

ESTUDIO DE TERAPIAS ADYUVANTES CON ANTIPROGESTÁGENOS Y AGENTES ANTIMETASTÁSICOS EN NEOPLASIAS MAMARIAS CANINAS

Palabras clave: antiprogéstágenos – metástasis – aglepristona – desmopresina – tumores mamarios caninos

RESUMEN

El cáncer mamario es una frecuente enfermedad canina cuyos estadios clínicos avanzados no pueden ser satisfactoriamente controlados únicamente con cirugía. Esto hace necesaria la búsqueda de nuevas terapias adyuvantes en la especie. El presente Trabajo de Tesis se desarrolló en cuatro objetivos específicos que fueron realizados en un total de 110 hembras caninas con neoplasias mamarias malignas en distintos estadios clínicos. El primer objetivo fue poner a punto la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) y estudiar la expresión de los receptores de progesterona (RP) y estrógenos (RE). El segundo y tercer objetivos fueron describir la expresión de las isoformas del RP y evaluar el efecto de un antiprogéstágeno, el aglepristone, sobre el tiempo de sobrevida libre de enfermedad (SLE) y sobrevida general (SG) en los pacientes. Como cuarto objetivo, se describió la acción de un análogo sintético de la vasopresina, la desmopresina (DDAVP), en relación al grado histológico en la SLE y SG de las hembras. Para los tres últimos objetivos se trabajó con un diseño longitudinal, aleatorizado y con grupo control. A los datos obtenidos se les aplicó una estadística descriptiva y pruebas de Kaplan-Meier. La técnica de IHQ, con los anticuerpos MC-20, Y-19, Ab-6 y Ab-7, resultó de utilidad para la determinación de RE y RP así como también para

sus diferentes isoformas en esta especie. Un hallazgo alentador fue el alto porcentaje de expresión de RP en estas neoplasias malignas, no obstante con el número de animales aquí utilizado no fue posible dilucidar si el aglepristone tuvo un efecto benéfico. También se reconfirmó el efecto beneficioso de la DDAVP sobre la SLE y SG, y su relación con el grado histológico del carcinoma mamario. Estos resultados alientan, indefectiblemente, a su corroboración en un mayor número de animales como así también a la continuación de estudios terapéuticos orientados a estos blancos moleculares.

STUDY OF ADJUVANT THERAPY WITH ANTIPROGESTINS AND ANTIMETASTATIC AGENTS IN CANINE MAMMARY TUMORS

Key words: antiprogestins – metastasis - aglepristone – desmopressin - canine mammary tumors

ABSTRACT

In the domestic dog, mammary cancer is a highly prevalent disease. As its advanced stages can not be completely managed by surgical excision, the improvement of adjuvant therapies is required in this species. This Thesis included four specific objectives that were carried out in 110 female dogs suffering from different clinical stages of malignant mammary neoplasia. The first objective was to refine the immunohistochemistry (IHC) technique and to describe the expression of progesterone (PR) and estrogen (ER) receptors. The second and third objectives were to study PR isoforms and to evaluate the effect of the antiprogesterin, aglepristone, on disease free (DF) and overall survival (OS) of patients. The fourth objective was to describe the effect of a synthetic analogue of the vasopressin, desmopressin (DDAVP), on DF and OS in relation to the histological grade of the tumors. In the three later objectives a longitudinal randomized controlled design was used. Obtained data were analyzed using descriptive statistics and Kaplan-Meier tests. The IHC, using MC-20, Y-19, Ab-6 and Ab-7 antibodies, was found useful for PR, ER and their isoforms determinations in these bitches. Regardless, the rewarding finding of a high PR percentage in these malignant tumors, the effect of aglepristone could not be described in this group of animals. The beneficial effect of

DDAVP on DF and OS was re-confirmed and its relationship with the tumor histological grade was shown. These results warrant corroboration on a larger number of animals as well as further therapeutic studies focused on these molecular targets.

INTRODUCCIÓN

Los tumores de glándula mamaria son la neoplasia de más frecuente presentación en perras, representando el 42 % de todos los tumores y el 82 % de los provenientes del aparato reproductivo femenino (1,2). Existe escasa información con respecto a la prevalencia de las neoplasias de glándula mamaria en caninos. Estudios comúnmente citados reportan una prevalencia de 145 a 205 cada 100.000 animales/año (3,4). Más recientemente se ha publicado una prevalencia mucho más alta, de 111 cada 10.000 animales/año (5).

Son varios los genes y proteínas codificadas por éstos, involucrados en el desarrollo y progresión de las neoplasias mamarias en esta especie. Algunos/as de los más importantes en los cuales su desregulación influye en esta enfermedad, son: hormona del crecimiento (6-10), factor tipo insulínico I y la proteína relacionada a la hormona paratiroidea (11-13), factores de crecimiento transformante (14-16), alteración de genes que regulan los mecanismos de detoxificación celular como BRCA 1 (*breast cancer-1*) (17-18), oncogenes tales como c-erb (19-21); c-kit (22) y c-myc (23-24), genes supresores de tumor como p53 (24-30) y PTEN (31-32).

A pesar de la etiología multifactorial, las hormonas por intermedio de sus receptores hormonales (RH), principalmente el receptor de estrógeno (RE) y el receptor de progesterona (RP) juegan un papel fundamental en esta frecuente enfermedad que afecta a los caninos. Algunas de las evidencias más fuertes que postulan su acción son las siguientes:

-La ovariectomía temprana es preventiva, 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 (33-34). La ovariectomía temprana es una firme protección contra el desarrollo de tumores mamarios, el riesgo de desarrollar un tumor mamario a lo largo de toda la vida de una perra 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 (35).

-La influencia de la ovariectomía en la evolución de los tumores mamarios existentes es punto de controversia. Así, en uno de los trabajos iniciales, se demuestra que el riesgo de tumores benignos se reduce con ovariectomía aun en edades avanzadas (36).

En un estudio retrospectivo en 145 animales con carcinomas mamarios malignos se observó que las perras castradas dentro de los 2 años de desarrollado el tumor mostraban una mayor supervivencia con respecto a las no castradas o a las castradas luego de los 2 años del diagnóstico del tumor (37). En cambio, otros trabajos no han evidenciado beneficio alguno por efecto de la castración (35, 38).

-En la última década, utilizando métodos bioquímicos, varios estudios han revelado la presencia de RE y RP en tumores mamarios. Estos resultados indican un papel importante de las hormonas sexuales en el desarrollo de estos tumores. Los RE y RP están expresados en más del 50 % de las neoplasias malignas (39-45).

-El desarrollo normal de la mama requiere la acción de RE, PR y factores de crecimiento. La vía estrogénica estimula la elongación ductal mientras que la vía mediada por progestágenos induce el desarrollo de las bifurcaciones ductales y alveogénesis mamaria (46-47). Así, vías

de señalización involucradas en el crecimiento y desarrollo normal de la glándula mamaria, podrían ser reactivadas durante la progresión del cáncer mamario (48).

-La prolongada administración de estrógenos no ha mostrado un incremento de la incidencia de tumores mamarios en caninos. En cambio, la administración de progestágenos se asocia con incremento en la aparición de tumores mamarios benignos en la perra (15,43,49-57).

-Son varias las vías de señalización celular involucradas en el desarrollo y progresión tumoral, mediadas por progestinas y el RP (58-61).

-La progesterona, por intermedio de sus receptores, tiene efectos proliferativos y carcinogénicos sobre la mama (62).

-La progesterona a través de la vía de la isoforma A de RP (RP-A), tienen una acción claramente inhibitoria sobre el crecimiento celular en el útero; pero juega un rol proliferativo a través de la vía de la isoforma B de RP (RP-B) en el desarrollo de la mama (63).

-Recientemente se ha observado, que las progestinas también podrían inducir poblaciones celulares pre-cancerosas o estimular a stem cell durmientes a la reintroducción inapropiada del ciclo de división celular, para dirigir las hacia una fase proliferativa. Puntualmente, se ha visto que una progestina sintética, como el acetato de medroxiprogesterona, interactuaría con receptores androgénicos, y podría alterar endocrinológicamente el sistema de transducción de señales, las cuales desarrollan un efecto protector en la mama normal (64).

El diagnóstico clínico de las neoplasias mamarias se basa en la anamnesis y el examen físico completo. La anamnesis, debe incluir datos sobre raza, edad, castración, administración de hormonas sexuales, fecha de aparición del tumor y ritmo de crecimiento. En el examen físico se debe identificar la localización y tamaño de cada tumor, las adherencias a planos profundos y/o piel y el estado de los linfonódulos regionales.

Los métodos diagnósticos complementarios permiten definir el estadio de la neoplasia. La radiología es un método de utilidad y aplicación en veterinaria en pacientes oncológicos para la detección de metástasis pulmonares las cuales pueden no dar signología (65,66). En condiciones prácticas la resonancia magnética nuclear y la tomografía axial computada o tomografía por emisión de positrones, generalmente no son posibles de ser realizadas.

El examen citológico de muestras obtenidas mediante aspiración por aguja fina del tumor suele rendir resultados ambiguos (67,68). Por otra parte, la biopsia escisional es el método de elección para confirmar el diagnóstico. Con la información aportada por los exámenes clínico y complementarios es posible estratificar al paciente y así instaurar el tratamiento más apropiado (69; **Tabla 1**).

Tabla 1: Sistema de estadios clínicos de neoplasias malignas de glándula mamaria (70).

ESTADIO	TUMOR PRIMARIO (T)	ESTADO DEL LINFONODULO REGIONAL (N)	METASTASIS A DISTANCIA (M)
I	Diámetro menor a 2,9 cm.	No afectado	No hay evidencia de metástasis a distancia detectada
II	Diámetro entre 3 a 4,9 cm.	No afectado	No hay evidencia de metástasis a distancia detectada
III	Diámetro mayor a 5 cm.	No afectado	No hay evidencia de metástasis a distancia detectada
IV	Cualquier T	Metástasis diagnosticada por histopatología	No hay evidencia de metástasis a distancia detectada
V	Cualquier T	Cualquier N	Metástasis a distancia detectada

Se ha postulado, también, que el cáncer de mama presenta distintos momentos evolutivos (71-76) con un incremento progresivo de la agresividad clínica asociada a diferentes patrones histológicos. Así se describen lesiones preneoplásicas, y lesiones invasivas hormono-dependientes y hormono-independientes. En la clínica, se predice el grado de dependencia hormonal evaluando la presencia de receptores hormonales. Los receptores nucleares participan en diversos procesos biológicos, como diferenciación, crecimiento y homeostasis

celular. Cuando se trata de proliferación celular los RE y los RP están directamente involucrados, y la integridad funcional de los mismos es fundamental para la multiplicación, crecimiento y diferenciación normal de las células de los tejidos sensibles a la hormona. La transformación celular y consecuentemente la adquisición del fenotipo neoplásico (incluyendo inmortalidad, alteraciones nucleares y citoplasmáticas, crecimiento descontrolado) puede deberse a causas varias, de las cuales muchas son debidas a la desregulación hormonal.

Existen ciertos factores para la evaluación del pronóstico de la enfermedad neoplásica. Estos permiten predecir la aparición de recidivas y/o metástasis tumorales y así estimar la sobrevida libre de enfermedad (SLE) y la sobrevida general (SG). La SLE es el período entre el tratamiento quirúrgico del tumor y la aparición de recidivas local, regional y/o metástasis. La SG muestra el tiempo entre la extirpación de la masa tumoral y la muerte del animal por la neoplasia u otras causas.

Los factores pronóstico de las neoplasias mamarias pueden ser clínicos y/o histológicos. Los primeros involucran la edad del animal, localización y número de tumores, estadio clínico, ritmo de crecimiento, presencia de ulceración entre los más importantes (77). Los factores histológicos incluyen el tipo (38,78), patrón (34,73) y grado histológico (79-82).

La cirugía es el método de elección y más ampliamente usado para las neoplasias mamarias caninas, salvo en presencia de enfermedad metastásica, carcinoma inflamatorio o mal estado general del animal. Las técnicas incluyen nodulectomía, mastectomía, mastectomía en bloque, mastectomía radical uni o bilaterales (83-85).

Las drogas quimioterápicas pueden ser indicadas para tratar metástasis establecidas, tumores primarios infiltrados o como adyuvante o neo-adyuvante a la cirugía. Existen diversos protocolos quimioterápicos disponibles a evaluar para cada caso en particular. Las drogas más utilizadas son doxorubicina (86-88); ciclofosfamida junto con 5-fluorouracilo (89) y mitoxantrona (90).

La utilización de antiestrógenos como el tamoxifeno, como adyuvantes está altamente restringida en la especie, debido a que ejerce efectos agonistas (91,92). Los agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), usados a dosis sostenidas en el tiempo inhiben reversiblemente el eje gonadal, luego de un período de estimulación inicial que a veces puede resultar perjudicial (93).

La radioterapia también puede emplearse como terapia adyuvante posquirúrgica o en el tratamiento de tumores inoperables o en metástasis óseas (94). No obstante, no existen muchos reportes referidos a su eficacia en el tratamiento de tumores mamarios. La inmunoterapia es de eficacia controversial (70,95), aunque se han descrito algunos resultados alentadores debido a la reducción de la masa tumoral luego de este tipo de terapias (96). Una teoría publicada en 1989 (97) y citada en varios textos (98) sugiere que el consumo de una dieta hiperproteica e hipograsa en perras con cáncer mamario puede prolongar su tiempo de sobrevida.

Actualmente las estrategias terapéuticas de las neoplasias mamarias están orientadas a buscar tratamientos no tóxicos dirigidos a blancos moleculares específicos que permitan al animal convivir con la enfermedad por un tiempo prolongado. Estas nuevas terapias, en conjunción

con los métodos convencionales constituyen las prácticas más prometedoras para los próximos años de la oncología veterinaria.

Lo anteriormente expuesto hace necesaria la búsqueda de nuevas terapias adyuvantes en la especie (objetivo general). El presente Trabajo de Tesis incluyó cuatro objetivos específicos. El primer objetivo fue poner a punto la técnica de inmunohistoquímica y estudiar la expresión de los RP y el RE. En el segundo y tercer objetivo fueron describir la expresión de las isoformas del RP y evaluar el efecto de un antiprogestágeno, el aglepristone, sobre el tiempo de SLE y SG en los pacientes. Como cuarto objetivo, se describió la acción de un análogo sintético de la vasopresina, la desmopresina (DDAVP), en relación al grado histológico en la SLE y SG de las hembras.

Objetivo específico I

Poner a punto la técnica para la determinación de receptores de estrógeno alfa (RE- α) y beta (RE- β) y de progesterona (RP) en tumores mamarios caninos.

Hipótesis

La técnica de inmunohistoquímica es de utilidad para la determinación de RE y RP en tumores mamarios de la hembra canina.

Las coloraciones especiales, y en particular las técnicas inmunohistoquímicas, introducen datos auxiliares que complementan y enriquecen las observaciones morfohistológicas. La técnica de inmunohistoquímica descrita por Walker y col., (1998) y Mote y col., (2001) es de utilidad para la determinación de RE y RP en tumores mamarios de la hembra canina (41,99-105).

Existe bastante controversia con respecto al porcentaje de RE y RP en tumores malignos caninos debido, muy probablemente, a la falta de uniformidad en criterios de inclusión de los casos. Así, para el caso RE- α algunos estudios demuestran que el porcentaje tumores que los expresan es alto (41,105,106), medio (107,104) o bajo (101,108). Para los RE- β también se encuentran datos dispares (101-102). Particularmente, para los RP algunos autores hallaron una elevada expresión (109), y otros lo contrario (104,105).

Existen trabajos sobre la aplicación de técnicas inmunohistoquímicas para la identificación de receptores en tumores mamarios caninos malignos y benignos en forma conjunta (41,104); malignos y benignos en forma separada (41,102,104,105,109) y otros que abordan únicamente los malignos (110). No obstante, desconocemos la existencia de algún reporte en el que se describa la presencia de receptores en cada uno de los estadios clínicos (70) del paciente. El conocimiento de la expresión de receptores en los distintos estadios clínicos aportará, indudablemente, un verdadero valor pronóstico y servirá para el desarrollo de nuevas drogas que se traduciría en una mejoría clínica de los animales.

Conociendo que el comportamiento biológico de una neoplasia varía con el estadio clínico del paciente, resultó interesante estudiar la expresión de los receptores en cada uno de los estadios clínicos en animales con neoplasias mamarias malignas. Adicionalmente, este objetivo

incluye la puesta a punto la de técnica de inmunohistoquímica para la determinación de receptores hormonales en la especie.

Objetivo específico II

Evaluar el efecto del antiprogéstágeno, aglepristone, sobre el tiempo de SLE y SG en perras con tumores mamarios en estadios clínicos III tratadas quirúrgicamente en relación a la presencia o no al RP en el tejido neoplásico.

Hipótesis

El aglepristone aumenta el tiempo de SLE y SG en perras con tumores mamarios en estadio clínico III tratadas quirúrgicamente, sean o no positivas a RP.

Los esteroides sexuales han sido asociados, durante años, a agentes causales del cáncer mamario (111). El RP ha sido extensamente estudiado en tumores mamarios malignos humanos; el estatus positivo respecto a RP se correlaciona en general con un pronóstico favorable y es utilizado para identificar pacientes que podrían beneficiarse con una terapia hormonal (112).

Han sido descritas 2 isoformas de RP, la B (RP-B) y la A (RP-A) con un peso molecular de 114-120 y 94 kDa, respectivamente (113). Es sabido que la diferente distribución de las

isoformas de RP, podría tener implicancias en el tratamiento con antiprogestágenos (114). El RP-A puede inhibir predominantemente al RP-B y a otros miembros de la familia de los receptores esteroides (115), como así regular genes involucrados en el cáncer de mama o en el desarrollo normal de la glándula mamaria (116). Por su parte, la elevada expresión de RP-B esta asociada con neoplasias altamente malignas de órganos reproductivos (117). El uso de diferentes anticuerpos en técnicas inmunohistoquímicas permite evidenciar la expresión de las distintas isoformas. Así, el anticuerpo C-20 reacciona con ambas isoformas del RP (118), el Ab-7 lo hace con la isoforma A (119) y el Ab-6 con la B (119).

Los competidores de los receptores de progesterona como el onapristone (ZK 98.299) y el mifepristone (RU 486) y el ZK 112.993 demostraron ser potentes inhibidores de los tumores mamarios y sus metástasis en roedores (120-122) y en líneas celulares humanas (123). Trabajos con estas drogas evidenciaron estabilización de la enfermedad en estas especies (124-127).

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 de progesterona con una tasa de fijación tres veces mayor a la de la hormona endógena sin tener actividad antigluocorticoide (128). No se encuentran disponibles datos sobre farmacocinética, biodisponibilidad y dosis letal en caninos domésticos. Las dosis y esquemas de tratamiento de las drogas utilizadas en esta tesis se basaron en citas bibliograficas (128-134) y datos del laboratorio (128).

Por lo anteriormente expuesto, resulta de interés, describir la expresión de los RP con anticuerpos de distinta especificidad hacia las isoformas A y B en perras con tumores mamarios en estadios clínicos avanzados. También, evaluar el efecto del aglepristone, sobre las SL y SG, en relación a la expresión de las distintas isoformas de RP en esta misma categoría de pacientes tratadas quirúrgicamente.

Objetivo específico III

Probar el efecto del antiprogéstágeno, aglepristone, sobre la regresión tumoral y la SG en perras con tumores mamarios en estadio clínico V.

Hipótesis

El aglepristone produce regresión tumoral y aumento de la SG en perras con tumores de mama en estadio clínico V.

Las metástasis pulmonares de tumores mamarios son, generalmente, la causa de muerte en las mascotas que padecen una NGM. Esto marca la importancia de la búsqueda de nuevos tratamientos, enfocados a la modulación de blancos moleculares, con una acción predominante en la estabilización o regresión de la enfermedad metastásica. Existe una tendencia creciente hacia la incorporación de nuevos compuestos selectivos combinados a los tratamientos convencionales con el objetivo de incrementar la SG.

No existe unanimidad, ni información, respecto al tratamiento a realizar en perras con metástasis de NGM, por lo que en condiciones prácticas, generalmente, no se realiza tratamiento alguno. Como se mencionó anteriormente, la presencia de RH es ampliamente conocida en NGM primarias caninas (41, 101-110), no obstante, no existe información de la presencia RH en las metástasis de esta especie.

Los competidores de los 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 (120-122) y en líneas celulares humanas (120). 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 (124). Otros autores también evidenciaron estabilización de la enfermedad en la mujer (124-127). No existen, en la hembra canina, estudios similares usando antiprogestágenos por lo que el objetivo del presente ensayo clínico piloto fué evaluar el efecto del antiprogestágeno, aglepristone, sobre la regresión tumoral y la SG, en perras con tumores mamarios en estadio V.

Objetivo específico IV

Describir el efecto de DDAVP en el tiempo de SLE y SG en perras con tumores mamarios en estadios III o IV y con diferentes grados histológicos de malignidad, tratadas quirúrgicamente.

Hipótesis

La DDAVP aumenta el tiempo de SLE y SG en perras con tumores mamarios estadios III y IV y con diferentes grados histológicos de malignidad, tratadas quirúrgicamente.

El tratamiento de elección para las NGM es la escisión quirúrgica, aunque la cirugía sola no ofrece una cura definitiva en los estadios clínicos avanzados o neoplasias agresivas. El efecto de la quimioterapia postoperatoria es actualmente incierto en el cáncer de mama canino, y su efecto sobre la supervivencia no ha sido documentada claramente (89,135-137).

Los candidatos para la terapia adyuvante son animales con NGM localmente avanzadas, incluidos los tumores primarios de más de 5 cm de diámetro máximo sin compromiso ganglionar (estadio clínico III), y tumores de cualquier tamaño con afectación ganglionar (estadio clínico IV) (70). Los animales con cánceres agresivos, diagnosticados por un alto grado histológico, son también buenos candidatos para tratamiento adyuvante. En este sentido, la clasificación histológica de carcinomas mamarios caninos está estrechamente relacionada con el pronóstico, y su uso sistemático parece ser útil para sugerir una adecuada terapia adyuvante (80).

Previamente, en un estudio piloto hemos demostrado, que la desmopresina (1-deamino-8-D-arginina vasopresina, DDAVP) puede prolongar la supervivencia en perras con cáncer mamario cuando se administra en forma perioperatoria durante la extirpación quirúrgica del tumor primario (138). Anteriormente, también se demostró que DDAVP puede inhibir las

metástasis a los ganglios linfáticos y al pulmón, en un modelo murino de cáncer de mama (139,140). La DDAVP, es un péptido sintético con propiedades hemostáticas que se ha utilizado en seres humanos y en caninos con diabetes insípida y enfermedad de von Willebrand, principalmente (133,134,141). La DDAVP es un agente hemostático seguro y eficaz, para su uso durante la cirugía en pacientes con trastornos hemorrágicos. Este compuesto aumenta los niveles plasmáticos de factor VIII de la coagulación, factor de von Willebrand (FVW) y del activador del plasminógeno tisular (142,143).

Teniendo en cuenta las propiedades antimetastáticas de DDAVP sobre NGM caninas, en nuestro anterior estudio piloto, y sus bien conocidos efectos sobre la hemostasia, este compuesto podría ser un excelente candidato como adyuvante durante la intervención quirúrgica, en cánceres mamarios agresivos en pequeños animales. El objetivo del presente capítulo, fue estudiar el efecto de DDAVP perioperatoria y su relación con el grado histológico de los tumores en perras con carcinomas mamarios localmente agresivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Objetivo I

Animales

El estudio se realizó en una población de 51 perras mestizas y de raza, de 8 y 15 años y de 5 a 40 kilos, enteras que fueron atendidas durante los años 2005 y 2008 (**Fotografías 1-3**) con neoplasias mamarias malignas (biopsia diferida) en estadios I, II, III o IV (70).



Fotografía 1: Tumor de mama único de 16 cm de diámetro, estadio clínico III, antes de la mastectomía.



Fotografía 2: Tumor de mama único de 13 cm de diámetro, estadio clínico VI, antes de la mastectomía.



Fotografía 3: Tumores de mama múltiples en estadio clínico III, antes de la mastectomía. El tumor de mayor tamaño presentaba de 7 cm de diámetro.

Mastectomía

Las perras se premedicaron con sulfato de atropina (0,045 mg/kg sc), maleato de acepromazina (0,03mg/kg sc) y butorfanol 0,2 mg/kg, im). La anestesia se indujo con tiopental sódico (8 mg/kg, iv) en todos los animales. Luego de la intubación endotraqueal, la anestesia se mantuvo con halotano y oxígeno, por medio de un circuito cerrado. Los tumores

fueron escindidos quirúrgicamente mediante mastectomía de las glándulas afectadas. También se eliminaron las mamas ipsilaterales craneal y caudal respecto a la mama afectada. Los ganglios linfáticos fueron escindidos cuando a la palpación denotaban adenomegalia (85, 144).

Estudio histopatológico

En cada hembra se eligió un fragmento representativo del tumor. Se fijó en formol al 10 % en buffer fosfato salino (PBS), luego se embebió en parafina, seccionó cada 5 μm y tiñó con hematoxilina y eosina utilizando los procedimientos de rutina. En los casos que los animales portaban tumores múltiples, fue registrada la lesión con mayor grado de malignidad. La graduación histológica fue realizada de acuerdo al método de Nottingham (11,17,79,80,82, 89,145-146). El diagnóstico histopatológico se realizó de acuerdo a la clasificación histopatológica de Misdorp (78).

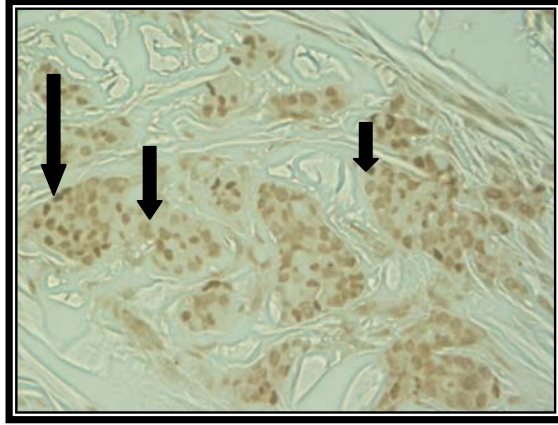
Determinación de receptores hormonales

Para la determinación de receptores hormonales, se analizó la muestra con mayores características histológicas de malignidad de cada animal. Como controles positivos se utilizaron cortes histológicos de glándula mamaria canina, ovario, útero y placenta. Se desparafinaron los tejidos dejando las secciones histológicas por 30 minutos en xilol. La hidratación del tejido se realizó por pasajes sucesivos en alcoholes de graduación decreciente, 100° (dos pasajes), 96°, 80°, 50°, 40°. Luego se lavaron 3 veces en agua destilada. La actividad de la peroxidasa endógena fue inhibida con solución de peróxido de hidrógeno/agua al 10% por 20 minutos. Luego se lavaron nuevamente 3 veces con PBS. El bloqueo de la adherencia inespecífica se realizó mediante la incubación con suero fetal bovino al 10% en

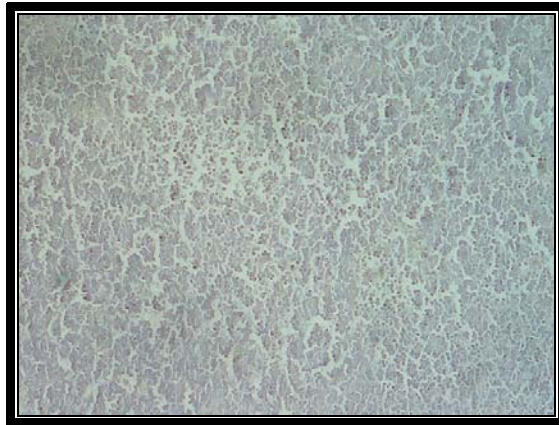
PBS durante 60 minutos. La incubación se realizó a temperatura ambiente y en cámara húmeda a 4°C (Tropical FVG 12 P, Eslabón de Lujo, Whirlpool, Argentina). Luego se incubó con el anticuerpo primario correspondiente en cada caso, a una dilución 1/100 (MC-20, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz CA., USA. para RE alfa; Y-19, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz CA., USA. para RE beta; C-20 Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz CA., USA). Tras 24 horas de incubación, se realizaron tres lavados con PBS. Se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente, diluido 1/100 durante 1 hora a temperatura ambiente (Anti-rabbit BA-1000, Vector Laboratorios, INC., Bullingame, CA, USA para MC-20 y C-20; anti-goat 81-1640, Zymed, San Francisco, CA, USA para Y-19). A los controles negativos se los incubó con PBS. Se lavó nuevamente 3 veces con PBS. Se incubó con el complejo avidina biotina conjugado a peroxidasa durante 30 minutos en cámara húmeda y a temperatura ambiente (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratorios, INC., Bullingame, CA, USA). Se realizaron luego los últimos 3 lavados con PBS. Para el revelado se utilizó una solución de 3-3'diaminobencidina (DAB 1mg/mL) y peróxido de hidrógeno, bajo control microscópico.

El contraste de los preparados se realizó con hematoxilina al 50%. Para la coloración se utilizó un tiempo estándar de 20 segundos aproximadamente, y luego la hematoxilina fue virada en agua corriente. La deshidratación de los tejidos, para su posterior montaje, se realizó con pasajes por alcoholes crecientes y xilol. Para el montado de las secciones se utilizó bálsamo de Canadá. Se contaron de 8 a 10 campos representativos a 100. Se calculó el porcentaje contando los núcleos positivos (marrones) y negativos de aproximadamente mil células neoplásicas. La valoración de la marcación nuclear de RE y RP, fue solamente restringida a las células tumorales epiteliales, pero no a las mioepiteliales o mesenquimáticas.

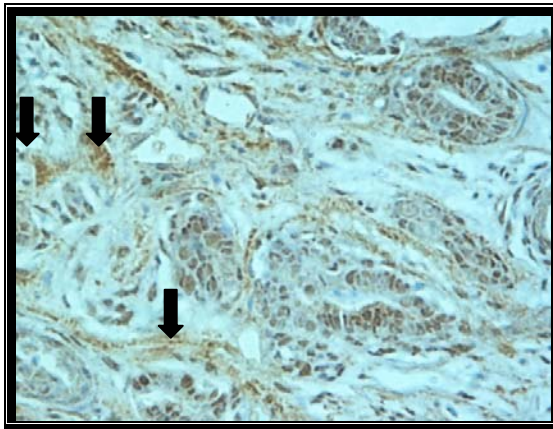
Se consideró positivo todo corte con $> 20\%$ para cada uno de los receptores (**Fotografías 4-11**).



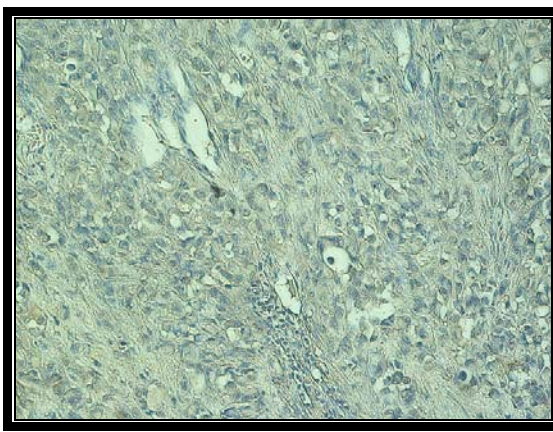
Fotografía 4: Tinción inmunohistoquímica de una muestra positiva de un tumor mamario maligno con anticuerpo MC-20 (RE- α). Flecha pequeña: tinción nuclear débil, flecha mediana: tinción nuclear moderada, flecha grande: muestra un grupo de 5-6 células con tinción nuclear fuerte (20 x).



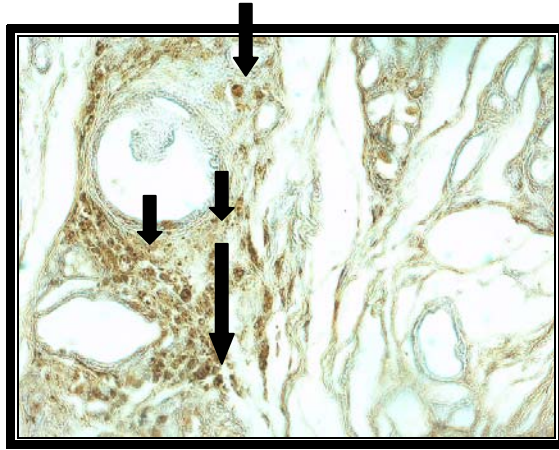
Fotografía 5: Tinción inmunohistoquímica de una muestra de un tumor mamario maligno con anticuerpo MC-20 (RE- α) usado como control negativo (20 x).



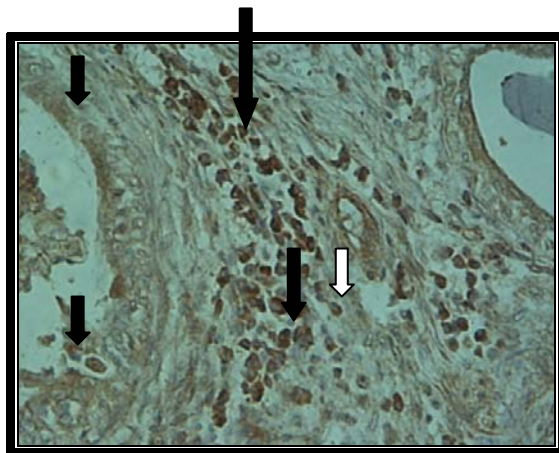
Fotografía 6: Tinción inmunohistoquímica de una muestra positiva de un tumor mamario maligno con anticuerpo Y-19 (RE-β). Las flechas pequeñas indican tinción del estroma (20 x).



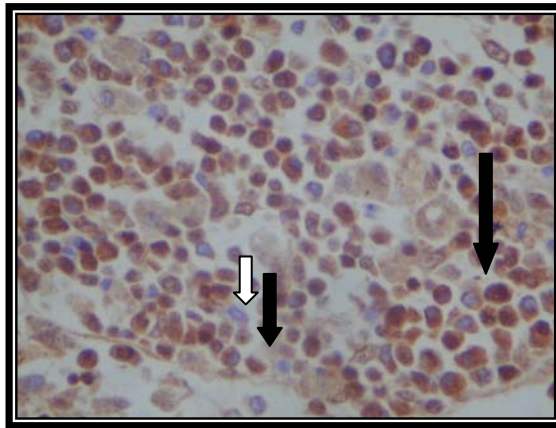
Fotografía 7: Tinción inmunohistoquímica de una muestra de un tumor mamario maligno con anticuerpo Y-19 (RE-β) usado como control negativo (20 x).



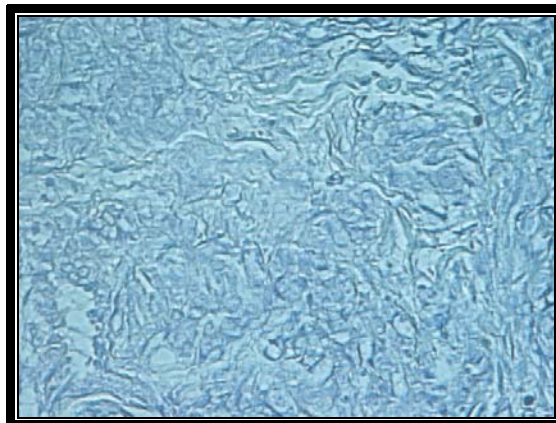
Fotografía 8: Tinción inmunohistoquímica de una muestra positiva de un tumor mamario maligno con anticuerpo Y-19 (RE- β). Flechas pequeñas: muestran tinción del estroma a mayor aumento (respecto a la fotografía 6), flecha mediana: tinción nuclear moderada, flecha grande: muestra 2 células con tinción nuclear fuerte positivas (20 x).



Fotografía 9: Tinción inmunohistoquímica de una muestra positiva de un tumor mamario maligno con anticuerpo Y-19 (RE- β). Flecha blanca: no se observa tinción nuclear, flechas pequeñas: muestran tinción del estroma a mayor aumento (respecto a la fotografía 8), flecha mediana: tinción nuclear moderada, flecha grande: tinción nuclear fuerte positivas (40 x).



Fotografía 10: Tinción inmunohistoquímica de una muestra positiva de un tumor mamario maligno con anticuerpo C-20 (RP). Flecha blanca: no se observa tinción nuclear, flecha mediana: tinción nuclear moderada, flecha grande: tinción nuclear fuerte positivas (40 x).



Fotografía 11: Tinción inmunohistoquímica de una muestra de un tumor mamario maligno con anticuerpo C-20 (RP) usado como control negativo (40 x).

Análisis estadístico

Se contabilizó el porcentaje de células tumorales positivas para cada uno de los receptores (RE- α , RE- β y de RP) en los distintos estadios clínicos (I, II, III, IV). Se consideró positivo para cada uno de los receptores todo corte ≥ 20 % de células tumorales positivas (147, 148).

Se realizó una estadística descriptiva con los animales positivos para cada uno de los receptores en los distintos estadios clínicos (Graph Pad Instat.Inc, 2000).

Objetivo II

Animales

Se incluyeron en este estudio 21 perras mestizas y de diferentes razas, enteras, de 8 y 15 años y 5 a 40 kg, que presentaron NGM malignas (biopsia diferida) en un estadio clínico III (70) durante los años 2005-2006. Las metástasis pulmonares se descartaron mediante radiografías de tórax, latero-lateral derecho e izquierdo, y ventro-dorsal. Los propietarios firmaron un consentimiento para la realización de este protocolo terapéutico.

Mastectomía

Igual metodología de objetivo I.

Estudio histopatológico

Igual metodología de objetivo I.

Determinación de receptores hormonales por inmunohistoquímica

Igual metodología objetivo I, con la única excepción que se utilizaron como anticuerpos primarios solo para la determinación de RP. Estos fueron C-20 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA) para reconocimiento de ambas isoformas de RP (A y B), Ab-6 (NeoMarkers, Inc. Fremont, CA) con especificidad para el reconocimiento de la isoforma B

de RP y Ab-7 (NeoMarkers, Inc. Fremont, CA) con mayor especificidad para el reconocimiento de la isoforma A de RP.

Protocolo terapéutico

Las hembras fueron ubicadas aleatoriamente en uno de los siguientes tratamientos:

- Aglespristone (Alizine[®], Virbac, Francia) 10 mg/kg (concentración: 30 mg/ml) vía subcutánea inmediatamente después de la cirugía y entonces semanalmente durante 3 semanas. Posteriormente, se aplicó el mismo protocolo al comienzo de cada estro comportamental y colpocitológico durante 18 meses (AGLE; n = 11).
- Placebo correspondiente volumen (0,33 cc/kg) de vehículo por vía subcutánea en un mismo esquema de administración (PLCB; n = 10).

Seguimiento

Las perras se evaluaron clínicamente y por radiográficas cada 3 meses durante un total de 18 meses. La evaluación consistió en la observación del estado general de salud, la palpación de la herida quirúrgica, los ganglios linfáticos regionales, las mamas y los tejidos adyacentes. El diagnóstico de metástasis pulmonares se realizó mediante radiografías del tórax latero-lateral derecho e izquierdo, y ventro-dorsal.

Análisis estadístico

Se realizó una estadística descriptiva (media \pm SD) para la positividad de expresión de los RP con los distintos anticuerpos. También se reportó la simultaneidad de expresión a los distintos anticuerpos.

La SLE y la SG, fueron definidas como el tiempo transcurrido desde la primera cirugía a la recidiva (local, regional o distante) o hasta la muerte del animal, respectivamente. En el análisis de SLE, los animales fueron estadísticamente censurados si al tiempo del cierre de la compilación de datos, el tumor no recidivaba o las metástasis no eran detectadas. En el análisis de SG, los animales fueron estadísticamente censurados, si al tiempo del cierre de la compilación de datos estos permanecían vivos. Ambas curvas de supervivencia se estimaron utilizando el método de Kaplan-Meier (149) y los grupos PLCB vs. AGLE y AGLE positivo RP (AGLE + RP) vs. AGLE negativo RP (AGLE - RP) con los distintos anticuerpos se compararon por log-rank test mediante el software Graph Pad Prism (Graph Pad Software, Inc., USA)

Para verificar la comparabilidad de los tratamientos entre los grupos previo a los tratamientos, el tamaño de los tumores, estadio clínico y grado histológico fueron evaluados por el test de Kruskal-Wallis para variables continuas y por el test de Fisher para variables categóricas usando el mismo software. También, la influencia de esas variables sobre la SLE y SG, fueron analizadas mediante un análisis multivariado de regresión logística. El nivel de significancia se fijó en todos los casos en $p < 0,05$.

Objetivo III

Animales

Se incluyeron en este estudio 20 perras mestizas o de diferentes razas, enteras, de 8 y 15 años y 5 a 40 kg en estadio clínico V (70), que presentaban signos radiológicos de metástasis

pulmonares (66) durante los años 2005-2008 (**Fotografías 12- 22**). Se registró el número y tamaño de cada una de las masas mamarias. Los propietarios firmaron consentimiento para la realización de este protocolo terapéutico.



Fotografía 12: Radiografía de tórax normal en posición latero-lateral derecha.



Fotografía 13: Radiografía de tórax en posición latero-lateral derecha, con metástasis pulmonares con un patrón de diseminación miliar, antes de entrar en protocolo.



Fotografía 14: Radiografía de tórax en posición latero-lateral derecha, con metástasis pulmonares con un patrón de diseminación nodular y efusión pleural, antes de entrar en protocolo.



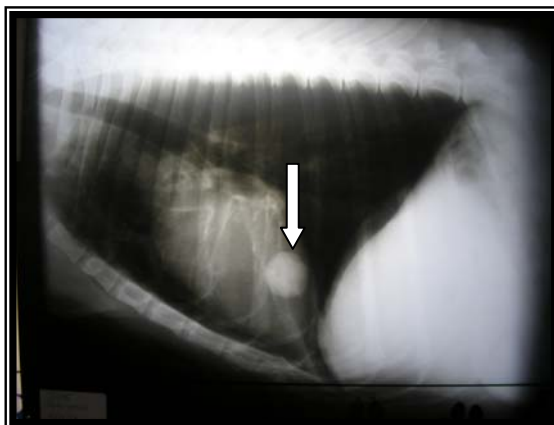
Fotografía 15: Radiografía de tórax en posición latero-lateral derecha, con metástasis pulmonares con un patrón de diseminación nodular, antes de entrar en protocolo.



Fotografía 16: Radiografía de tórax en posición latero-lateral derecha, con metástasis pulmonares con un patrón de diseminación nodular y efusión pleural, antes de entrar en protocolo.



Fotografía 17: Radiografía de tórax en posición latero-lateral derecha, con metástasis pulmonares con un patrón de diseminación nodular, antes de entrar en protocolo.



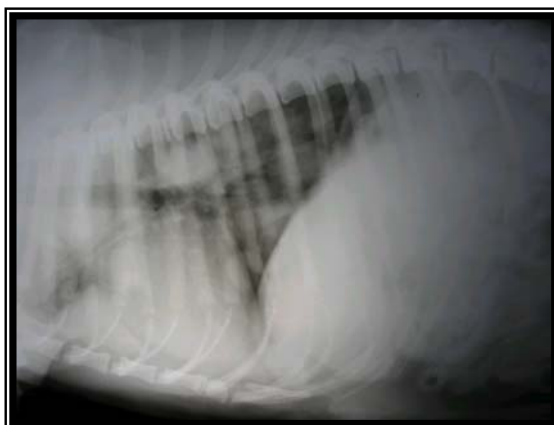
Fotografía 18: Mismo animal de la **fotografía 6** luego de 15 días de tratamiento con aglepristone. Se observan metástasis pulmonares con un patrón de diseminación nodular (flecha). Indicio de enfermedad progresiva.



Fotografía 19: Radiografía de tórax en posición latero-lateral derecha, con metástasis pulmonares, con un patrón de diseminación nodular "a suelta de globos", antes de entrar en protocolo.



Fotografía 20: Mismo animal de la **fotografía 8** luego de 15 días de tratamiento con placebo. Se observan metástasis pulmonares con un patrón de diseminación nodular “a suelta de globos”. La enfermedad se mantiene estable respecto a la **fotografía 8**.



Fotografía 21: Radiografía de tórax en posición latero-lateral derecha, con metástasis pulmonares con un patrón de diseminación nodular “a suelta de globos”, antes de entrar en protocolo.



Fotografía 22: Mismo animal de **Fotografía 10** luego de 50 días de tratamiento con aglepristone. Persisten las metástasis pulmonares con patrón de diseminación nodular. Índice de enfermedad progresiva.

Estudios radiológicos

Las metástasis pulmonares de los tumores mamarios fueron diagnosticadas mediante estudios radiológicos con tiempo de exposición de 10 MA/s en 4 centésimas de segundo y ajustando la penetración (KV) de acuerdo al caso (Siemens Heliophos-4[®] de 240 M/A – 125 K/V; Berlín, Alemania). Los animales fueron evaluados previo al estudio con, al menos, una radiografía torácica al final de la inspiración en posición latero lateral izquierda y derecha. En los pacientes que fuera posible (escasa o nula disnea) se realizó una incidencia ventrodorsal (150). Cada una de las masas pulmonares radiodensas fueron registradas y medidas antes y durante el estudio (150).

Para evaluar una respuesta objetiva, en algunos casos, fue estimada la carga tumoral total (metástasis + tumores primarios) (150). La interpretación radiográfica incluyó la medición cuantitativa de los nódulos en número y volumen ($V = 4/3 \pi.r^3$) (151).

Protocolo terapéutico

Las perras fueron ubicadas aleatoriamente en uno de los siguientes tratamientos:

- Aglespristone (Alizine[®], Virbac, Francia): 10 mg/kg (concentración: 30 mg/ml), vía subcutánea, cada 24 horas durante 10 días, continuando con la misma dosis semanalmente hasta la muerte del animal (AGLE; n = 10).
- Placebo: correspondiente volumen (0,33 cc/kg) de vehículo vía subcutánea con igual régimen de administración (PLCB; n = 10).

Seguimiento

Las hembras se evaluaron clínicamente en búsqueda de recurrencia local y/o regional y tamaños de los tumores primarios cada 7 días, o más frecuentemente, si aparecían cambios clínicos o radiológicos. Los exámenes radiográficos se realizaron cada 14 días como intervalo máximo, o más frecuentemente, si aparecían cambios clínicos.

El criterio para medir la respuesta al tratamiento fue: remisión completa (resolución total de toda evidencia clínica o radiográfica), remisión parcial y libre de progresión (reducción > 50 % del volumen tumoral y sin lesiones nuevas), enfermedad estable (reducción del volumen tumoral inicial < 50 % o incremento de la carga < 25 %) o enfermedad progresiva (incremento del volumen tumoral > 25 % o aparición de lesiones nuevas; 150).

Análisis estadístico

La curva de supervivencia probable se estimó mediante el método de Kaplan-Meier (149) y la comparación de los grupos por el log-rank test. La respuesta al tratamiento fue evaluada por Chi² (GraphPad InStat). El nivel de significancia se fijó en p 0,05.

Objetivo IV

Animales

En este estudio fueron incluidas 32 perras, mestizas o de diferentes razas, enteras, de 5-13 años y de 4 a 55 kg, con adenocarcinomas mamarios (biopsia diferida) en estadios clínicos III y IV (70). Las metástasis pulmonares se descartaron mediante radiografías de tórax. Los propietarios firmaron su consentimiento para la realización de este protocolo terapéutico.

Protocolo terapéutico

Las perras se ubicaron aleatoriamente en uno de los siguientes grupos, a los que se les administró:

- Desmopresina (Biogénesis-Bago, Bs As, Argentina) 1 µg/kg (concentración: 5 µg/ml) vía endovenosa en solución salina 30 minutos antes y 24 hs después de la cirugía (DDAVP, n = 21)
- Placebo: correspondiente volumen (0,2 ml/kg) de vehículo vía endovenosa con igual régimen de administración (PLCB; n = 11).

Mastectomía

Igual metodología de objetivo I.

Estudio histopatológico

Igual metodología de objetivo I.

Seguimiento

Las hembras se evaluaron clínicamente y por radiografías de tórax menos durante 12 meses posteriores a la intervención quirúrgica. La evaluación fue trimestral y consistió en la observación del estado general de la salud del animal, la palpación de la herida quirúrgica, los ganglios linfáticos regionales y también mamas y tejidos adyacentes. El diagnóstico de metástasis pulmonares se realizó mediante radiografías del tórax.

Análisis estadístico

Igual metodología de objetivo II.

RESULTADOS

Objetivo I:

El conteo del porcentaje de células tumorales positivas para RE- α , RE- β y RP fue de 19/51, 32/51 y 12/51, respectivamente (**Figura 1**). La presencia simultánea de RE (α y β) y RP ocurrió solamente en una perra (en estadio III). La presencia de RE- α y RP ocurrió en 3 hembras (en estadio III). La presencia de RE- β y RP ocurrió en 7 perras (1 en estadio I, 2 en II y 4 en estadio III). Ambos RE aparecieron en 11 hembras (1 en estadio I, 8 en III y 2 en IV) (**Anexo 1**).

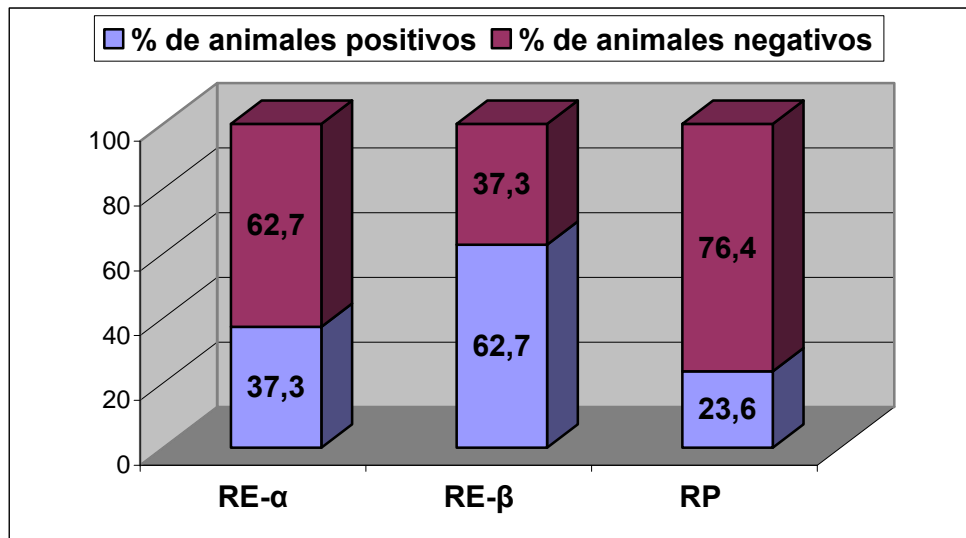


Figura 1: Porcentaje de animales con tumores malignos que resultaron positivos a la presencia de los distintos receptores hormonales.

De los 51 casos estudiados 7, 6, 28, y 10 fueron clasificados como en estadio clínico I, II, III y IV, respectivamente (**Figura 2**).

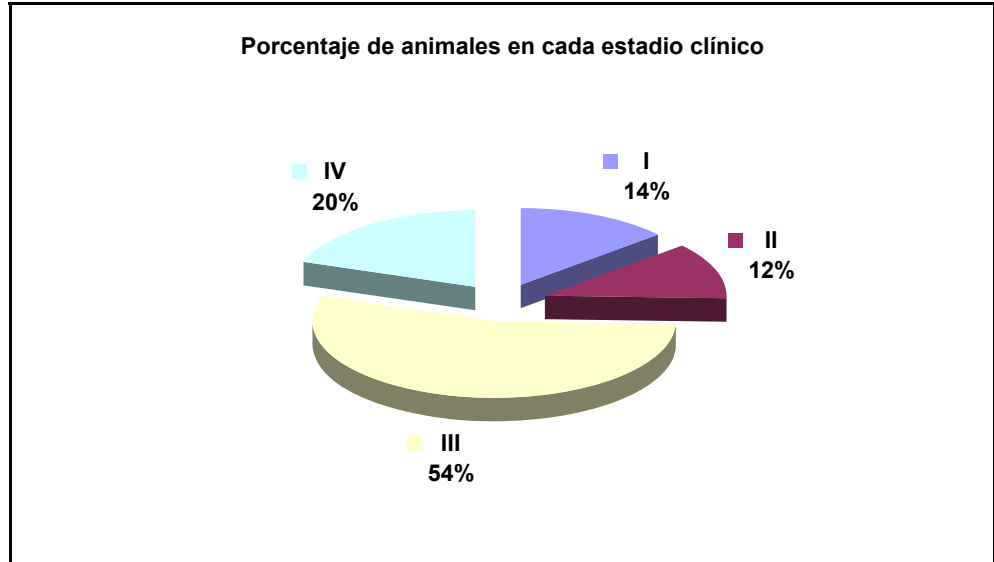


Figura 2: Porcentaje de los distintos estadios clínicos (I, II, III y IV) en 51 caninos hembras con tumores mamarios malignos.

Cuando se estudiaron los casos en **estadio clínico I** exclusivamente 1/7, 3/7 y 1/7 resultaron positivos a RE- α , RE- β y RP, respectivamente (**Figura 3**). La media \pm SEM del porcentaje de receptores que presentaron estos tumores fue de 60 ± 0 ; $75 \pm 6,6$ y 75 ± 0 para RE- α , RE- β y RP, respectivamente.

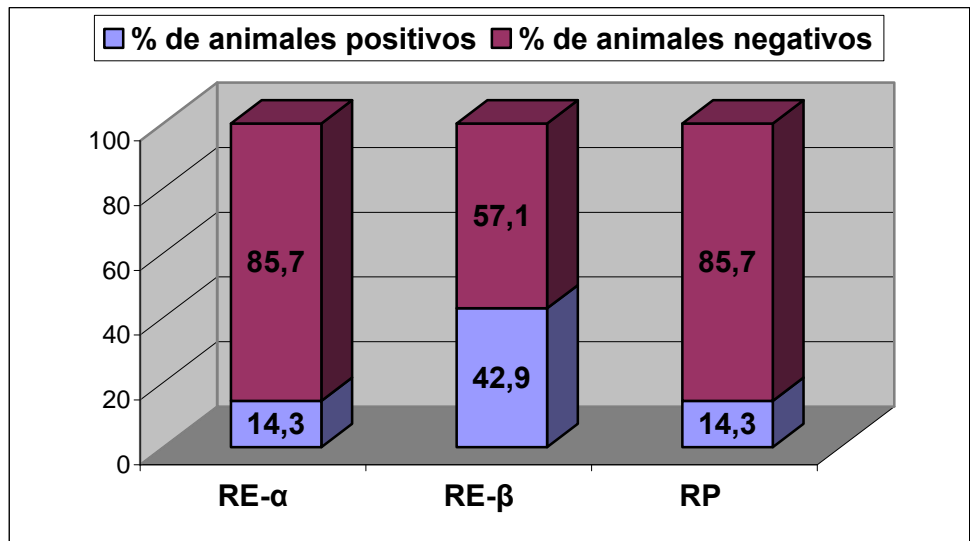


Figura 3: Porcentaje de perras con tumores malignos en estadio clínico I que resultaron positivos a la presencia de los distintos receptores hormonales.

En los casos en **estadio clínico II** exclusivamente 0/6, 4/6 y 2/6 resultaron positivos a RE-α, RE-β y RP, respectivamente (**Figura 4**). La media \pm SEM del porcentaje de receptores que presentaron estos tumores fue de 0 ± 0 ; $53,8 \pm 12,5$ y $48,5 \pm 26,5$ para RE-α, RE-β y RP, respectivamente.

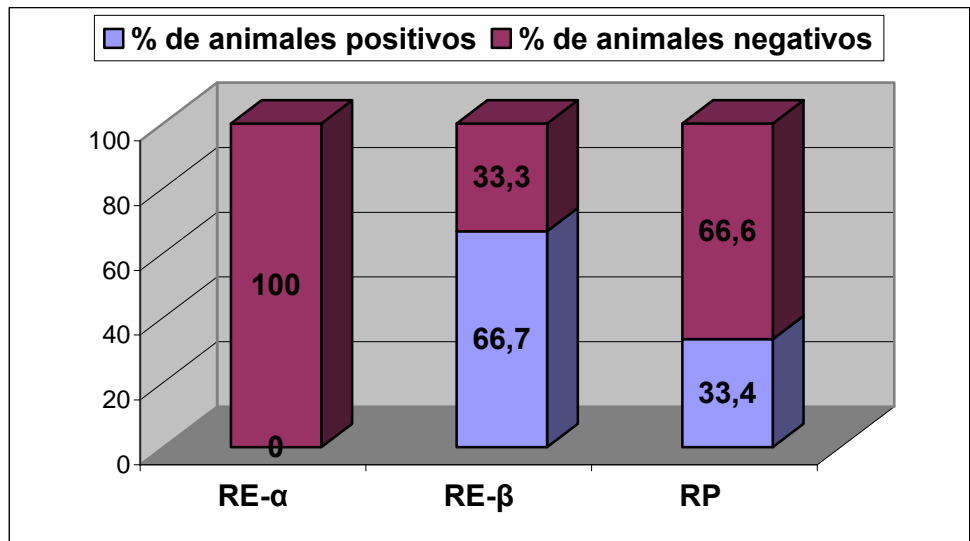


Figura 4: Porcentaje de hembras caninas con tumores malignos en estadio clínico II que resultaron positivos a la presencia de los distintos receptores hormonales.

Cuando se describieron las hembras en **estadio clínico III** exclusivamente 14/28, 19/28 y 7/28 resultaron positivos a los receptores para RE-α, RE-β y RP, respectivamente (**Figura 5**). La media \pm SEM del porcentaje de receptores que presentaron estos tumores fue de $46,3 \pm 5,9$; $57,1 \pm 6,3$ y $43,6 \pm 8,6$ para RE-α, RE-β y RP, respectivamente.

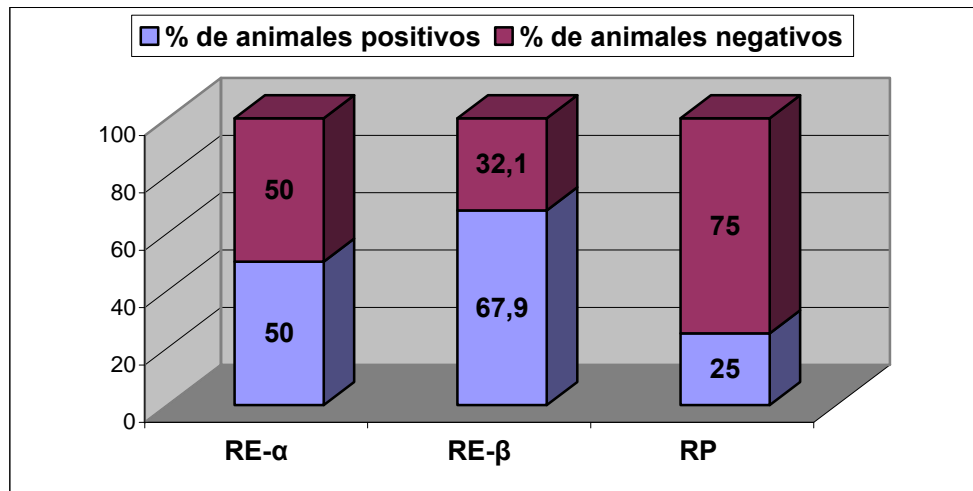


Figura 5: Porcentaje de perras con tumores malignos en estadio clínico III que resultaron positivos a la presencia de los distintos receptores hormonales

Tres de 10, 4/10 y 1/10 de las perras en **estadio clínico IV** resultaron positivas a RE- α , RE- β y RP, respectivamente (**Figura 6**). La media \pm SEM del porcentaje de receptores que presentaron estos tumores fue de $37,4 \pm 9,2$; $63 \pm 15,5$ y 60 ± 0 para RE- α , RE- β y RP, respectivamente.

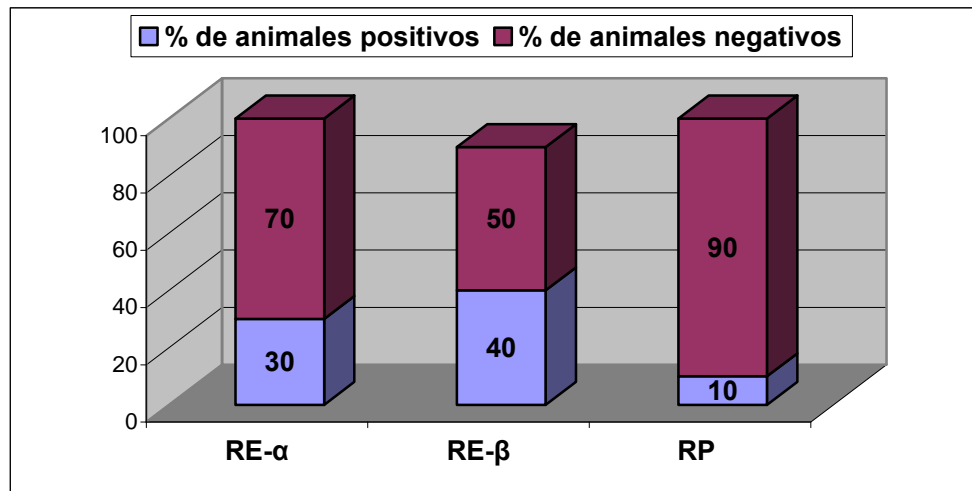


Figura 6: Porcentaje de hembras caninas con tumores malignos en estadio clínico IV que resultaron positivos a la presencia de los distintos receptores hormonales.

Objetivo II

Los resultados de estadística descriptiva para la positividad o no de expresión de RP progesterona con los distintos anticuerpos está representada en la **Figura 7** y **Fotografías 23-31**. En el grupo PLCB la presencia simultánea de receptores positivos a (C-20 y Ab-6), (C-20 y Ab-7) y (Ab-6 y Ab-7) fue de 2, 3 y 3 de los 10 casos, respectivamente. La inmunomarcación con los 3 anticuerpos ocurrió en 2 casos. La media \pm SEM del porcentaje de receptores que presentaron estas neoplasias fueron de $64 \pm 12,2$; $57,5 \pm 10,3$ y $44 \pm 8,4$ para RP (C-20), RP (Ab-6) y RP (Ab-7) respectivamente. En el grupo AGLE la presencia simultánea de RP (C-20 y Ab-6), (C-20 y Ab-7) y (Ab-6 y Ab-7) fue de 3, 5 y 2 de los 11 casos, respectivamente. La presencia simultánea de la inmunomarcación positiva con los 3 anticuerpos se produjo en solo en 1 caso. La media \pm SEM del porcentaje de receptores que

presentaron estas neoplasias fueron de $41,3 \pm 6,9$; 42 ± 10 y $60,4 \pm 5,3$ para RP (C-20), RP (Ab-6) y RP (Ab-7) respectivamente.

Ambos grupos de animales tuvieron una similar distribución de las edad, peso, cantidad de tumores, tamaño del tumor mayor, patrón y grado histopatológico de diferenciación y positividad a receptores ($p > 0,05$). El análisis multivariado de regresión logística reveló que ninguna de las variables analizadas, influenciaba significativamente en el tiempo de SLE y SG.

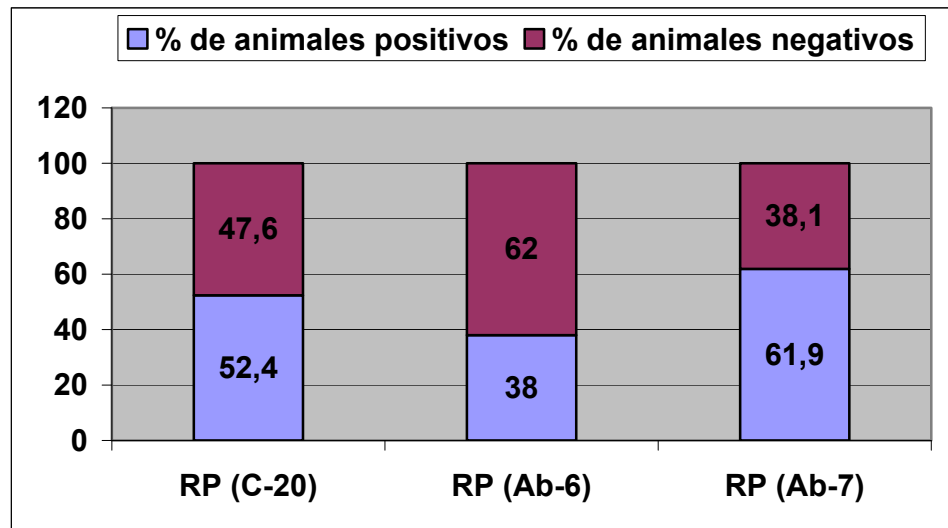
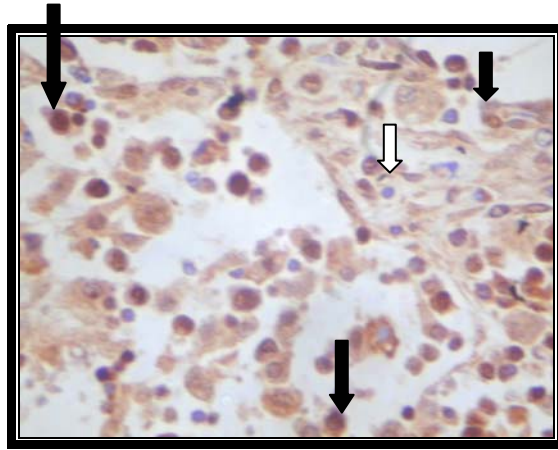
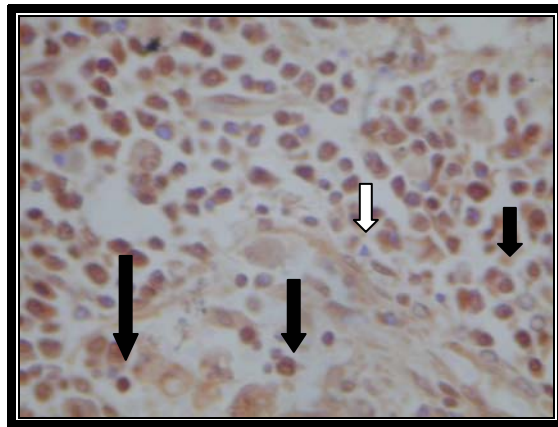


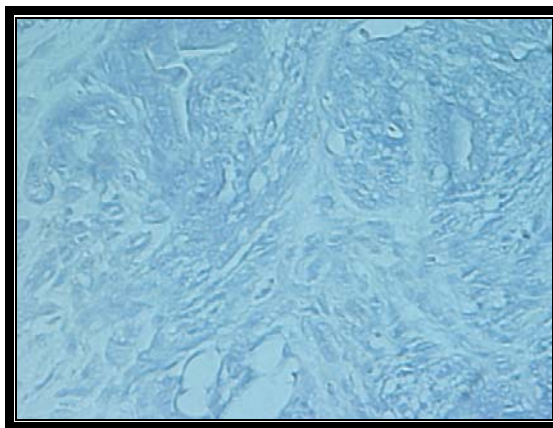
Figura 7: Proporción de positividad de receptores de progesterona para diferentes anticuerpos en 51 perras con neoplasia mamaria maligna estadio clínico III.



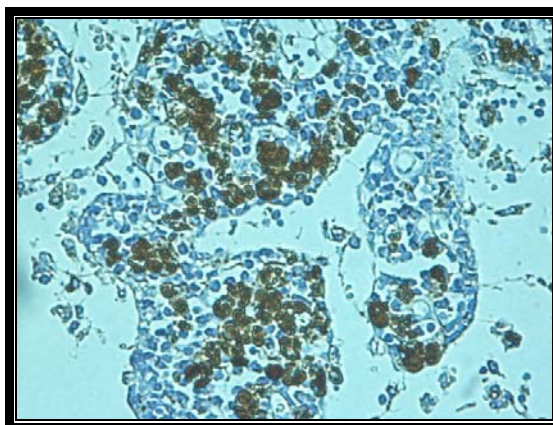
Fotografía 23: Tinción inmunohistoquímica de una muestra positiva de un tumor mamario maligno con anticuerpo C-20, correspondiente a un animal del grupo placebo. Flecha blanca: no se observa tinción nuclear, flecha pequeña: tinción nuclear débil, flecha mediana: tinción nuclear moderada, flecha grande: tinción nuclear fuerte (40 x).



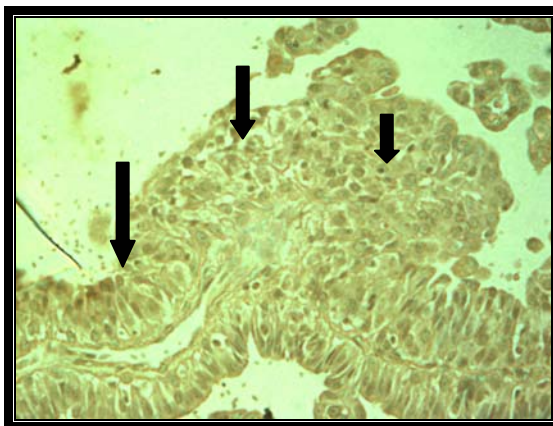
Fotografía 24: Tinción inmunohistoquímica de una muestra positiva de un tumor mamario maligno con anticuerpo C-20, correspondiente a un animal tratado con aglepristone. Flecha blanca: no se observa tinción nuclear, flecha pequeña: tinción nuclear débil, flecha mediana: tinción nuclear moderada, flecha grande: tinción nuclear fuerte (40 x).



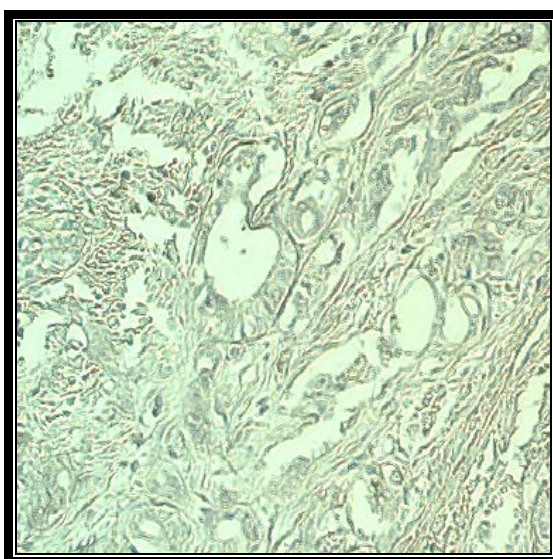
Fotografía 25: Tinción inmunohistoquímica de una muestra negativa de un tumor mamario maligno con anticuerpo C-20 (40 x).



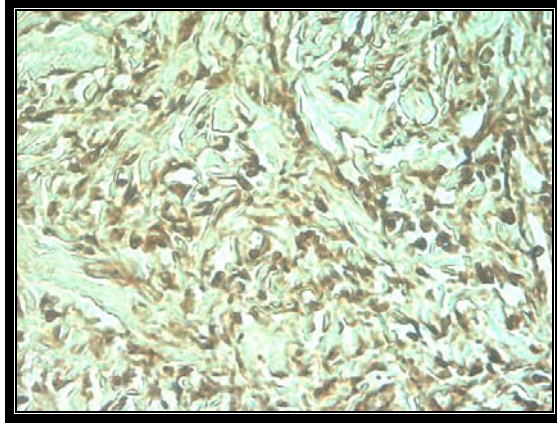
Fotografía 26: Tinción inmunohistoquímica de una muestra positiva de un tumor mamario maligno con anticuerpo Ab-6, correspondiente a un animal del grupo placebo. Se observa una tinción nuclear fuerte en todas las células marcadas (40 x).



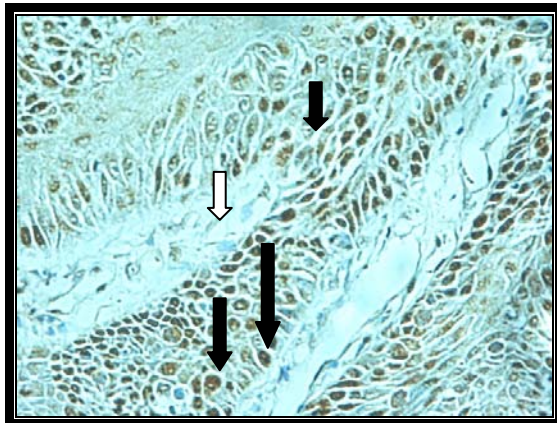
Fotografía 27: Tinción inmunohistoquímica de una muestra positiva de un tumor mamario maligno con anticuerpo Ab-6, correspondiente a un animal tratado con aglepristone. Flecha pequeña: tinción nuclear débil, flecha mediana: tinción nuclear moderada, flecha grande: tinción nuclear fuerte (40 x).



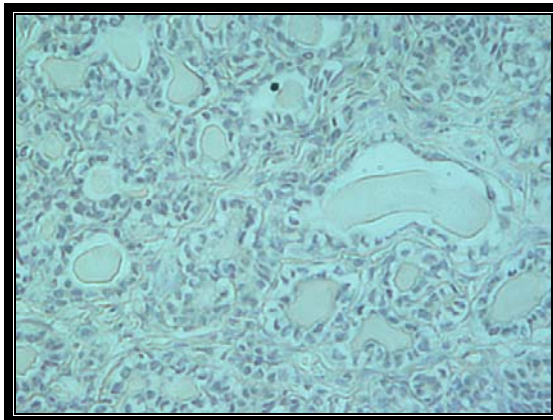
Fotografía 28: Tinción inmunohistoquímica de una muestra negativa de un tumor mamario maligno con anticuerpo Ab-6 (40 x).



Fotografía 29: Tinción inmunohistoquímica de una muestra positiva de un tumor mamario maligno con anticuerpo Ab-7, correspondiente a un animal placebo. Se observa una tinción nuclear moderada a fuerte en todas las células marcadas (40 x).



Fotografía 30: Tinción inmunohistoquímica de una muestra positiva de un tumor mamario maligno con anticuerpo Ab-7, correspondiente a un animal tratado con aglepristone. Flecha blanca: no se observa tinción nuclear, flecha pequeña: tinción nuclear débil, flecha mediana: tinción nuclear moderada, flecha grande: tinción nuclear fuerte (40 x).



Fotografía 31: Tinción inmunohistoquímica de una muestra negativa de un tumor mamario maligno con anticuerpo Ab-7, (40 x).

No se detectaron diferencias entre el grupo PLCB y AGLE para las SLE (p 0,1) ni SG (p 0,2; **Figura 8**). Siete y 3 de las perras de los grupos PLCB y AGLE y tuvieron recidiva locoregional o metástasis mientras que 6 y 2, de los mismos grupos, murieron dentro del periodo de estudio.

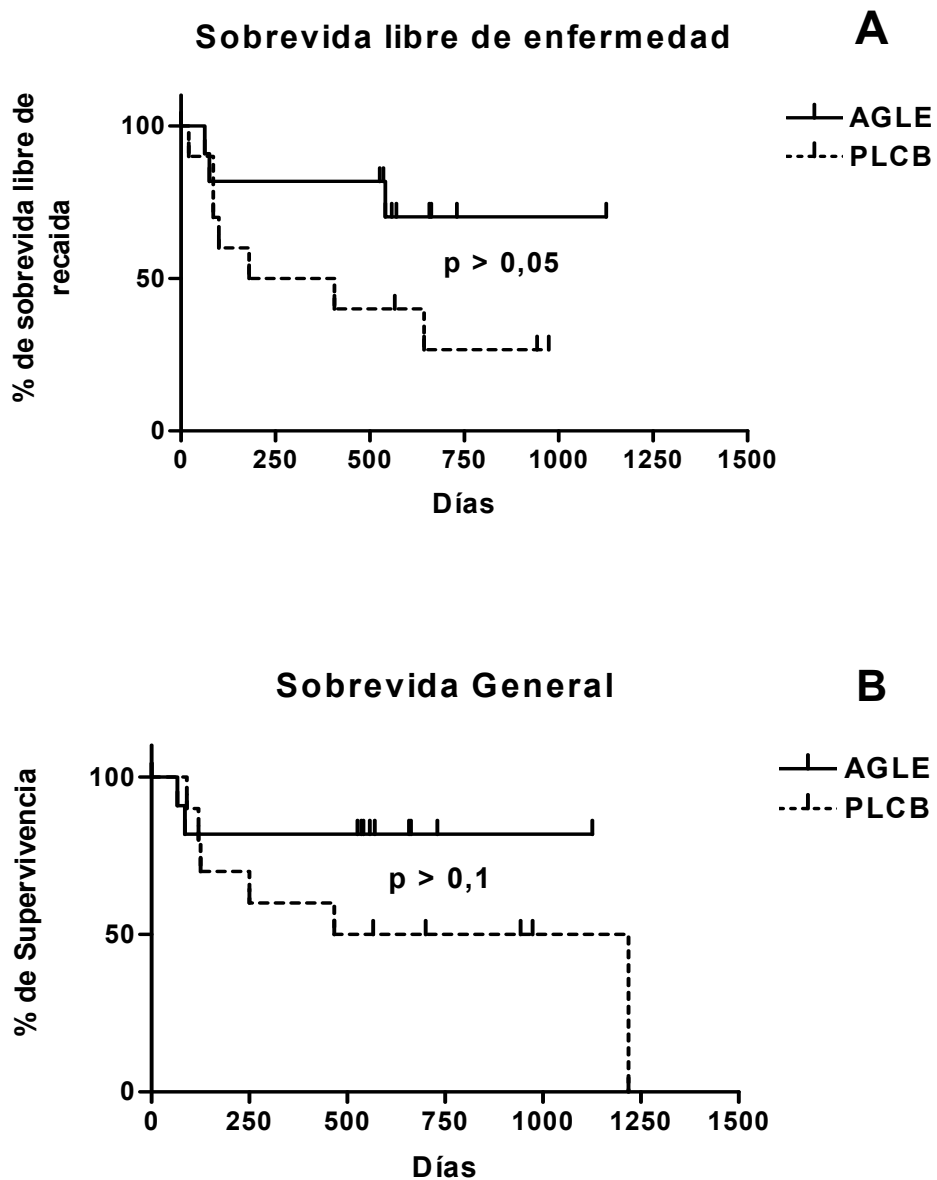


Figura 8: Curvas de Kaplan-Meier de probabilidades de sobrevida libre de enfermedad (A) y sobrevida general (B) en perras con neoplasia mamaria maligna estadio clínico III tratadas con aglepristone (AGLE, $n = 11$) o con placebo (PLCB, $n = 10$). Las barras verticales representan los animales estadísticamente censurados.

De igual manera, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos para estas variables cuando se analizaron los casos positivos y negativos con los anticuerpos C-20, Ab6

y Ab7 (**Figuras 9-11**). Finalmente, cuando se compararon los casos positivos con los negativos del grupo AGLE con los distintos anticuerpos, tampoco se encontraron diferencias significativas, salvo en 7 animales negativos al Ab-6 que tuvieron una SG más prolongada. La **Tabla 2** resume en forma individual para cada animal (toda la información). En ninguno de los casos se detectaron efectos colaterales locales ni sistémicos relacionados con los tratamientos.

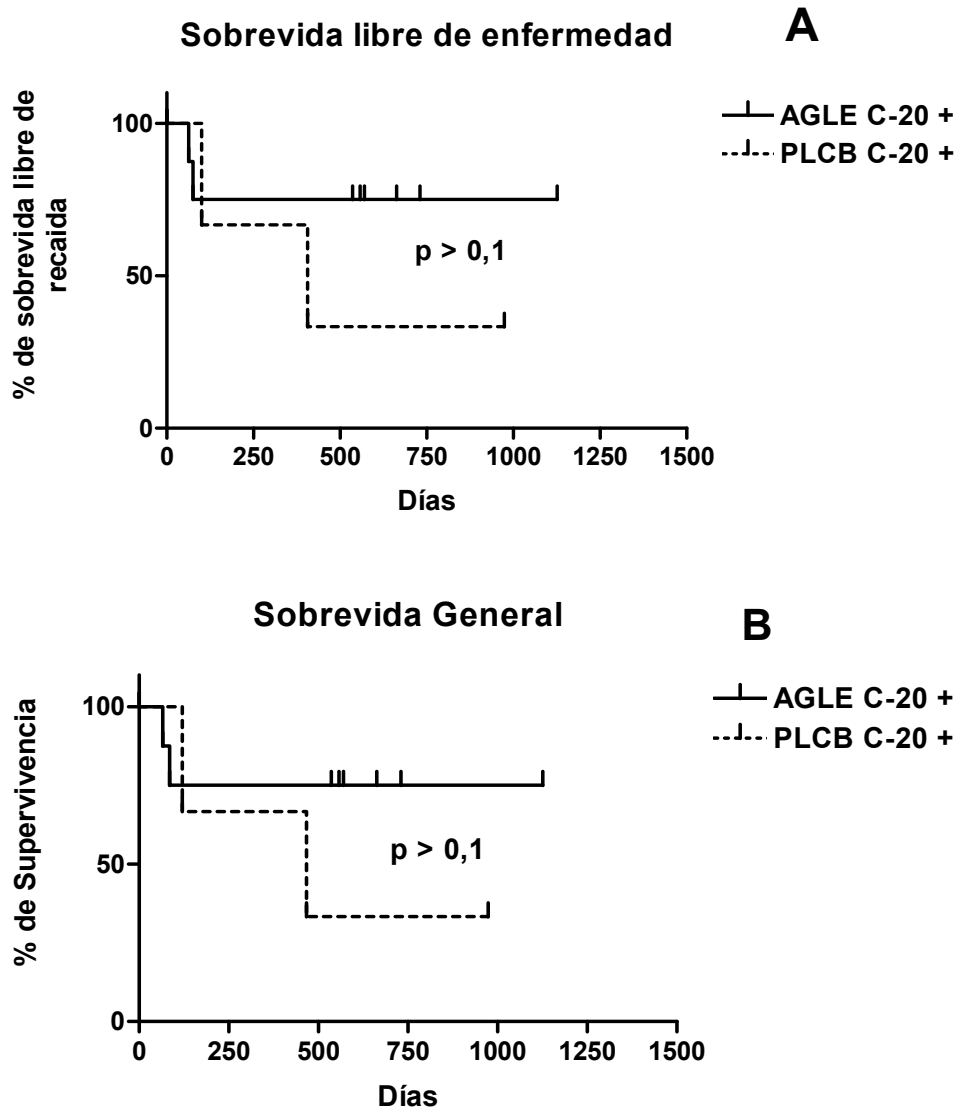


Figura 9 (referencia al final de la figura).

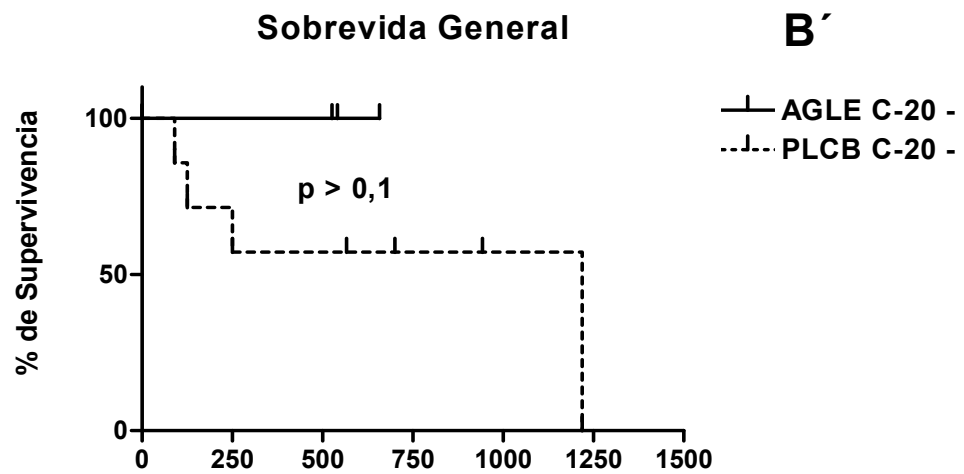
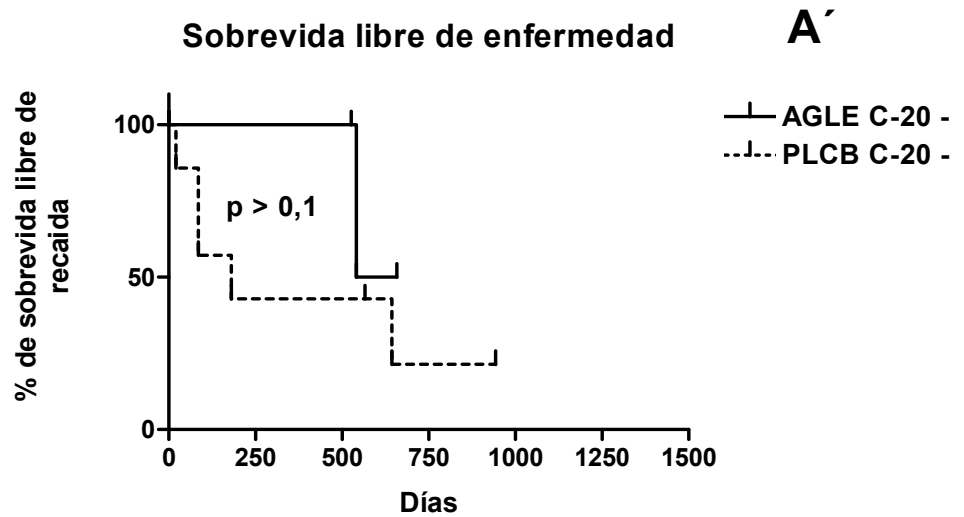


Figura 9: Curva de Kaplan-Meier de probabilidades de sobrevida libre de enfermedad (A) y sobrevida general (B) en perras con neoplasia mamaria maligna estadio clínico III con expresión de receptores de progesterona evidenciado con anticuerpo C-20 tratadas con aglepristone (AGLE C-20 +; n = 8) o placebo C-20 (PLCB C-20, n = 3). Curvas de Kaplan-Meier de probabilidades de sobrevida libre de enfermedad (A') y sobrevida general (B') de

perras tratadas de la misma manera y negativas al receptor de progesterona con C-20 (AGLE C-20 -; n = 3) o placebo (PLCB C-20 -; n = 7). Las barras verticales representan a los animales estadísticamente censurados.

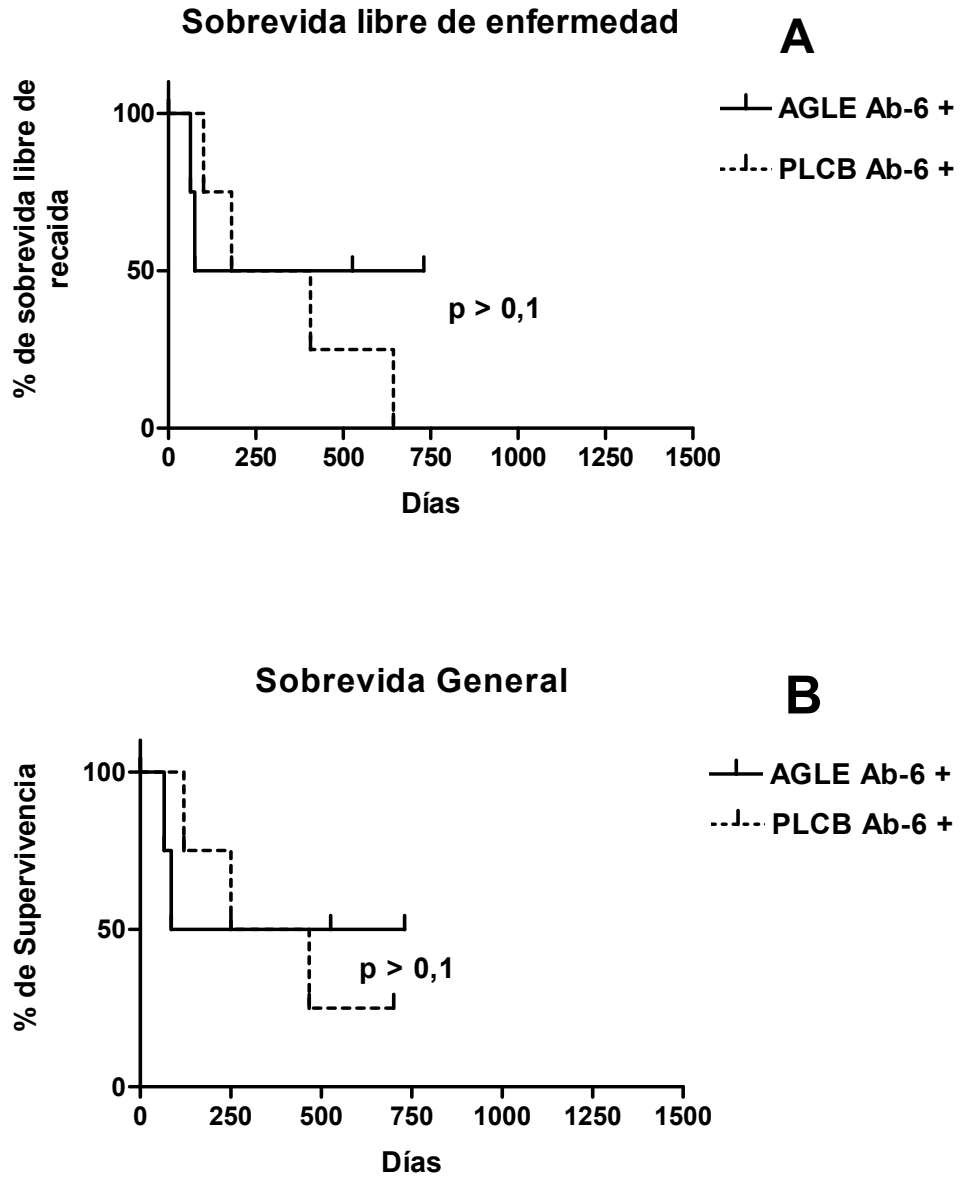


Figura 10 (referencia al final de la figura).

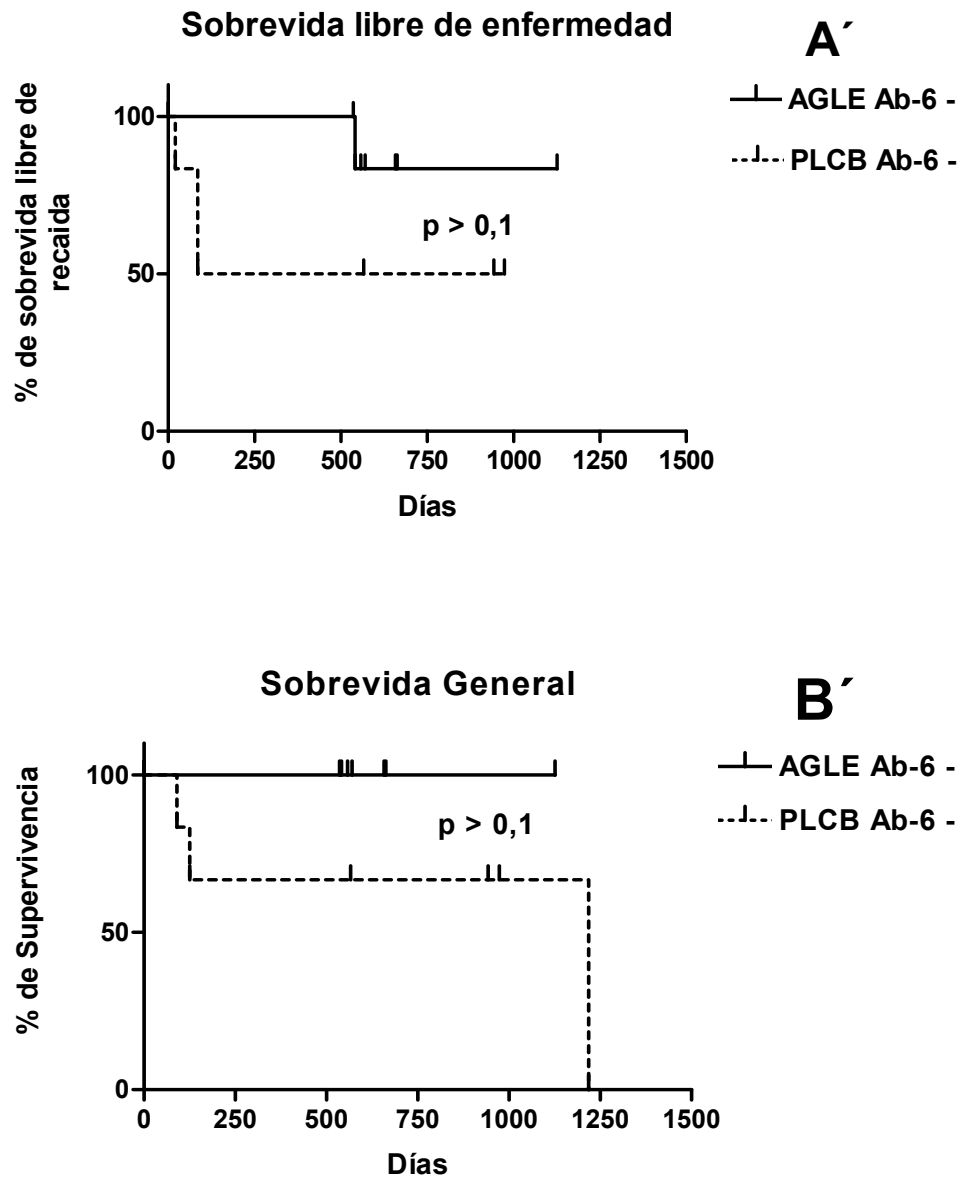


Figura 10: Curva de Kaplan-Meier de probabilidades de supervivencia libre de enfermedad (A) y supervivencia general (B) en perras con neoplasia mamaria maligna estadio clínico III con expresión de receptores de progesterona evidenciado con anticuerpo Ab-6 tratadas con aglepristone (AGLE Ab-6 +; n = 4) o placebo (PLCB Ab-6 +; n = 4). Curvas de Kaplan-Meier de probabilidades de supervivencia libre de enfermedad (A') y supervivencia general (B') de perras tratadas de la misma manera y negativas al receptor con Ab-6 (AGLE Ab-6 -; n = 7) o

placebo (PLCB Ab-6 -; n = 6). Las barras verticales representan a los animales estadísticamente censurados.

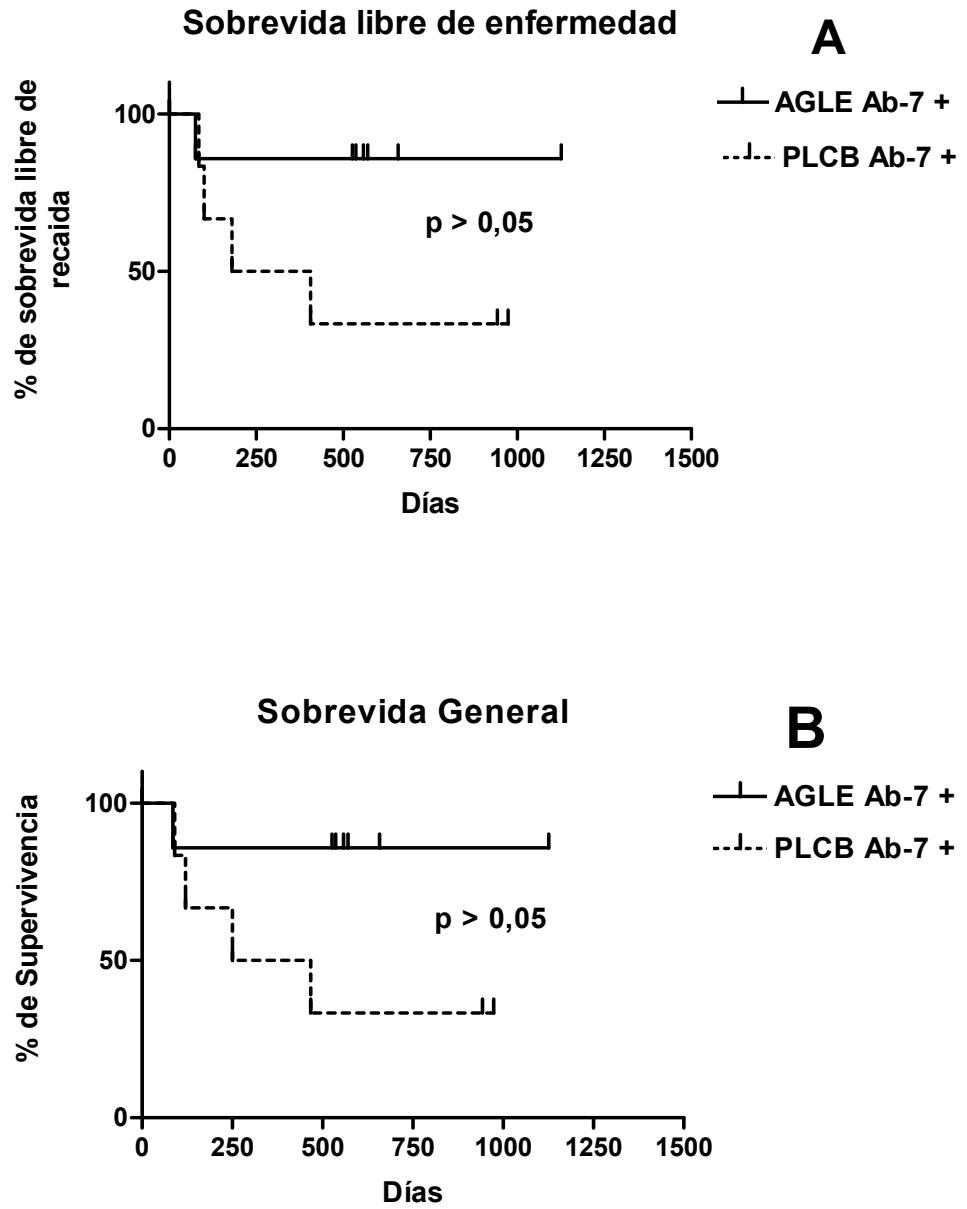


Figura 11 (referencia al final de la figura).

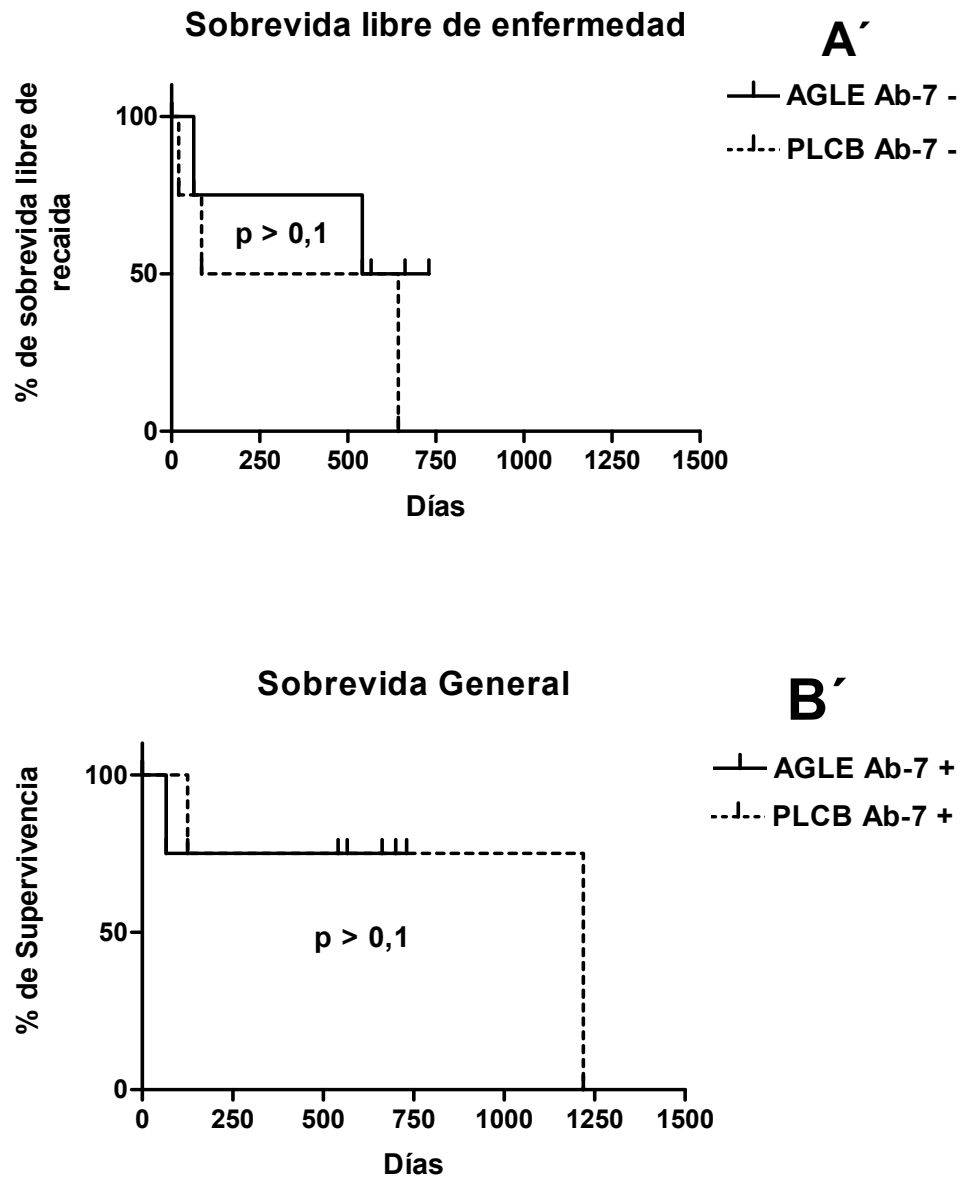


Figura 11: Curva de Kaplan-Meier de probabilidades de sobrevivida libre de enfermedad (A) y sobrevivida general (B) en perras con neoplasia mamaria maligna estadio clínico III con expresión de receptores de progesterona evidenciado con anticuerpo Ab-7 tratadas con aglepristone (AGLE Ab-7 +; n = 7) o placebo (PLCB Ab-7 +; n = 6). Curvas de Kaplan-Meier de probabilidades de sobrevivida libre de enfermedad (A') y sobrevivida general (B') de perras tratadas de la misma manera y negativas al receptor con Ab-7 (AGLE Ab-7 -; n = 4) o

placebo (PLCB Ab-7 -; n = 4). Las barras verticales representan a los animales estadísticamente censurados.

Grupo	Animal	Recurrencia local	Recurrencia locoregional	Metástasis	SLE (días)	Muerte	SG (días)	% RP C-20	% RP Ab-6	% RP Ab-7
PLCB	1	Sí	Sí	No	406,0	Sí	467,0	80	80	35
PLCB	2	No	No	Sí	644	No	700	0	30	0
PLCB	3	No	No	Sí	180,0	Sí	250,0	0	60	25
PLCB	4	Sí	No	No	20,0	Sí	1219,0	0	0	0
PLCB	5	No	Sí	Sí	85	Sí	125	0	3	15
PLCB	6	No	No	No	566	No	240	3	0	11
PLCB	7	No	No	No	974	No	974	40	10	80
PLCB	8	No	No	No	943	No	943	15	5	45
PLCB	9	No	Sí	Sí	100	Sí	120	72	60	53

Tabla 2 (referencia al final de la tabla).

PLCB	10	No	No	Sí	85	Sí	90	0	0	26
AGLE	1	No	No	No	570	No	570	20	0	60
AGLE	2	No	No	No	526	No	526	7	30	48
AGLE	3	No	No	No	1126	No	1126	20	5	50
AGLE	4	No	Sí	Sí	75	Sí	85	60	58	72
AGLE	5	No	No	No	536	No	536	25	0	43
AGLE	6	No	No	Sí	63	Sí	66	65	60	5
AGLE	7	No	No	No	558	No	558	50	5	80
AGLE	8	No	No	No	663	No	663	60	15	18
AGLE	9	No	No	No	658	No	658	15	0	70
AGLE	10	No	No	No	730	No	730	30	20	15

AGLE	11	No	No	No	541	No	541	0	3	15
------	----	----	----	----	-----	----	-----	---	---	----

Tabla 2: Evolución clínicas y expresión de receptores de progesterona con distintos anticuerpos en perras con neoplasia mamaria maligna estadio clínico III tratadas con aglepristone (AGLE, n = 11) o con placebo (PLCB, n = 10).

Objetivo III

Antes de comenzar el protocolo, en ambos grupos de animales se encontró una similar distribución de los casos respecto a la edad, peso de los animales, carga tumoral en los pulmones, dispersión de los nódulos, presencia o ausencia de efusión pleural, presencia de un tumor primario en alguna mama ($p = 1$). El análisis multivariado de regresión logística reveló que ninguna de las variables analizadas influyó sobre el tiempo de supervivencia general ($p = 0,9$).

El análisis de Kaplan-Meier indicó que el tratamiento con aglepristone no extendió la mediana del tiempo de SG (13 días vs. 14,5 días, $p = 0,8$; **Figura 12**), para el grupo AGLE y PLCB respectivamente. En ambos grupos 7/10 animales evolucionaron con enfermedad progresiva y 3/10 con enfermedad estable ($p = 1$). Solo una paciente del grupo AGLE tuvo una remisión parcial en el primer control del protocolo para luego evolucionar a enfermedad progresiva como el resto de los animales.

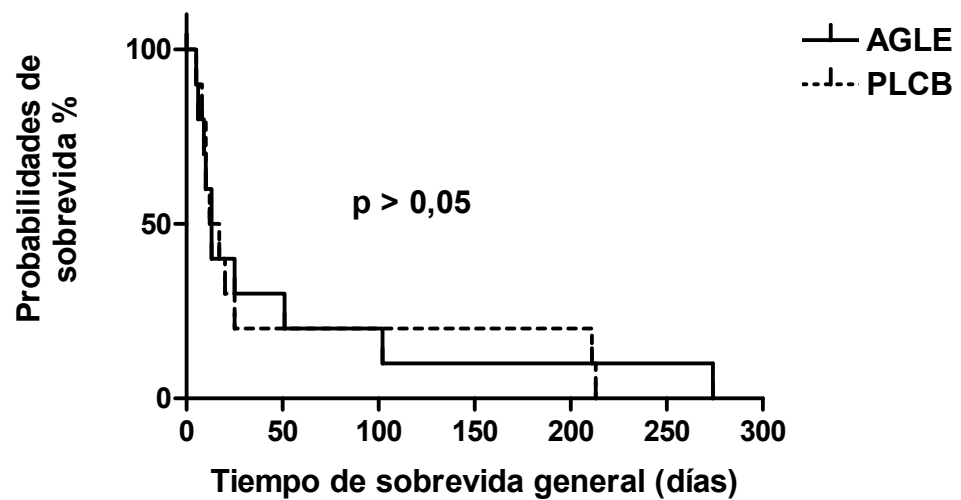


Figura 12: Curva de Kaplan-Meier de probabilidades de supervivencia general de perras tumores mamarios malignos con metástasis pulmonares tratadas con aglepristone (AGLE, n = 10) o con placebo (PLCB, n = 10).

Objetivo IV

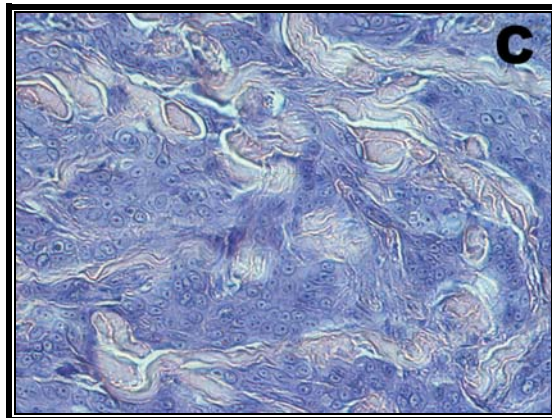
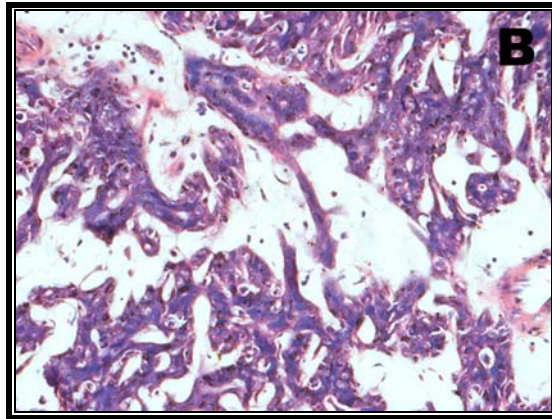
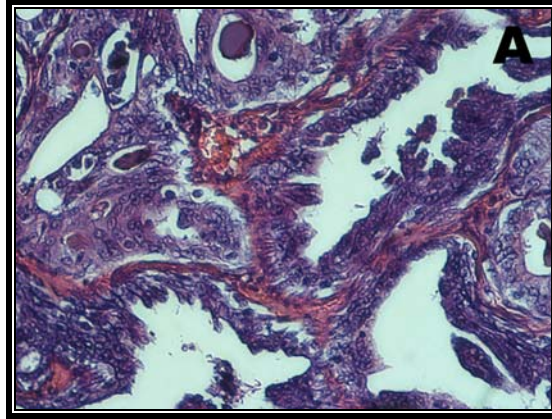
Como era de esperar, el tipo tumoral diagnosticado más frecuentemente fue el carcinoma simple. Otros tipos de variantes diagnosticadas, incluyen a carcinomas complejos, carcinomas de células escamosas, carcinosarcoma y carcinomas anaplásicos. En ambos grupos de tratamiento, no se observaron diferencias significativas respecto a la edad, peso del animal, número y tamaño lesiones neoplásicas, estadio clínico ni características histopatológicas de los carcinomas mamarios (**Tabla 3**).

	Grupo PLCB (n= 10)	Grupo DDAVP (n=18)
Edad (años)^A	10 (7 – 13)	10 (5 – 13)
Peso del animal (kg)^A	32 (15 – 55)	22 (4 – 45)
Número de tumores por animal^A	2 (1 – 7)	2 (1 – 7)
Diámetro mayor del tumor (cm)^A	7 (5 – 37)	6 (5 – 13)
Estadio Clínico		
Estadio III	8/10 (80%)	16/18 (89%)
Estadio IV	2/10 (20%)	2/18 (11%)
Tipo histopatológico		
Carcinoma simple	7/10 (70%)	15/18 (83%)
Otros carcinomas	3/10 (30%)	3/18 (17%)
Grado Histológico		
Grado I	3/10 (30%)	3/18 (17%)
Grado II	5/10 (50%)	7/18 (39%)
Grado III	2/10 (20%)	8/18 (44%)

Tabla 3: Características clínicas e histológicas de 28 casos de NGM localmente avanzadas tratadas o no en forma perioperatoria con DDAVP.

^A Los datos son expresados como media.

Los diferentes grados histológicos estuvieron representados en ambos grupos, aunque los moderadamente diferenciados (grado II) fueron los tumores más frecuentes en el grupo PLCB y los pobremente diferenciados (grado III) fueron los tumores más frecuentes en el grupo de DDAVP. Las **Fotografía 32** muestra imágenes representativas de los diferentes grados histológicos.



Fotografía 32: Características histopatológicas de carcinomas mamarios caninos. A, bien diferenciado (grado I); B, moderadamente diferenciado (grado II); C, pobremente diferenciado (grado III). Magnificación original X400.

Cuatro casos fueron diagnosticados como lesiones no carcinomatosas, incluyendo dos pacientes con osteosarcomas, y uno con un tumor mixto benigno en el grupo DDAVP y un paciente con hiperplasia lobular y adenosis en el grupo placebo, y por tanto, fueron excluidos del estudio. El análisis multivariado de regresión logística reveló que ninguna de las variables analizadas influyó significativamente en el tiempo de SLE y SG.

En los pacientes tratados con DDAVP se observó una disminución de la hemorragia intraoperatoria, y algunos animales también mostraron una mejora de la cicatrización de la herida quirúrgica. Como era de esperar, en este estudio, DDAVP fue bien tolerado en las dosis empleadas y no fueron documentados efectos tóxicos clínicos en ninguno de los casos.

Independientemente del grado histológico, 5 (28%) y 8 (80%) de los pacientes DDAVP y del grupo placebo, respectivamente, presentaron recaídas, ya sea local o metástasis pulmonares durante el período estudiado. El análisis de Kaplan-Meier indicó que la DDAVP tuvo un efecto positivo sobre la mediana del tiempo de SLE (DDAVP: 608 días vs. placebo: 88 días, $p < 0,001$). Tres (17%) y ocho (80%) pacientes de los mismos grupos murieron en el periodo de estudio. El análisis estadístico demostró también una diferencia significativa en la mediana del tiempo de SG entre ambos grupos (DDAVP: 809 días vs. placebo: 237 días, $p < 0,01$). Los resultados están de acuerdo con los anteriores datos de nuestro estudio piloto en perras con NGM con tumores malignos en distintos tipos histopatológicos (138).

Se observó una clara relación, entre el grado histológico de los carcinomas y la supervivencia, lo que indicaría que los tumores bien diferenciados (grado I) tienen un mejor pronóstico, confirmando lo publicado por Karayannopoulou y col., 2005 (80). La mayoría de perras con

carcinomas grado II o III que recibieron una solución placebo como tratamiento, presentaron una recaída en los primeros 100-200 días posteriores a la cirugía. El tiempo de SLE y el tiempo de SG se relacionó significativamente con el grado histológico en los animales del grupo placebo (**Figura 13**). El tratamiento perioperatorio DDAVP prolongó significativamente el periodo de SLE (**Figura 14**) y el tiempo de SG (**Figura 15**) en las perras con carcinomas de grado II o III. Si bien ningún animal tratado con DDAVP, mostró recaídas entre los portadores de neoplasias de grado I, no se observaron diferencias significativas en la SLE y SG, entre DDAVP y PLCB en estos casos con un mejor pronóstico *per se*. Se encontraron diferencias significativas en los animales DDAVP que presentaban una NGM con moderado o alto grados histológico, ya que los PLCB presentaron recaídas locales o metástasis a pulmón y muerte más rápidamente durante el período de estudio, respecto a los animales tratados con DDAVP.

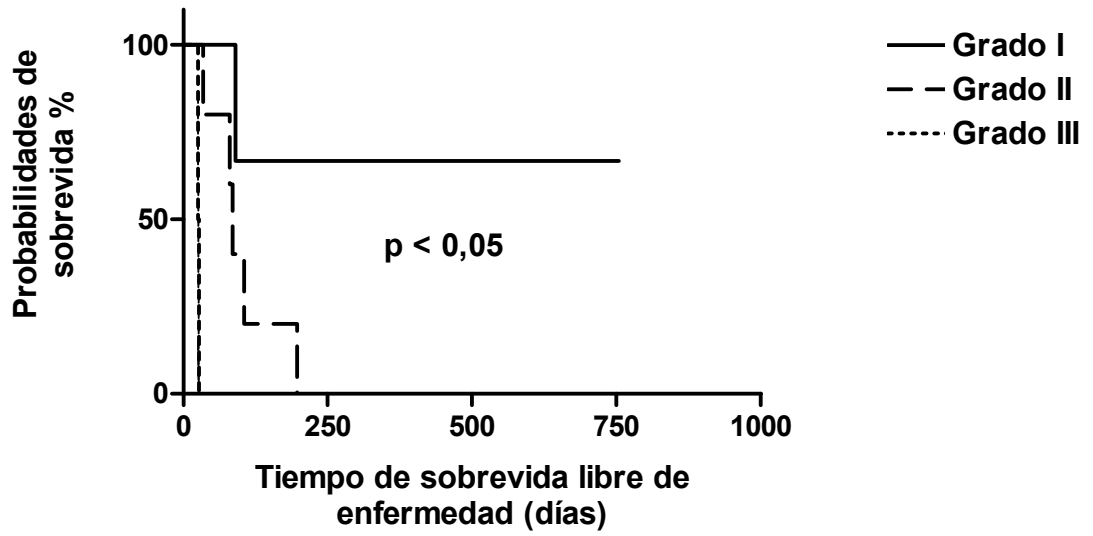
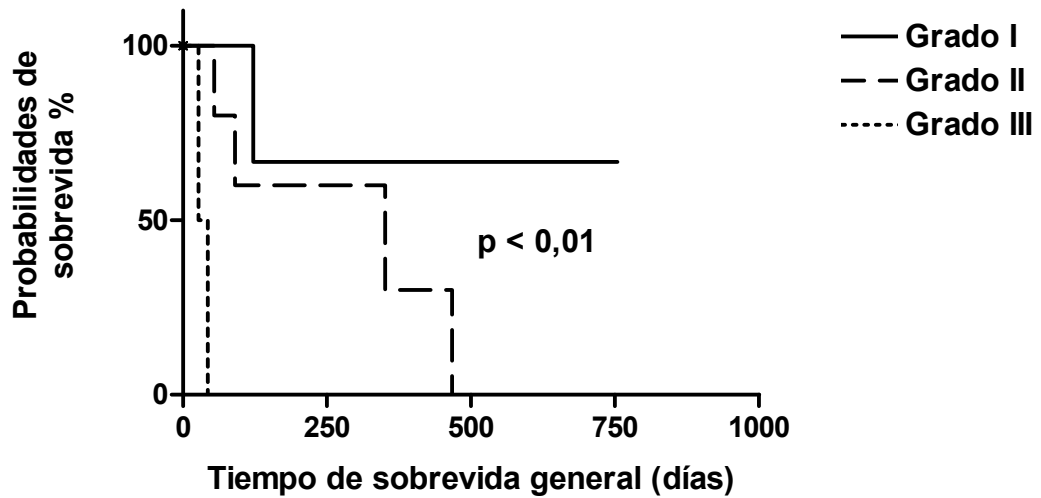
A**B**

Figura 13: Curvas de Kaplan-Meier, de acuerdo al grado histológico de los tumores, de probabilidades de tiempo de sobrevida libre de enfermedad (**A**) y de sobrevida general (**B**) de animales placebo con carcinomas localmente avanzadas.

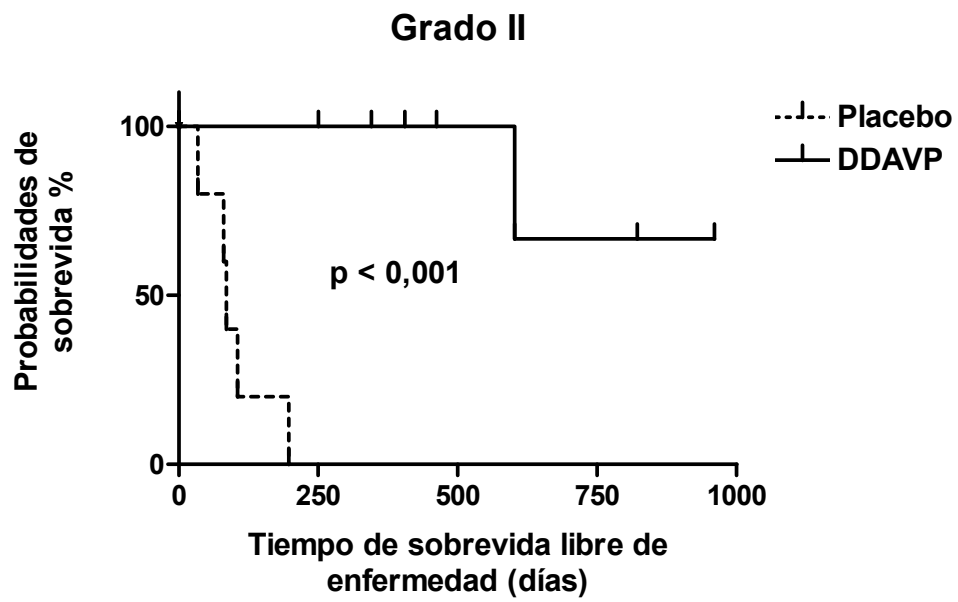
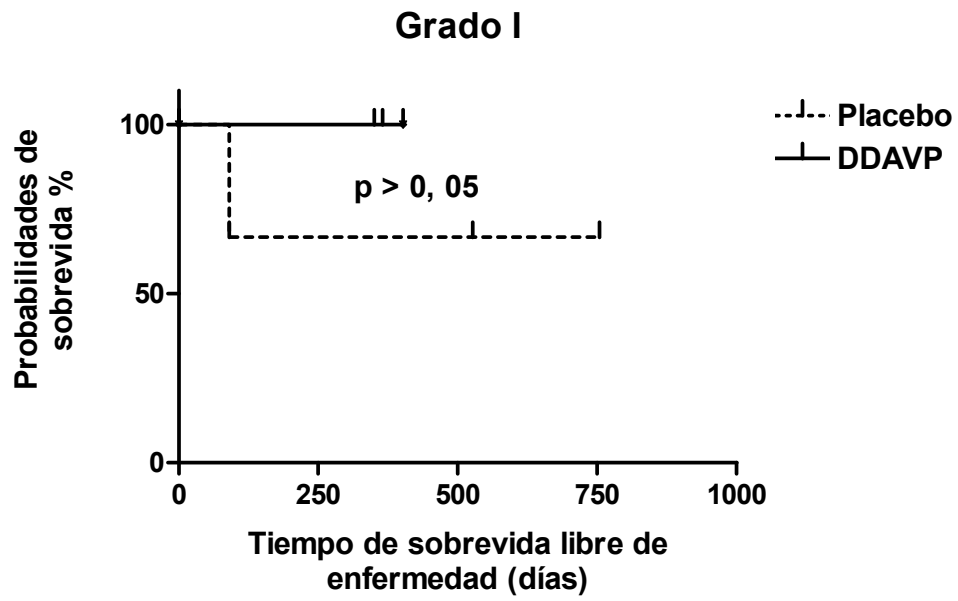


Figura 14 (referencia al final de la figura).

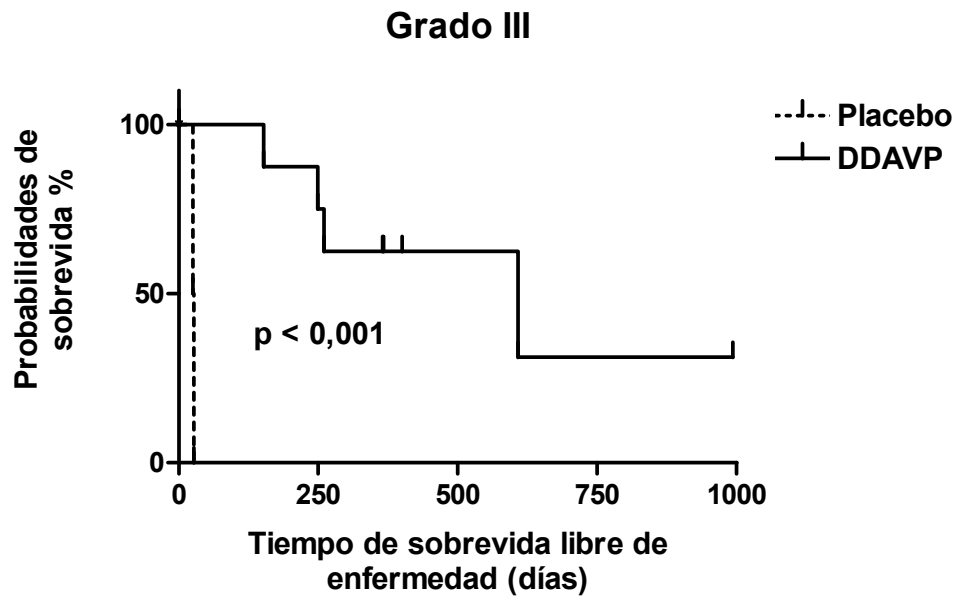


Figura 14: Curvas de Kaplan-Meier, de acuerdo al grado histológico de tumores, de probabilidades de tiempo de sobrevida libre de enfermedad de animales tratados con DDAVP o placebos con carcinomas localmente avanzados.

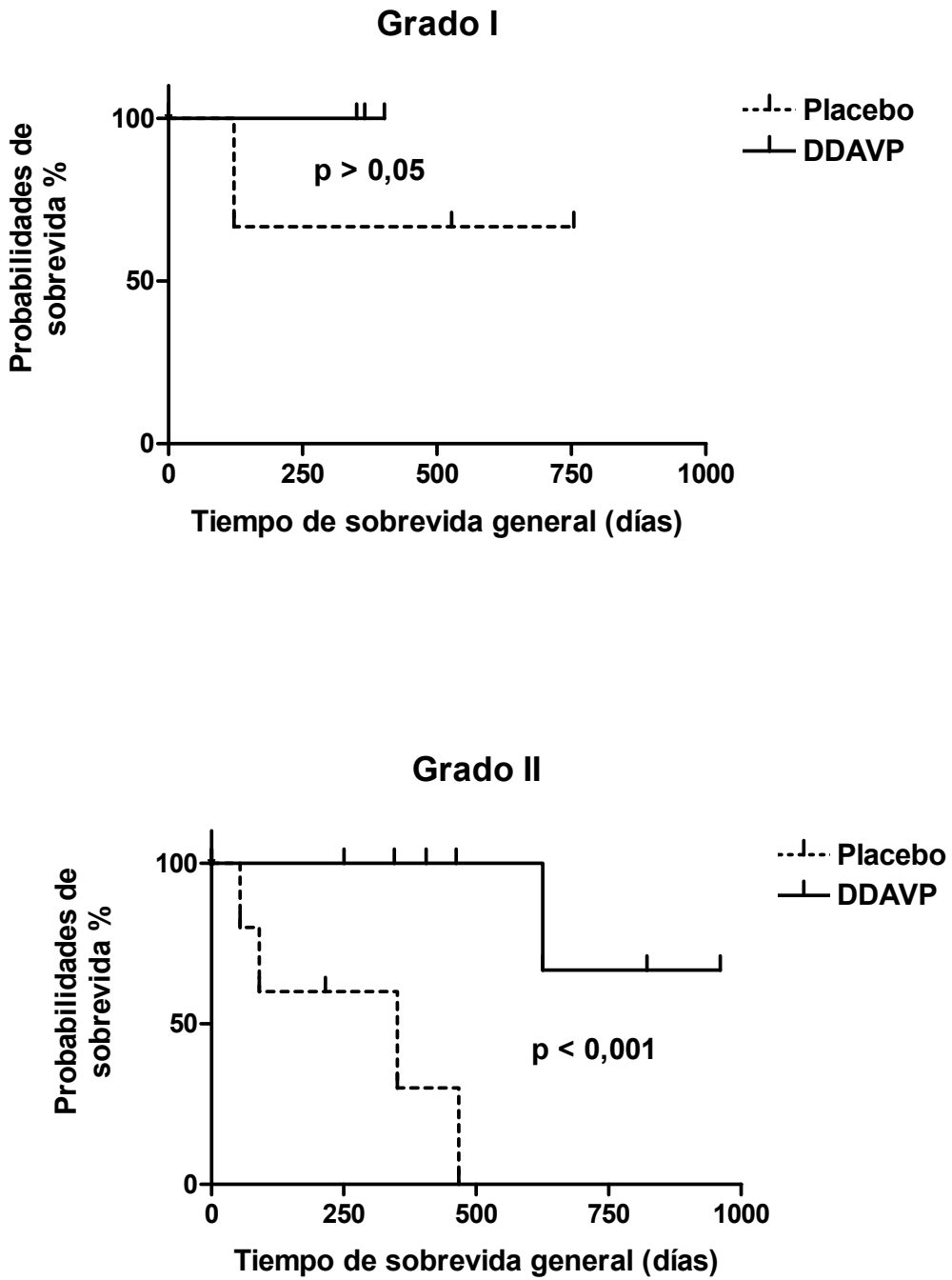


Figura 15 (referencia al final de la figura).

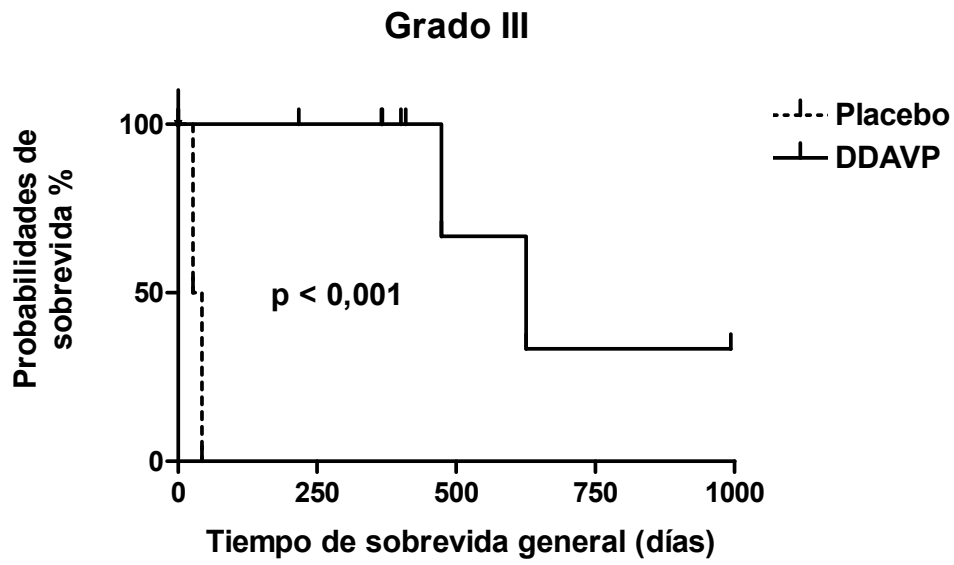


Figura 15: Curvas de Kaplan-Meier, de acuerdo al grado histológico de los tumores, de probabilidades de tiempo de sobrevivida general de animales tratados con DDAVP o placebos con carcinomas localmente avanzados.

DISCUSIÓN

Objetivo I:

En línea con reportes previos, más de la mitad de caninos portadores de tumores mamarios malignos expresaron RE y/o RP (41,104,105,109). Este hallazgo justificaría la investigación de agonistas o antagonistas (según el blanco molecular al cual iría dirigida la terapia), con actividad adyuvante o neoadyuvante para esta enfermedad.

Un hallazgo adicional digno de ser destacado es que más de la mitad de las pacientes que fueron traídas a la consulta se encontraban en estadio clínico III y una muy menor proporción de casos llegaron en estadios menores (I, II) o muy avanzados (IV). Los estadios I y II, suelen tener una SLE y una SG prolongada luego de tratamiento quirúrgico. Por su parte, los pacientes avanzados en estadio IV, tendrían menores SLE y SG aun recibiendo una terapia adyuvante. Esto identifica, al estadio clínico III, como grupo prioritario para la incorporación de nuevas propuestas antihormonales a fin de prolongar la SLE y SG.

Llama particularmente la atención la elevada expresión de RE- β en los todos los estadios. Si bien no hay unanimidad respecto a la funcionalidad de RE- β en el cáncer mamario humano ni canino, prevalecen los trabajos que demuestran que RE- β tendría un papel positivo con respecto al pronóstico de la enfermedad (104,152,154). Actualmente, drogas con actividad agonista están siendo estudiados para este blanco molecular con expectativas de modular su

proliferación en la glándula mamaria, especialmente en estrategias de quimioprevención (genisteína, TAS-108) (155,156).

En base a los resultados obtenidos en este trabajo preliminar se concluye que los RE- α , RE- β y RP están expresados en los cuatro estadios clínicos de pacientes con NGM malignas caninas.

Objetivo II

En este estudio, se han usado exclusivamente pacientes oncológicos candidatos para terapia adyuvante, es decir con neoplasias malignas de más de 3 cm, compromiso ganglionar, e invasión vascular a la histopatología (estadio clínico III; 77). En medicina humana, el uso de antiestrógenos en carcinomas mamarios con receptores de estrógenos positivos es rutinario. Sin embargo, en la perra los antiestrogénos, como se mencionó anteriormente, tienen un efecto agonista sobre el aparato genital que limita severamente su uso (157), no existiendo en la hembra canina, estudios similares usando antiprogestágenos.

Sin dudas el hallazgo más alentador de este trabajo resulta ser alto porcentaje de expresión de RP en las neoplasias malignas aquí estudiadas. Esto, alienta indefectiblemente la realización de estudios de terapéuticas orientadas a estos blancos moleculares. Como contrapartida, en este estudio y con este número de animales, no se pudo dilucidar si el aglepristone tuvo un efecto benéfico en la enfermedad oncológica mamaria. Tampoco fue posible, a través de la descripción de las isoformas del RP, vislumbrar su efecto molecular. Se observó, solamente,

una sobrevida general más prolongada en 7 animales tratados con aglepristone con menor expresión de la isoforma B de RP, lo que tendría un efecto favorable *per se* pero que no se relacionaría con el tratamiento.

En relación a los resultados obtenidos, planeamos seguir trabajando en la temática a fin de ampliar nuestro aporte antihormonal a la terapia adyuvante de las neoplasias mamarias malignas en la especie. Conociendo las dificultades de estas terapias selectivas sería interesante probar el aglepristone en estadios clínicos más bajos de la enfermedad. Otra estrategia terapéutica a investigar sería la utilización de los antiprogéstágenos en combinación a quimioterapia convencional, a dosis bajas y/o por períodos más prolongados, como complemento final de los ciclos de citotóxicos para contener la enfermedad residual.

Objetivo III

Con el número de animales aquí estudiados, este protocolo de aglepristone en el tratamiento de las metástasis de tumores de mama caninos no resultó efectivo. A pesar que uno de los animales del grupo aglepristone, presentó en el primer examen remisión parcial, no se logró observar beneficio en las siguientes observaciones.

En los tumores primarios, y especialmente en las metástasis, predominan varias vías de señalización celular (158-159) que gobiernan la progresión del tumor hacia la muerte del animal (160-161). Muchas veces al bloquear una de esas vías, el tumor puede compensar rápidamente esa vía por otra igual, o más efectiva y continuar su progresión (162-165).

Dada la dificultad operativa, para obtener muestras de metástasis antes y después del tratamiento, no podemos adjudicar una verdadera falla al aglepristone, debido a que no conocemos la inmunexpresión de RP en las metástasis de los animales estudiados. Tampoco conocemos la distribución de las isoformas predominantes y proteínas co-reguladoras, las cuales influyen fuertemente la respuesta al tratamiento.

Teniendo en cuenta que algunos casos tenían una marcada efusión pleural y edema pulmonar, podría ser posible que la droga no haya podido llegar al lugar adecuado donde tendría que producir su efecto.

Además, muchas drogas quimioterápicas manifiestan su acción produciendo cavitaciones dentro de los nódulos metastáticos. Este efecto positivo, es raramente visible por técnicas de radiología convencional, por lo que se requiere la utilización de resonancia magnetica nuclear o tomografía computada por emisión de positrones.

Conociendo los efectos positivos que demostraron algunos estudios de NGM con metástasis tratadas con antiprogéstágenos en otras especies (122,124-126), no descartamos que otro esquema de tratamiento pueda tener algún efecto beneficioso en las hembras caninas. Por lo expuesto, los resultados de este estudio preliminar no deberían frenar la continuación de la exploración del efecto de los bloqueantes de receptores hormonales en la NGM con metástasis.

Objetivo IV

El presente trabajo confirma el efecto perioperatorio beneficioso de DDAVP, sobre el tiempo de SLE y el tiempo de SG en perras con NGM localmente avanzado, corroborando nuestros resultados en un estudio piloto anterior (138). Este compuesto fué administrado como adyuvante quirúrgico, en una dosis hemostática, a razón de 1 µg/kg (143,133). En animales con NGM, la DDAVP parece ser segura en la dosis utilizada, y se obtuvieron efectos antitumorales sin manifestación clínica ni hematológica de toxicidad.

Anteriores estudios experimentales en un modelo murino, han demostrado que la manipulación de un carcinoma de mama agresivo, es un factor pertinente para el aumento de la probabilidad de diseminación locorregional y distante de las células malignas. En este modelo, la administración perioperatoria de DDAVP disminuyó significativamente el número de metástasis pulmonares luego de la manipulación (140). La aplicación de DDAVP en NGM parece mejorar la hemostasia perioperatoria y pueden contribuir a una rápida encapsulación de tejido tumoral residual, lo que limita la extravasación de células metastásicas (139). Es sabido que la inyección intravenosa de DDAVP induce una rápida liberación de diversos multímeros de FVW de las células endoteliales microvasculares, alcanzando niveles máximos a unos 60 minutos y una vida media plasmática de 8-10 hs (142,143). Un trabajo publicado por Terraube y col. (166), demostró que el FVW desempeña una función protectora en la diseminación de células tumorales hacia el pulmón, en un modelo murino. El FVW podría participar en la interacción entre las células tumorales con el subendotelio, y parece obstaculizar la reducción de metástasis, sostenida por la adhesión o la supervivencia de las células malignas en la microvasculatura en el órgano diana. En este sentido, por vía

intravenosa DDAVP impidió la agregación de células de carcinoma mamario, por lo tanto la reducción de la eficiencia del proceso metastático (139).

Además, la DDAVP es un agonista selectivo del receptor de membrana V2 de vasopresina, que se expresa en las células endoteliales y también en algunas variantes tumorales, incluido el cáncer de mama (167). Anteriormente, se había informado acerca de un efecto antiproliferativo leve de DDAVP, en una línea tumoral de carcinoma mamario (168-170). Esta acción es probable que sea mediada por los receptores V2 de señalización e implica la activación de la adenilato ciclasa, seguida por la elevación del cAMP intracelular (168). También otros autores demostraron que la vasopresina, hormona natural, puede inhibir en altas concentraciones el crecimiento in vitro de la línea celular MCF-7 de carcinoma mamario humano (170).

El pronóstico estuvo significativamente relacionado con el grado histológico de carcinomas mamarios caninos, especialmente en los casos de carcinoma simple (70). Los ajustes en el método de análisis histopatológico de carcinomas mamarios propuestos por Elston y Ellis (79), proporcionan información pronóstica de gran alcance. Este método se basa en la medición de tres parámetros histológicos (formación tubular, pleomorfismo nuclear e índice mitótico), reduciendo de esta forma los problemas de coherencia y reproducibilidad a un mínimo. En el presente estudio, el tratamiento adyuvante perioperatorio con DDAVP prolongó el tiempo de SLE y el tiempo de SG en perras con NGM moderadamente o pobremente diferenciados (grado II o III, respectivamente), mientras que el efecto no fue significativo en perras con un mejor pronóstico, o sea aquellas con carcinomas bien diferenciados (grado I). Estas observaciones indican en particular, que DDAVP

perioperatoria puede proporcionar un efecto beneficioso en pacientes con enfermedad agresiva, con alto riesgo de recurrencia y/o metástasis.

Se concluye que el uso rutinario del péptido DDAVP, con efectos hemostáticos y antitumorales, debería ser útil para minimizar la propagación o la supervivencia de las células malignas residuales, durante la cirugía de perras con tumores mamarios localmente avanzados. Nuestros resultados indican que esta terapia perioperatoria podría prolongar el tiempo de SLE y el tiempo de SG, en particular en perras con carcinomas mamarios de alto grado. En el futuro se necesitaran ensayos en gran escala, para confirmar el rol de DDAVP como un adyuvante quirúrgico seguro en el manejo de los diferentes cánceres sólidos.

CONCLUSIONES FINALES

- La técnica de inmunohistoquímica con los anticuerpos MC-20, Y-19, Ab-6, Ab-7, es de utilidad para la determinación de RE y RP en NGM de la hembra canina, así como también de sus diferentes isoformas.
- Los RE- α , RE- β y RP están expresados en los estadios clínicos I, II, III y IV de animales con NGM malignas, justificando el estudio de diferentes terapias dirigidas a estos blancos moleculares.
- Uno de los hallazgos más alentadores de este trabajo resulta ser el alto porcentaje de expresión de RP en las neoplasias mamarias malignas, no obstante, con el número de animales que aquí se trabajó no fue posible dilucidar si el agleristone tuvo un efecto benéfico y quedan pendientes mayor número de trabajos al respecto.
- La investigación y conocimiento de la expresión de RH en los diferentes estadios clínicos aportan un verdadero valor que servirá de base para el continuo estudio de drogas disponibles en el mercado veterinario, así como para el desarrollo de otras novedosas dirigidas a esos blancos moleculares.
- Previamente, habíamos demostrado, que la DDAVP, podía prolongar el tiempo de SLE y SG en perras con cáncer mamario cuando se administra en forma perioperatoria durante la extirpación quirúrgica del tumor primario. El presente trabajo confirma

nuestros resultados previos con respecto al efecto perioperatorio beneficioso de DDAVP sobre la SLE y SG en perras con NGM localmente avanzadas. Adicionalmente, aquí se comprobó que la efectividad del tratamiento y el pronóstico están relacionados con la graduación histológica del carcinoma.

- DDAVP es segura a la dosis utilizada, presenta la ventaja de ser un protocolo sencillo de aplicar en la clínica diaria de pequeños animales. No tiene potenciales efectos nocivos para el profesional actuante, ni para el medio ambiente. Si bien no hay muchos estudios en medicina veterinaria respecto al uso de drogas quimioterápicas en NGM, DDAVP podría tener similares SLE y SG al observado con este tipo de drogas, y sin efectos colaterales. Su costo es considerablemente menor a los protocolos quimioterápicos. Sin embargo, existe la posibilidad futura de llevar a cabo estudios en forma conjunta entre drogas quimioterápicas y DDAVP, para evaluar su potencial efecto adyuvante en forma concomitante respecto a sus protocolos clásicos.
- Este Trabajo de Tesis demuestra como nuevas terapias contra el cáncer, amplían los tratamientos convencionales o generan conocimientos de la biología celular y molecular. Esta información podría ser aprovechada para la investigación de nuevas drogas o esquemas de tratamiento, para esta grave enfermedad que afecta a caninos domésticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brodey RS, Goldschmidt MA, Roszel JR. Canine mammary gland neoplasms. *J Am Anim Hosp Assoc* 1983;19:61-90.
2. Moulton JE. Tumors of the mammary gland En: *Tumours in Domestic Animals*, 3rd eds. Ed. Moulton JE. University of California Press, Berkeley 1990;518-52.
3. Dobson JM, Samuel S, Milstein H, Rogers K, Wood JL. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J Small Anim Pract* 2002;43(6):240-6.
4. Schneider R. Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer* 1970;26:419-26.
5. Egenvall A, Bonnett BN, Ohagen P, Olson P, Hedhammar A, Von Euler H. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Prev Vet Med* 2005;10:109-27.
6. Lantingavan-Leeuwen IS, Van Garderen E, Rutteman GR, Mol JA. Cloning and cellular localization of the canine progesterone receptor: co-localization with growth hormone in the mammary gland. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000;31:219-28.
7. Van Garderen E, de Wit M, Voorhout WF, Rutteman GR, Mol JA, Nederbragt H, et al. Expression of growth hormone in canine mammary tissue and mammary tumors. Evidence for a potential autocrine/paracrine stimulatory loop. *Am J Pathol* 1997;150:1037-47.
8. Van Garderen E, Schalken JA. Morphogenic and tumorigenic potentials of the mammary growth hormone/growth hormone receptor system. *Mol Cell Endocrinol* 2002;29:153-65.

9. Van Garderen E, Swennenhuis JF, Hellmén E, Schalken JA. Growth hormone induces tyrosyl phosphorylation of the transcription factors Stat5a and Stat5b in CMT-U335 canine mammary tumor cells. *Domest Anim Endocrinol* 2001;20:123-35.
10. Van Garderen E, Van der Poel HJ, Swennenhuis JF, Wissink EH, Rutteman GR, Hellmén E, et al. Expression and molecular characterization of the growth hormone receptor in canine mammary tissue and mammary tumors. *Endocrinology* 1999;140:5907-14.
11. Gilbertson SR, Kurzman ID, Zachrau RE, Hurvitz AI, Black MM. Canine mammary epithelial neoplasm: Biologic implications of morphologic characteristics assess in 232 dogs. *Vet Pathol* 1983;20:127-42.
12. Okada H, Nishuma Y, Yoshino T, Grone A, Capen CC, Rosol TJ. Immunohistochemical localization of parathyroid hormone related protein in canine mammary tumors. *Vet Pathol* 1997;34:356-9.
13. Weir EC, Burtis WJ, Morris CA, Insogna KL. Isolation of a 16.000-dalton parathyroid hormone-like protein from two animal tumors causing hormonal hypercalcemia of malignancy. *Endocrinology* 1998;123:2744-51.
14. Blood CH, Zetter BR. Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Acta Bioch Bioph* 1990;1032:89-93.
15. Donnay I, Raui J, Verstegen J. Influence des antécédents hormonaux sur l'apparition clinique des tumeurs mammaires chez la chienne. Étude épidémiologique. *Ann Med Vet* 1994;138:109-17.
16. Ettinger SJ, Feldman EC. (1997) Enfermedad pituitaria hipotalamica. *Tratado de medicina interna veterinaria*. 4ta ed. Intermedica.1997;1724-40.

17. Nieto A, Perez-Alenza MD, Del Castillo N, Tabanera E, Castano M, Pena L. BRCA1 expression in canine mammary dysplasias and tumours: relationship with prognostic variables. *J Comp Pathol* 2003;128(4):260-8.
18. Tsuchida S, Ikemoto S, Tagawa M. Microsatellite polymorphism in inton 14 of the canine BRCA1 gene. *J Vet Med Sci* 2001;63:479-81.
19. Ahern TE, Bird RC, Bird AE, Wolfe LG. Expression of the oncogene c-erbB-2 in canine mammary cancers and tumor-derived cell lines. *Am J Vet Res* 1996;57:693-6.
20. Martín de las Mulas J, Ordás J, Millán Y, Fernández-Soria V, Ramón y Cajal S. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Breast Cancer Res Treat* 2003;80:363-7.
21. Matsuyama S, Nakamura M, Yonezawa K, Shimada T, Oashi F, Takamori Y, et al. Expresión Patterns of the erbB Subfamily mRNA in Canine Benign and Malign Mammary Tumors. *J Vet Med Sci* 2001;63:949-54.
22. Kubo K, Matsuyama S, Katayama K, Tsutsumi C, Yonezawa K, Shimada T, et al. Frequent expression of the c-kit proto-oncogene in canine malignant mammary tumor. *J Vet Med Sci* 1998;60:1335-40.
23. Engström W, Barrios C, Azawedo E, Möllermark G, Kängström LE, Eliason I, et al. Expression of c-myc in canine mammary tumours. *Anticancer Res* 1987;1235-7.
24. Inoue M, Shiramizu K. Immunohistochemical detection of p53 and c-myc proteins in canine mammary tumours. *J Comp Pathol* 1999;120:169-75.
25. Chu LL, Rutteman GR, Kong JM, Ghahremani M, Schmeing M, Misdorp W, et al. Genomic organization of the canine p53 gene and its mutational status in canine mammary neoplasia. *Breast Cancer Res Treat* 1998;50:11-25.

26. Haga S, Nakayama M, Tatsumi K, Maeda M, Imai S, Umesako S, et al. Overexpression of the p53 gene product in canine mammary tumors. *Oncol Rep* 2001;8:1215-9.
27. Kumaraguruparan R, Prathiba D, Nagini S. Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. *Res Vet Sci* 2006;81:218-24.
28. Lee CH, Kweon K. Mutations of p53 tumor suppressor gene in spontaneous canine mammary tumors. *J Vet Sci* 2002;3:321-5.
29. Veldhoen N, Watterson J, Brash M, Milner J. Identification of tumour-associated and germ line p53 mutations in canine mammary cancer. *Br J Cancer* 1999;81:409-15.
30. Wakui S, Muto T, Yokoo K, Yokoo R, Takahashi H, Masaoka T, et al. Prognostic status of p53 gene mutation in canine mammary carcinoma. *Anticancer Res* 2001;21:611-6.
31. Kanae Y, Endoh D, Yokota H, Taniyama H, Hayashi M. Expression of the PTEN tumor suppressor gene in malignant mammary gland tumors of dogs. *Am J Vet Res* 2006;67:127-33.
32. Lee JO, Yang H, Georgescu MM, Di Cristofano A, Maehama T, Shi Y, et al. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* 1999;29:323-34.
33. Battistacci M, Calandra ML. Quantitative measurement of metabolites of the tryptophane-niacin pathway in healthy bitches and those affected with mammary dysplasia and neoplasia. *Nuova Vet* 1974;50:246-52.
34. Hellmén E. Canine mammary tumour cell lines established in vitro. *J Reprod Fertil Suppl* 1993;47:489-99.

35. Schneider R, Dorn CR, Taylor DON. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J Natl Cancer Inst* 1969;43:1249-61.
36. Misdorp W. Progestagens and mammary tumours in dogs and cats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1991;125:27-31.
37. Sorenmo K, Shofer FS, Goldschmidt MH. Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. *J Vet Int Med* 2000;14:266-70.
38. Yamagami T, Kobayashi T, Takahashi K, Sugiyama M. Influence of ovariectomy at the time of mastectomy on the prognosis for canine malignant mammary tumors. *J Small Anim Pract* 1996;37:462-4.
39. Donnay I, Devleeschower N, Wouters-Ballman P, Leclero G, Verstegen J. Relationship between receptors for epidermal growth factor and steroid hormones in normal, dysplastic and neoplastic canine mammary tissues. *Res Vet Sci* 1996;60:251-4.
40. Martin PM, Cotard M, Mialot JP, André F, Raynaud JP. Animal models for hormone-dependent human breast cancer. Relationship between steroid receptor profiles in canine and feline mammary tumors and survival rate. *Cancer Chemother Pharmacol* 1984;12:13-7.
41. Nieto A, Pena L, Perez-Alenza MD, Sanchez MA, Flores JM, Castano M. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet Pathol* 2000;37:239-47.
42. Parodi AL, Mialot JP, Martin PM. Canine and feline mammary cancers as animal models for hormone-dependent human breast tumors: relationships between steroid receptor profiles and survival rates. *Prog Cancer Res Ther* 1984;31:357-65.
43. Rutteman GR. Hormones and mammary tumour disease in the female dog. An update. *In Vivo* 1990;4:33-40.

44. Rutteman GR, Misdorp W, Blankenstein MA, Van den Brom WE. Oestrogen (ER) and progestin receptors (PR) in mammary tissue of the female dog: different receptor profile in non-malignant and malignant states. *Br J Cancer* 1988;58:594-9.
45. Sartin EA, Barnes S, Kwapien RP, Wolfe LG. Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs. *Am J Vet Res* 1992;53:2196-200.
46. Hovey RC, Trott JF, Vonderhaar BK. Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology. *J Mamm Gland Biol Neoplasia* 2002;7:17-38.
47. Robinson GW, Hennighausen L, Johnson PF. Side-branching in the mammary gland: the progesterone-Wnt connection. *Genes Dev* 2000;14:889-94.
48. Lange CA. Integration of progesterone receptor action with rapid signaling events in breast cancer models. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;108:203-12.
49. Briggs MH. Progestogens and mammary tumours in the Beagle bitch. *Res Vet Sci* 1980;28:199-202.
50. El Etreby MF, Gräf FJ. Effect of contraceptive steroids on mammary gland of beagle dog and its relevance to human carcinogenicity. *Pharmacol Ther [B]* 1979;5:369-402.
51. El Etreby MF, Gräf KJ, Beier S, Elger W, Günzel P, Neumann F. Suitability of the beagle dog as a test model for the tumorigenic potential of contraceptive steroids. "A short review". *Contraception* 1979;20:237-56.
52. Gräf KJ, El Etreby MF. Endocrinology of reproduction in the female beagle dog and its significance in mammary gland tumorigenesis. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* 1979;222:1-34.

53. Misdorp W. Canine Mammary Tumours: protective effect of late ovariectomy and stimulating effect of progestins. *Vet Q* 1988;10:26-33.
54. Neumann F, El Etreby MF, Gräf KJ. Results of animal experiments on the clinical risks of hormone preparations. *Pharm Unserer Zeit* 1979;(3):65-77.
55. Selman P, Mol J, Rutteman G, Rijnberk A. Progestin treatment in the dog. I. Effects on growth hormone, insulin-like growth factor I and glucose homeostasis. *Eur J Endocrinol* 1994;131:413-21.
56. Stovring M, Moe L, Glattre E. A population-based case-control study of canine mammary tumours and clinical use of medroxyprogesterone acetate. *APMIS* 1997;105:590-6.
57. Weikel JH (Jr.), Nelson LW. Problems in evaluating chronic toxicity of contraceptive steroids in dogs. *J Toxic Environ Health* 1977;3:167-77.
58. Ballare C, Uhrig M, Bechtold T, Sancho E, Di Domenico M, Migliaccio A, Auricchio F, et al. Two domains of the progesterone receptor interact with the estrogen receptor and are required for progesterone activation of the c-Src/Erk pathway in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 2003;23:1994-2008.
59. Gillett C, Fantl V, Smith R, Fisher C, Bartek J, Dickson C, et al. Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Res* 1994;54:1812-7.
60. Kaltz-Wittmer CU, Klenk A, Glaessgen DE, Aust J, Diebold U, Baretton GB. FISH analysis of gene aberrations (MYC, CCND1, ERBB2, RB, and AR) in advanced prostatic carcinomas before and after androgen deprivation therapy. *Lab Invest* 2000;80:1455-64.

61. Migliaccio D, Piccolo G, Castoria M, Di Domenico A, Bilancio M, Lombardi W, et al. Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J* 1998;17:2008-18.
62. Frank DW, Kirton KT, Murchism TE, Quintan WJ, Coleman TJ, Gilbertson TJ, et al. Mammary tumors and serum hormones in the bitch treated with medroxyprogesterone acetate and progesterone for four years. *Fertil Steril* 1979;31:340-6.
63. Conneely OM, Mulac-Jericevic B, Lydon JP. Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids* 2003;68:771-8.
64. Birrell SN, Butler LM, Harris JM, Buchanan G, Tilley WD. Disruption of androgen receptor signaling by synthetic progestins may increase risk of developing breast cancer. *FASEB J* 2007;21:2285-93.
65. Mangieri J. *Oncología veterinaria*. Prensa Veterinaria Argentina. Buenos Aires. Argentina. 3a. Ed 1994;129-210.
66. Thrall DE. *Tratado de Diagnóstico Radiológico Veterinario*. Inter-Médica. Buenos Aires. Argentina. 3a. ed 2003;87-115.
67. Allen SW, Prasse KW, Mahaffey EA. Cytologic differentiation of benign from malign canine mammary tumor. *Vet Pathol* 1986;23:649-55.
68. Griffiths GL, Lumsden JH, Valli VEO. Fine needle aspiration cytologic and histologic correlation in canine tumors. *Vet Clin Pathol* 1984;13:13-7.
69. DeVita V, Chu E. Principles of Medical Oncology. En DeVita V, Hellman S, Rosenberger S. *Cancer: Principles and practice of Oncology*. 8th. ed. Lippincott-Raven. 2008; 337-49.

70. Rutteman GR, Withrow SJ, McEwen EG. Tumors of the Mammary Gland. En: Withrow SJ, Mc Ewen EG eds, Small Animal Clinical Oncology 3rd ed, WB Saunders, Philadelphia 2001;455-77.
71. Fiddler IJ. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 1978;38:2651-60.
72. Fiddler IJ. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth GHA Clowes memorial award lecture. *Cancer Res* 1990;50:6130-8.
73. Fiddler IJ. Modulation of the organ microenvironment for the treatment of cancer metastasis (editorial). *J Natl Cancer Inst* 1995;84:1588-92.
74. Fiddler IJ, Gersten DM, Hart IR. The biology of cancer invasion and metastasis. *Adv Cancer Res* 1978;28:149-250.
75. Fidler I, Hart IR. Biological diversity in metastasis neoplasms: origins and implications. *Science* 1982;217:998-1003.
76. Fidler IJ, Poste G. The cellular heterogeneity of malignant neoplasms: implications for adjuvant chemotherapy. *Semin Oncol* 1985;12:207-21.
77. Kurzman ID, Gilbertson SR. Prognostic factors in canine mammary tumors. *Semin Vet Med Surg* 1986;1:25-31.
78. Misdorp W, Else RW, Hellmen E, Lipscomb TP. 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 1990;58-9.
79. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognosis factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study, with long-term follow-up. *Histopathology* 1991;19:403-10.

80. Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC, Dessiris A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *J Comp Pathol* 2005;133:246-52.
81. Kirpensteijn J, Kik M, Rutteman GR, Teske E. Prognostic significance of a new histologic grading system for canine osteosarcoma. *Vet Pathol* 2002;39:240-6.
82. Sloane JP, Amendoeira I, Apostolikas N, Bellocqi JP, Bianchi S, Boecker W, et al. Consistency achieved by 23 European pathologists from 12 countries in diagnosing breast disease and reporting prognostic features of carcinomas. *Virchows Archiv* 1999;434:3-10.
83. Bojrab MJ, Birchard SJ, Tomlinson JL(Jr.). *Técnicas actuales en cirugía de pequeños animales*. 3rd ed. Intermedica. Buenos Aires, Argentina.1993;447-52.
84. Wilkinson GT. The treatment of mammary tumors in the bitch and a comparison with the cat. *Vet Rec* 1971;29:13-9.
85. Withrow SJ. Surgical management of canine mammary tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1975;5:495-506.
86. Hahn KA. Canine Malignant mammary neoplasia: Biologic behavior, diagnosis, and treatment alternatives. *J Am Anim Hosp Assoc* 1992;28:251-7.
87. Hahn KA. Practical indications and contraindications for tamoxifen. *Proceeding The North American Conference. Small Animal and Exotics. Orlando, Florida* 2001;665-6.
88. Simon D, Schoenrock D, Baumgärtner W, Nolte I. Postoperative adjuvant treatment of invasive malignant mammary gland tumors in dogs with doxorubicin and docetaxel. *J Vet Intern Med* 2006;20:1184-90.
89. Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC, Dessiris A. Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2001;48:85-96.

90. Ogilvie GK, Obradovich JE, Elmslie RE, Vail DM, Moore AS, Straw RC, et al. Efficacy of mitoxantrone against various neoplasms in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1991;198:1618-21.
91. Kitchell BE. Mammary tumors. En: Bonagura JD (ed). *Kirk's Current Veterinary Therapy XII*. Philadelphia, WB Saunders 1995;1098-102.
92. Morris JS, Dobson JM, Bostock DE. Use of tamoxifen in the control of canine mammary neoplasia. *Gynecol Oncol* 1993;39:82-4.
93. McRae GI, Roberts BB, Worden AC, Bajka A, Vickery BH. Long-term reversible suppression of oestrus in bitches with nafarelin acetate, a potent LHRH agonist. *J Reprod Fertil* 1985;74:389-97.
94. McLeod DA, Thrall DA. The combination of surgery and radiation in the treatment of cancer. *Vet Surg* 1989;18:1-6.
95. MacEwen EG, Harvey HJ, Patnaik AK, Mooney S, Hayes A, Kurzman I, et al. Evaluation of effects of levamisole and surgery on canine mammary cancer. *J Biol Response Mod* 1985;4:418-26.
96. Harvey HJ, Gilbertson SR. Canine mammary gland tumors. *Vet Clin North Am* 1977;7:213-9.
97. Shofer FS, Sonnenschein EG, Goldschmidt MH, Laster LL, Glickman LT. Histopathologic and dietary prognostic factors for canine mammary carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 1989;13:49-60.
98. Alenza DP, Rutterman GR, Pena L, Beynen AC, Cuesta P. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. *J Vet Int Med* 1998;12:132-9.

99. Walker KJ, Bouzubar N, Robertson J, Ellis IO, Elston CW, Blamey RW, et al. Immunocytochemical localization of estrogen receptor in human breast tissue. *Cancer Res* 1998;65:17-22.
100. Mote PA, Johnston JF, Manninen T, Tuohimaa P, Clarke CL. Detection of progesterone receptor forms A and B by immunohistochemical analysis. *J Clin Pathol* 2001; 54: 624-30.
101. Illera JC, Pérez-Alenza MD, Nieto A, Jiménez MA, Silvan G, Dunner S, et al. Steroids and receptors in canine mammary cancer. *Steroids* 2006;71:541-8.
102. Martín de las Mulas J, Ordás J, Millán M, Chacón F, De Lara M, Espinosa de los Monteros A, et al. Immunohistochemical Expression of Estrogen Receptor β in Normal and Tumoral Canine Mammary Glands. *Vet Pathol* 2004;41:269-72.
103. Martín de las Mulas J, Van Niel M, Millán Y, Ordás J, Blankenstein MA, Van Mil F, et al. Progesterone receptors in normal, dysplastic and tumorous feline mammary glands. Comparison with oestrogen receptors status. *Res Vet Sci* 2002;72:153-6.
104. Martín de Las Mulas JM, Millán Y, Dios RA. Prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Vet Pathol* 2005;42(2):200-12.
105. Millanta F, Calandrella M, Bari G, Niccolini M, Vannozzi I, Poli A. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Res Vet Sci* 2005;79:225-32.
106. Sobczak-Filipiak M, Malicka E. Estrogen receptors in canine mammary gland tumours. *Pol J Vet Sci* 2002;5:1-5.

107. Graham JC, O'Keefe DA, Gelberg HB. Immunohistochemical assay for detecting estrogen receptors in canine mammary tumors. *Am J Vet Res* 1999;60:627-30.
108. Geraldés M, Gärtner F, Schmitt F. Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. *Vet Rec* 2000;1:403-6.
109. Thuróczy J, Reisvaag GJ, Perge E, Tibold A, Szilágyi J, Balogh L. Immunohistochemical detection of progesterone and cellular proliferation in canine mammary tumours. *J Comp Pathol* 2007;137:122-9.
110. Illera JC, Pérez-Alenza MD, Nieto A, Jiménez MA, Silvan G, Dunner S, et al. Steroids and receptors in canine mammary cancer. *Steroids* 2006;71:541-8.
111. Harris JR, Lippman ME, Veronesi U, Willett W. Breast cancer. *N Engl J Med* 1992;30(5):319-28.
112. Elledge RM, Green S, Pugh R, Allred DC, Clark GM, Hill J, et al. Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR), by ligand-binding assay compared with ER, PgR and pS2, by immuno-histochemistry in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *Int J Cancer* 2000;20(2):111-7.
113. Horwitz KB, Tung L, Takimoto GS. Novel mechanisms of antiprogestin action. *Acta Oncol* 1996;35:129-40.
114. Helguero LA, Viegas M, Asaithamby A, Shyamala G, Lanari C, Molinolo AA. Progesterone receptor expression in medroxyprogesterone acetate-induced murine mammary carcinomas and response to endocrine treatment. *Breast Cancer Res Treat* 2003;79(3):379-90.
115. Wen DX, Xu YF, Mais DE, Goldman ME, McDonnell DP. The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. *Mol Cell Biol* 1994;14(12):8356-64.

116. Richer JK, Jacobsen BM, Manning NG, Abel MG, Wolf DM, Horwitz KB. Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 2002;15;277(7):5209-18.
117. Farr CJ, Easty DJ, Ragoussis J, Collignon J, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. Characterization and mapping of the human SOX4 gene. *Mamm Genome* 1993;4(10):577-84.
118. Aupperlee MD, Smith KT, Kariagina A, Haslam SZ. Progesterone receptor isoforms A and B: temporal and spatial differences in expression during murine mammary gland development. *Endocrinology* 2005;146(8):3577-88.
119. Clarke CL, Zaino RJ, Feil PD, Miller JV, Steck ME, Ohlsson-Wilhelm BM, et al. Monoclonal antibodies to human progesterone receptor: characterization by biochemical and immunohistochemical techniques. *Endocrinology* 1987;121(3):1123-32.
120. Schneider MR, Michna H, Habenicht UF, Nishino Y, Grill HJ, Pollow K. The tumour-inhibiting potential of the progesterone antagonist Onapristone in the human mammary carcinoma T61 in nude mice. *J Cancer Res Clin Oncol* 1992;118(3):187-9.
121. Montecchia MF, Molinolo A, Lanari C. Reversal of estrogen-resistance in murine mammary adenocarcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1999;54(2):93-9.
122. Vanzulli SI, Soldati R, Meiss R, Colombo L, Molinolo AA, Lanari C. Estrogen or antiprogestin treatment induces complete regression of pulmonary and axillary metastases in an experimental model of breast cancer progression. *Carcinogenesis* 2005;26(6):1055-63.
123. Schneider MR, Michna H, Nishino EL, Etreby MF. Antitumor activity and mechanism of action of different antiprogestins in experimental breast cancer models. *J Steroid Bioch Mol Biol* 1990;37(6):783-7.
124. Maudelonde T, Romieu G, Ulmann A, Pujol H, Grenier J, Khalaf S, et al. First clinical trial on the use of the antiprogestin 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 1987;55.

125. Michna H, Scheider MR, Nishino Y, El Etreby MF. (1989) The antitumor mechanism of progesterone antagonist is a receptor mediated antiproliferative effect by induction of terminal cell death. *J Steroid Biochem* 1989;34:447-53.

126. Bakker GH, Setyono-Han B, Portengen H, De Jong FH, Foekens JA, Klijn JGM. Treatment of breast cancer with different antiprogestins: preclinical and clinical studies. *J Steroid Biochem* 1990;37:789-94.

127. Horwitz KB. The molecular biology of RU 486. Is there a role for antiprogestins in the treatment of breast cancer? *Endocr Rev* 1992;13(2):146-63.

128. Philibert D. R.U. 46534 Affinité relative de liaison pour les récepteurs stéroïdiens - activité antiprogestérone in vivo. Reporte de studio interno Roussel Uclaf 1994.

129. Johnson GS, Kraus KH, Turrentine MA, Dean PW. DDAVP-induced increases in coagulation factor VIII and von Willebrand Factor in the plasma of conscious dogs. *J Vet Pharmacol Ther* 1986;9:370-5.

130. Johnston IB, Crane S. The effects of desmopressin on hemostatic parameters in the normal dog. *Can J Vet Res* 1986;50:265.

131. Kraus KH, Turrentine MA, Johnson GS. Multimeric analysis of von Willebrand factor before and after desmopressin acetate (DDAVP) was administered intravenously and subcutaneously in male beagle dogs. *Am J Vet Res* 1987;48:1376-9.

132. Nichols R. Diabetes Insipidus. In Kirk RW (ed): *Current Veterinary Therapy X*. Philadelphia. WB Saunders. 1989;973-8.

133. Papich MG. (2000) Table of common drugs: approximate dosages In: Bonagura J.D. (Ed) Kirk's Current Veterinary Therapy XIII. Small Animal Practice. Saunders, WB. Philadelphia 2000;1241-64.
134. Richardson DW, Robison AG. Desmopressin. *Ann Int Med* 1985;103:228-39.
135. Loar AS. The management of canine mammary tumors In: Kirk RW (Ed) Current Veterinary Therapy IX. Small Animal Practice. Saunders, WB. Philadelphia 1986;480-7.
136. Ogilvie GK, Reynolds HA, Richardson RC, Withrow SJ, Norris AM, Henderson RA, et al. Phase II evaluation of doxorubicin for treatment of various canine neoplasms. *J Am Vet Med Assoc* 1989;1:(195):1580-3.
137. Poirier VJ, Hershey AE, Burgess KE. Efficacy and toxicity of paclitaxel (Taxol) for the treatment of canine malignant tumors. *J Vet Int Med* 2004;18:219-22.
138. Hermo GA, Torres P, Ripoll GV, Scursoni AM, Gomez DE, Alonso DF, et al. Perioperative desmopressin prolongs survival in surgically treated bitches with mammary gland tumours: a pilot study. *Vet J* 2008;178:103-8.
139. Alonso DF, Skilton G, Farias EF, Bal de Kier Joffe E, Gomez DE. Antimetastatic effect of desmopressin in a mouse mammary tumor model. *Breast Cancer Res Treat* 1999;57:271-5.
140. Giron S, Tejera AM, Ripoll GV, Gomez DE, Alonso DF. Desmopressin inhibits lung and lymph node metastasis in a mouse mammary carcinoma model of surgical manipulation. *J Surg Oncol* 2002;81:38-44.
141. Authement JM, Boudrieau RJ, Kaplan PM. Transient traumatically induced central diabetes insipidus in dog. *J Amer Vet Med Assoc* 1989;194:683-5.
142. Kaufmann JE, Vischer UM. Cellular mechanisms of the hemostatic effects of desmopressin (DDAVP). *J Thromb Haemost* 2003;1:6682-9.

143. Mannucci PM. Desmopressin (DDAVP) in the treatment of bleeding disorders, the first 20 years. *Blood* 1997;90:2515-21.
144. Patsikas MN, Dessiris AK. The lymph drainage of the mammary glands in the bitch: a lymphographic study. *Anat Histol Embryol* 1996;25:131-43.
145. Castagnaro M, Casalone C, Bozzetta E, De Maria R, Biolatti B, Caramelli M. Tumor grading and the one-year post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *J Compar Pathol* 1998;119:263-75.
146. Reis AL, Carvalheira J, Schmitt FC, Gärtner F. Immunohistochemical study of the expression of E-cadherin in canine mammary tumors. *Vet Rec* 2003;152:621-4.
147. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 1998;11:155-68.
148. Barnes DM, Millis RR, Beex LVAM, Thorpe SM, Leake RE. Increased use of immunohistochemistry for oestrogen receptor measurement in mammary carcinoma: the need for quality assurance. *Eur J Cancer* 1998;34:1677-82.
149. Kaplan EL, Meier E. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Amer Stat Assoc* 1958;53:457-81.
150. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(3):205-16.
151. WHO Handbook for reporting results of cancer treatment. Geneva (Switzerland): World Health Organisation 1979;1-45.
152. Roger P, Sahla ME, Makela S, Gustafsson JA, Baldet P, Rochefort H. Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res* 2001;61:2537-41.

153. Shaaban AM, O'Neill PA, Davies MP, Sibson R, West CR, Smith PH, et al. Declining estrogen receptor-beta expression defines malignant progression of human breast neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2003;27:1502-12.
154. Gustafsson J.A. Estrogen receptor beta: a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol* 1999;163:379-83.
155. Adlercreutz H. Phyto-oestrogens and cancer. *Lancet Oncol* 2002;3:364-73.
156. Saji S, Hirose M, Toi M. Clinical significance of estrogen receptor β in breast cancer. *Cancer Chemoth Pharm* 2005;56:21-6.
157. Hoffmann B, Schuler G. Receptor blockers - general aspects with respect to their use in domestic animal reproduction. *Anim Reprod Sci* 2000;2:295-312.
158. Kazanietz M. Farmacología Molecular Receptores, transducción de señales y activación de genes. 2000;45-66.
159. Parker B, Sukumar S. Distant metastasis in breast cancer: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Cancer Biol Ther* 2003;2(1):14-21.
160. Misdorp W, Hart AA. Canine mammary cancer. II. Therapy and causes of death. *J Small Anim Pract* 1979;20(7):395-404.
161. Albert RE, Benjamin SA, Shukla R. Life span and cancer mortality in the beagle dog and humans. *Mech Ageing Dev* 1994;74(3):149-59.
162. Levav-Cohen Y, Haupt S, Haupt Y. Mdm2 in growth signaling and cancer. *Growth Factors* 2005;23(3):183-92.
163. London CA, Hannah AL, Zadovoskaya R, Chien MB, Kollias-Baker C, Rosenberg M, et al. Phase I dose-escalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with spontaneous malignancies. *Clin Cancer Res* 2003;9(7):2755-68.

164. Horwitz KB. How do breast cancers become hormone resistant? *J Steroid Biochem Mol Biol* 1994;49(4-6):295-302.
165. Tokunaga E, Kataoka A, Kimura Y, Oki E, Mashino K, Nishida K, et al. The association between Akt activation and resistance to hormone therapy in metastatic breast cancer. *Eur J Cancer* 2006;42(5):629-35.
166. Terraube V, Pendum R, Baruch D, Gebbink MF, Meyer D, Lenting PJ, et al. Increased metastatic potential of tumor cells in von Willebrand factor-deficient mice. *J Thromb Haemost* 2006;4:517-28.
167. North WG. Gene regulation of vasopressin and vasopressin receptors in cancer. *Exp Physiol* 2000;85:27-40.
168. Keegan BP, Akerman BL, Péqueux C, North WG. Provasopressin expression by breast cancer cells: implications for growth and novel treatment strategies. *Breast Cancer Res Treat* 2006;95:265-77.
169. Ripoll GV, Giron S, Krzymuski MJ, Hermo GA, Gomez DE, Alonso DF. Antitumor effects of desmopressin in combination with chemotherapeutic agents in a mouse model of breast cancer. *Anticancer Res* 2008;28(5A):2607-11.
170. Taylor AH, Ang VT, Jenkins JS, Silverlight JJ, Coombes RC, Luqmani YA.. Interaction of vasopressin and oxytocin with human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 1990;50:7882-6.

ANEXO I: Resultados del conteo de receptores hormonales en las muestras de tumores mamarios caninos del objetivo I

Animal	RE-α (%)	RE-β (%)	RP (%)	Estadio clínico
1	0	15	0	I
2	0	70	1,5	I
3	60	67	0	I
4	0	88	75	I
5	2,56	0	0	I
6	0	15,65	0	I
7	0	18	0	I
8	0	50	75	II
9	0	35	0	II
10	20	0	7	II
11	0	90	22	II
12	0	40	0	II
13	10	5	15	II
14	60,92	40	1,42	III
15	0	23	0	III
16	0	70	0	III
17	52,15	42	1	III
18	32	2	0	III
19	64,24	0	0,33	III
20	0	10	0	III
21	27,14	95	3,2	III
22	5	75	3	III
23	83,27	90	0	III
24	3	95	0	III
25	0	95	0	III
26	82	15	8	III
27		78	0,7	III
28	45,93	55	0	III
29	0	13	0	III
30	0	83	20	III
31	65	0	40	III
32	20	6	80	III
33	0	28	0	III
34	25	25	0	III
35	0	60	20	III
36	0	45	0	III
37	20	9	5	III
38	0	40	30	III
39	0	3	65	III
40	30	20	50	III
41	40	25	0	III
42	0	35	0	IV
43	30,75	0	0,5	IV
44	55,49	92	5,09	IV

45	10	84	5,93	IV
46	25,95	25	0	IV
47	0	0	5	IV
48	0	51	0	IV
49	0	3	60	IV
50	3	5	15	IV
51	0	0	0	IV