Mol J.; Rutteman G.; van Garderen E.; Rijnberk, A.** 1994 Progestin-induced growth hormone excess in the dog originates in the mammary gland. *Endocrinology.* 134(1):287-292.
- Sfacteria A.; Bertani C.; Costantino G.; Del Bue M.; Paiardini M.; Cervasi B.; Piedimonte A.; De Vico G.** 2003 Cyclin D1 expression in pre-cancerous and cancerous lesions of the canine mammary gland. *J Comp Pathol.* 128(4):245-251.
- Schneider R.; Dorn C.R.; Taylor D.O.** 1969. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J Natl Cancer Inst.* 43(6):1249-1261.
- Shofer E. S.** 1989. Histopathologic and dietary prognosis factors for canine mammary carcinoma. *Breast Cancer Res. Treat.* 13(1): 49-60.
- Sonnenschein E. G.; Glickman L. T.; Goldschmidt M. H.; McKee L. J.** 1991. Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study. *J Am Epidem.* 133: 694-703.
- Sorenmo K. U.; 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.
- Sugarbaker E.V.** 1979. Cancer metastasis: a product of tumor-host interaction. *Curr Prob Cancer* 3:1.
- Theilen G. H y Madewell B. R.** 1987. *Veterinary Cancer Medicine.* 2nd. Ed. Gordon Theilen y Bruce Madewell. Philadelphia USA 392-407.
- Trigg TE, Wright PJ, Armour AF, Williamson PE, Junaidi A, Martin GB, Doyle AG, Walsh J.** (2001). Use of a GnRH analogue implant to produce reversible long-term suppression of reproductive function in male and female domestic dogs. *J Reprod Fertil Suppl.* 57:255-261.
- Tsuchida S.; Ikemoto S.; Tagawa M.** 2001. Microsatellite polymorphism in intron 14 of the canine BRCA1 gene. *J Vet Med Sci.* 63(4):479-481.
- Van Garderen E. De Wit M; Voorhout W.F.; Rutteman G.R.; Mol J.A.; Nederbragt H.; Misdorp W.** 1997. Expression of growth hormone in canine mammary tissue and mammary tumors: evidence for a potential autocrine/paracrine stimulatory loop. *J. Am Pathol.* 150: 1037-1047.
- Vanzulli, S.I.; Soldati, R.; Meiss, R.; Colombo, L.; Molinolo, A.A.; Lanari C.** 2005. Estrogen or antiprogestin treatment induces complete regression of pulmonary and

axillary metastases in an experimental model of breast cancer progression.

Carcinogenesis 26(6):1055-1063.

Veldhoen N.; Watterson J.; Brash M.; Milner J. 1999. Identification of tumour-associated and germ line p53 mutations in canine mammary cancer. *Br J Cancer*. 81(3):409-15.

Vickery B.H.; McRae G.I.; Goodpasture J.C.; Sanders L.M. (1989). Use of potent LHRH analogues for chronic contraception and pregnancy termination in dogs. *J Reprod Fertil Suppl.*39:175-187.

Wakui S.; Muto T.; Yokoo K.; Yokoo R.; Takahashi H.; Masaoka T.; Hano H.; Furusato M. 2001. Prognostic status of p53 gene mutation in canine mammary carcinoma. *Anticancer Res*. 21(1B):611-6.

Weir E.C.; Burtis W. J.; Morris C. A. Insogna K. L. 1998. Isolation of a 16.000-dalton parathyroid hormone-like protein from two animal tumors causing hormonal hypercalcemia of malignancy. *Endocrinology* 123(6):2744-2751.

Weiss L. 1990. Metastatic inefficiency. *Adv Cancer Res* 54:159-211.

Wilkinson G. T. 1971. The treatment of mammary tumors in the bitch and a comparison with the cat. *Vet Rec* 29: 13-19.

Withrow S. J. 1975. Surgical management of canine mammary tumors. *Vet. Clin. North Am.* 5(3):495- 506.

Yamada K.; Nakayama M.; Nakano H.; Mimura N.; Yoshida S. (1993).

Endothelium-dependent vasorelaxation evoked by desmopressin and involvement of nitric oxide in rat aorta. *Am J Physiol.* 264(2 Pt 1):E203-207.

Yamagami T.; Kobayashi T.; Takahashi K.; Sugiyama M. 1996. Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. *J Vet Med Sci.* 1996 Nov;58(11):1079-1083.

Yokota H.; Kumata T.; Taketaba S.; Kobayashi T.; Moue H.; Taniyama H.; Hirayama K.; Kagawa Y.; Itoh N.; Fujita O.; Nakade T.; Yuasa A. 2001. High expression of 92 kDa type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) in canine mammary adenocarcinoma. *Biochim Biophys Acta.* 7;1568(1):7-12.