

Doctorado en Ciencia Animal

Tesis

Estudios sobre la población de receptores hormonales en neoplasias mamarias caninas y evaluación *in vitro* de terapias adyuvantes

Por: Vet. Micaela Andrea Benavente

Director: MV, MSc, PhD. Marcelo Alfredo Aba

Codirectora: Dra. Carolina Paula Bianchi

Facultad de Ciencias Veterinarias

U.N.C.P.B.A.

Miembros del Jurado:

Dr. Daniel F. Alonso

Dr. Enrique H. Luque

A mis papás

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer...

A mi Director Marcelo Aba, por aceptar dirigir esta tesis, por sus aportes sumamente enriquecedores, su formación, y por permitirme trabajar siempre con libertad.

A mi Co-directora Carolina Bianchi, por todo! Su paciencia, sus enseñanzas con las inmunohistoquímicas, sus consejos, aportes, y por la compañía de todos los días en el Laboratorio.

A mi querida Facultad de Ciencias Veterinarias, por ser el lugar donde aprendo día a día, y por las tantas satisfacciones que me ha dado.

A las Instituciones que financiaron esta Tesis Doctoral, CIC y CONICET, por haberme otorgado las becas.

A los evaluadores de esta Tesis Doctoral: Dres. Enrique Luque y Daniel Alonso, por sus valiosos aportes que permitieron enriquecer este trabajo de Tesis.

A la Secretaria de posgrado y Miembros de la Comisión de Doctorado, por toda la gestión llevada a cabo.

A todos los colegas de las diferentes clínicas veterinarias, que muy generosamente aportaron tumores mamarios, fundamentales para poder realizar la Tesis.

A la Empresa Chemo Romikin S.A, por colaborar desinteresadamente aportando reactivos para los ensayos *in vitro*.

A la Prof. Eva Hellmén, por haberme cedido tan amablemente la línea celular, esencial para realizar los ensayos *in vitro*.

A María Simonetti y Carolina Bianchi, por la enorme colaboración con la evaluación de las inmunohistoquímicas.

A Laura Denzoin Vulcano, por la gran ayuda que me brindó con el análisis histopatológico de las muestras tumorales.

A Fernanda Imperiale, Pedro Morán y Guillermina Dolcini, por sus enseñanzas a la hora de trabajar con cultivos celulares.

A todos los integrantes del Laboratorio de Farmacología, por permitirme hacer uso de sus equipos como si fuese una integrante más del laboratorio.

A mis queridísimas amigas de la Facultad, Cande y Cata, por ser mis compañeras de almuerzos, de charlas, de emociones y de vida.

A Andrés, mi compañero de vida, por su escucha, sus consejos, y por su amor de todos los días.

A mis hermanos, Caro y Fran, por estar siempre, y por ser lo más lindo que me dio la vida.

A mis papás, Marga y Daniel, a quienes agradezco y dedico esta Tesis, porque todo esto es posible gracias a ellos.

RESUMEN

Las neoplasias de la glándula mamaria representan el tumor más frecuente en perras enteras, siendo la edad media de aparición entre los 8 y 10 años. Las hormonas esteroides sexuales, principalmente estrógenos y progesterona, representan el principal factor de riesgo para su desarrollo, y la castración antes del segundo celo reduce el riesgo de aparición de esta neoplasia. Se ha demostrado la presencia de receptores a estrógenos (RE) y progesterona (RP) en los tumores mamarios caninos, siendo esta expresión mayor en tumores benignos comparada con tumores malignos. Sin embargo, la asociación de los RE y RP con factores clínico - patológicos, así como su valor pronóstico, se encuentran en discusión. Por otra parte, algunos estudios en humanos han revelado que además de las clásicas hormonas sexuales, otras hormonas parecen estar involucradas en el desarrollo y/o progresión de esta neoplasia. Así, se ha demostrado la presencia de los péptidos oxitocina y vasopresina, así como de sus receptores en líneas celulares de cáncer mamario humano y en carcinomas primarios de mama humanos. En la perra, al momento se desconoce la presencia de receptores a estas hormonas en los tumores mamarios.

La extirpación quirúrgica del tumor representa el tratamiento de elección para todas aquellas perras con neoplasias mamarias. Sin embargo, existe un elevado número de pacientes en los que la cirugía no es suficiente para lograr la curación, o pacientes en los que la realización de la cirugía no es posible, por lo que se hace necesaria la búsqueda de terapias adyuvantes a la cirugía o paliativas. Trabajos sobre líneas celulares de cáncer mamario humano, así como estudios *in vivo* sobre modelos murinos de cáncer mamario, han demostrado que la oxitocina y la desmopresina (análogo sintético de la hormona vasopresina) tienen la capacidad de modular el crecimiento de las células tumorales. En la perra, al momento se desconocen los efectos de estos péptidos sobre líneas de cáncer mamario canino. Por lo tanto, la presente tesis de doctorado tuvo como objetivo general aportar conocimientos acerca de la influencia del componente hormonal sobre el desarrollo de los tumores mamarios caninos, mediante el estudio de la población de receptores a hormonas esteroideas, oxitocina y vasopresina en el tejido mamario tumoral canino y la evaluación de los posibles efectos antitumorales de péptidos en una línea celular de cáncer mamario canino.

En la primera parte de la tesis doctoral se realizó una caracterización clínica y patológica de 65 tumores mamarios caninos recolectados. El estudio reveló una edad promedio de aparición de esta neoplasia de 9,4 años, indicando que ocurre mayormente en perras de edad media a adulta. Asimismo, la mayor parte de las perras se encontraban enteras al momento del diagnóstico, lo cual

brinda mayor sustento al rol fundamental que tienen las hormonas esteroides sexuales en el desarrollo de los tumores mamarios. El análisis histológico mostró que el 60% de las neoplasias fue de naturaleza maligna, siendo el carcinoma túbulo-papilar el más frecuentemente diagnosticado. El restante 40% de los tumores fue de naturaleza benigna, siendo el adenoma (simple y complejo) el tipo más comúnmente hallado. El estudio inmunohistoquímico del receptor a estrógenos α (RE α) permitió visualizar una mayor expresión en tumores benignos en comparación con malignos. Asimismo, en el grupo de tumores malignos, se observó una mayor expresión en carcinomas del tipo túbulo-papilar, así como en carcinomas de Grado Histológico de Malignidad (GHM) I. Estos resultados dan mayor sustento a la hipótesis de que la presencia del RE α se pierde conforme el tumor progresa hacia la malignidad, y que su expresión en tumores malignos se relaciona con características de baja malignidad tumoral. También se estudió la expresión del receptor a estrógenos β (RE β), observándose que su expresión ocurrió de manera similar tanto en tumores mamarios benignos como malignos. Dado que no se observó asociación alguna con los factores de valor pronóstico analizados para tumores malignos, en la presente tesis no se pudo establecer su rol en las neoplasias mamarias en caninos. Además, se estudió la presencia del RP en tumores mamarios benignos y malignos, observándose una baja expresión en ambos tipos tumorales. Cuando se evaluó su asociación con los factores clínico-patológicos, se observó una mayor expresión del RP en perras que se encontraban en estadios clínicos IV y V, permitiendo sugerir que los agentes antiprogéstágenos podrían ser de utilidad en casos de cáncer mamario avanzado.

Por otro lado, en la segunda parte de la presente tesis se demostró la presencia del receptor a oxitocina (ROT) en los tumores mamarios caninos analizados, hallazgo que representa el primer reporte acerca de la expresión de este receptor en esta neoplasia en la especie canina. El ROT se expresó tanto en tumores benignos como malignos, y en estos últimos, su expresión fue mayor en carcinomas de GHM I y II, y tendió a ser mayor en los tumores malignos positivos para el RE α . Sin bien se necesitan mayores estudios al respecto, se podría especular que, al igual que ocurre con otros receptores a hormonas, la presencia del ROT en el tumor estaría asociada con factores indicadores de buen pronóstico. Del mismo modo, los resultados del estudio inmunohistoquímico para el receptor a vasopresina V2 (RAVP V2) revelaron que el total de los tumores mamarios caninos analizados resultaron positivos a este receptor, siendo su expresión elevada en todos los casos. Para nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se reporta la presencia de este receptor en las neoplasias mamarias en caninos, y reviste importancia a la hora de utilizar moléculas como la

desmopresina, con efectos antitumorales y antimetastásicos conocidos, cuyas acciones se ejercen a través del RAVP V2.

Considerando la necesidad de investigar nuevas y más eficaces alternativas terapéuticas para el tratamiento de los tumores mamarios en caninos, en la tercera parte de la presente tesis se evaluó la capacidad antitumoral de los péptidos oxitocina y desmopresina sobre una línea celular de cáncer mamario canino. De forma previa a la realización de los ensayos *in vitro*, se evaluó la presencia del receptor a oxitocina y vasopresina V2 en la línea celular CMT-U27 de cáncer mamario canino, ya que son los sitios de unión para ejercer su acción que utilizan la oxitocina y la desmopresina, respectivamente. Las células tumorales mostraron expresión para ambos receptores, lo cual demuestra que esta línea celular es óptima para evaluar el efecto de estos péptidos. En el ensayo *in vitro* se observó que la administración de oxitocina a dosis 1000 nM inhibió la proliferación de la línea CMT-U27, lo cual coincide con reportes previos en humanos, y permite sugerir que esta hormona ejerce efectos moduladores del crecimiento de las células tumorales. Por último, se demostró que la desmopresina (1000 nM) ejerció un efecto inhibitor del crecimiento de la línea celular CMT-U27. Por tanto, la observación de una alta expresión del ROT y RAVP V2 en los tumores mamarios caninos, sumado al efecto antiproliferativo que ejercieron la oxitocina y desmopresina en una línea celular de cáncer mamario canino, permiten recomendar que se considere a estos compuestos como una opción interesante para el tratamiento de los tumores mamarios caninos, y resulta de utilidad para continuar investigando péptidos análogos a ellos con mayor capacidad antiproliferativa.

SUMMARY

Mammary gland tumors are the most frequent cancer described in female dogs, and the reported median age of occurrence ranges from 8 to 10 years. Ovarian steroid hormones, mainly estrogens and progesterone represent the main risk factor for the development of this neoplasm, and this idea is supported by the protective effect of ovariectomy. The presence of estrogen (ER) and progesterone receptors (PR) in canine mammary tumors has been described in several studies. Moreover, the expression of ER and PR is significantly higher in benign tumors compared with malignant ones. Nevertheless, information on the role of steroid hormone receptors and prognosis is inconsistent. Besides, some studies in humans have shown that apart from estrogens and progesterone, other hormones seem to be involved in the development and progression of mammary tumors. Thus, it has been demonstrated that the hormones oxytocin (OT) and vasopressin (AVP) are present in cancerous human breast tissue. Moreover, oxytocin receptor and V2 vasopressin receptor have been detected in primary breast carcinomas and in breast carcinoma cell lines. To the best of our knowledge, there are no studies regarding the expression of oxytocin receptor (OTR) and V2 vasopressin receptor (V2 AVPR) in canine mammary tumors.

Surgical excision is the first-line treatment of canine mammary tumors. However, in dogs with highly malignant mammary tumors, the probability of tumor recurrence after surgery is elevated, so adjuvant therapy is recommended. Moreover, there are some patients in which surgery is not possible, so it is important to develop palliative therapies. Studies in human breast cancer cells have shown that OT and desmopressin (a synthetic analog of AVP) can modulate cell proliferation. The antitumor properties of both peptides have also been shown in experimental mouse models of breast cancer. In the bitch, the effects of these peptides on canine mammary cancer cell lines are not known. Thus, the main objective of the present thesis was to increase the knowledge of hormonal influences in the development of canine mammary tumors, by studying the presence of estrogens, progesterone, oxytocin and vasopressin receptors in canine mammary tumor tissues, and evaluating the effects of OT and desmopressin on cell proliferation using a canine mammary cancer cell line.

In the first part of the present study, clinical and pathological features of 65 canine mammary tumors were evaluated. The results indicate that the mean age at which the mammary gland tumor was first recognized was 9.4 years. Regarding reproductive status, 76.9 % of the dogs were intact, giving further support to the idea that ovarian sexual steroid hormones are the main risk factor for the appearance of this neoplasm. Histology of the mammary gland tumors revealed that 60% of

them were malignant, and 40% were benign. Among malignant tumors, tubulopapillary carcinomas were the most frequent tumor type, and among benign tumors, adenomas (simple and complex) were the most commonly diagnosed. Regarding immunohistochemical analysis, the present study showed that ER α expression was greater in benign than in malignant tumors. Furthermore, in the group of malignant tumors, a higher ER α expression was observed in tubulopapillary carcinomas and in Grade I tumors. These observations support the hypothesis that progression towards malignancy is accompanied by a decrease in hormonal steroid dependency, and suggest that ER expression is associated with clinicopathological characteristics of low malignant potential. Besides, in the present study ER β expression was observed in both benign and malignant mammary tumors and no significant differences were found between them. In malignant tumors, no significant association was observed between ER β expression and prognostic factors, so its significance could not be elucidated in the present thesis. Regarding PR expression, the present study also revealed that there was no significant difference in PR expression between benign and malignant tumors. However, in the group of malignant tumors, a higher PR expression was detected in clinical stages IV and V, suggesting that antiprogesterins may be a useful therapy for bitches with advanced mammary cancer.

Besides, in the second part of the present thesis it was demonstrated that OTR is present in both benign and malignant tumors. To the best of our knowledge, this is the first report regarding OTR expression in canine mammary tumors. In malignant tumors, OTR expression was higher in Grade I and II carcinomas, and showed a tendency to be higher in ER α positive tumors. Although further research is needed, the present results could indicate that OTR expression in malignant tumors is associated with good prognostic factors. In a similar way, immunohistochemistry revealed that all the analyzed mammary tumors expressed the V2 AVPR, with high Total Scores in both benign and malignant types. These findings represent the first report regarding V2 AVPR expression in canine mammary tumors, and suggest that desmopressin, a peptide with antitumor properties, could be an interesting option for the treatment of V2 AVPR expressing mammary tumors.

Considering the need for new strategies for the treatment of canine mammary tumors, in the third part of the present thesis the antitumor effects of peptides oxytocin and desmopressin were investigated *in vitro*. In a preliminary study, the presence of OTR and V2 AVPR were demonstrated in the canine mammary cancer cell line CMT-U27, which indicates that this cell line is a useful *in vitro* model to evaluate the effects of these peptides. The *in vitro* assay revealed a growth inhibitory

effect with OT at 1000 nM, which is in accordance with previous studies in humans, and suggests that this hormone has growth-modulatory effects in neoplastic mammary cells. Finally, desmopressin (1000 nM) induced a significant inhibition of CMT-U27 proliferation. In conclusion, the results indicate that peptides oxytocin and desmopressin should be considered as promising compounds for the treatment of dogs with mammary tumors.

PALABRAS CLAVES

Caninos. Tumores. Glándula mamaria. Factores pronóstico. Receptores hormonales. Terapias adyuvantes. Cultivos celulares. Proliferación celular.

ABREVIATURAS

BSA: Albúmina Sérica Bovina

DAB: Diaminobencidina

DDAVP: Desmopresina

DMSO: Dimetil Sulfóxido

DO: Densidad óptica

EDTA: Acido etilendiaminotetraacético

GHM: Grado Histológico de Malignidad

GnRH: Hormona liberadora de gonadotrofinas

IHQ: Inmunohistoquímica

μL: Microlitros

μM: Micromolar

nM: Nanomolar

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

OT: Oxitocina

PBS: Buffer fosfato salino

RE α : Receptor a estrógenos α

RE β : Receptor a estrógenos β

RP: Receptor a progesterona

ROT: Receptor a oxitocina

RAVP V2: Receptor a arginina vasopresina V2

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

SEM: Error estándar

SFB: Suero Fetal Bovino

TBS: Tris buffer salino

TMC: Tumores mamarios caninos

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	5
SUMMARY	8
PALABRAS CLAVES Y ABREVIATURAS	11
INTRODUCCIÓN	15
El perro como animal de compañía	15
La glándula mamaria de la perra	16
Neoplasias de la glándula mamaria	18
Factores de riesgo de los TMC	19
Diagnóstico y pronóstico de los TMC	23
Tratamiento de los TMC	26
Expresión del RE α , RE β y RP en la glándula mamaria tumoral	30
Expresión del receptor a oxitocina y vasopresina en cáncer mamario humano y efectos de estas hormonas sobre células tumorales mamarias <i>in vitro</i>	32
OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS	34
HIPÓTESIS	35
MATERIALES Y MÉTODOS	36
Muestras tumorales	36
Estudio histopatológico	38
Estudio inmunohistoquímico de receptores hormonales	40
Análisis de imagen	41
Análisis estadístico	42
Estudios <i>in vitro</i>	42
Línea celular de cáncer mamario canino	42
Condiciones de trabajo y cultivo de la línea celular	43
Péptidos	44
Ensayo preliminar	44
Ensayo de proliferación celular	44
Análisis estadístico	46

RESULTADOS 47

PRIMERA PARTE

Estudio 1.1: Caracterización clínica e histopatológica de tumores mamarios caninos.

Reseña	47
Materiales y Métodos	48
Resultados	48

Estudio 1.2: Caracterización de la población de receptores a estrógenos α y β en tumores mamarios caninos. Asociación con parámetros clínico -patológicos de valor pronóstico.

Reseña	54
Materiales y Métodos	54
Resultados	55

Estudio 1.3: Caracterización de la población del receptor a progesterona en tumores mamarios caninos. Asociación con la expresión de RE α , RE β y parámetros clínico - patológicos.

Reseña	64
Materiales y Métodos	64
Resultados	65

SEGUNDA PARTE

Estudio 2.1: Determinación de la presencia del receptor a oxitocina en tejido mamario tumoral. Asociación con la expresión de RE α , RE β y parámetros clínico - patológicos.

Reseña	70
Materiales y Métodos	70
Resultados	71

Estudio 2.2: Estudio de la expresión del receptor a vasopresina V2 en tejido mamario tumoral canino. Asociación con la expresión de RE α , RE β y parámetros clínico - patológicos.

Reseña	76
Materiales y Métodos	76
Resultados	77

TERCERA PARTE

Estudio preliminar: Expresión del receptor a oxitocina y vasopresina V2 en una línea celular establecida de cáncer mamario canino.

Reseña	81
Materiales y Métodos	81
Resultados	82

Estudio 3.1: Efectos de la oxitocina sobre la proliferación de células mamarias tumorales caninas *in vitro*.

Reseña	83
Materiales y Métodos	83
Resultados	84

Estudio 3.2: Efectos de la desmopresina sobre la proliferación de células mamarias tumorales caninas *in vitro*.

Reseña	86
Materiales y Métodos	86
Resultados	87

DISCUSIÓN 89

CONCLUSIONES 104

PUBLICACIONES SURGIDAS DE LA TESIS 107

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 109

INTRODUCCIÓN

El perro como animal de compañía

Los primeros miembros de la familia Canidae datan de hace unos 300 millones de años, y se cree que los perros surgieron de la evolución del lobo, lo cual se supone comenzó hace 20.000 o 30.000 años. Así, el primer perro doméstico data de hace unos 12.000 años. Se sabe que el perro fue ya compañero del hombre de Neanderthal y acabó siendo el más fiel compañero del hombre de Cromagnon. Sin embargo, no se conoce exactamente cómo se llevó a efecto esta transformación del lobo en animal doméstico, ni qué utilidad encontró el hombre prehistórico en la cría del lobo, para lo cual tuvo que pasar por una serie de cambios. Una de las suposiciones es que el lobo se asoció voluntariamente al hombre durante la cacería y que como auxiliares útiles se habrían convertido finalmente en los perros domésticos. Así, ambos aprovechaban la situación: el hombre usaba al lobo cazando y como vigilante contra enemigos. A cambio, le daba de comer. Luego, el hombre comenzó a criar los perros y a utilizarlos para distintos fines como en la ayuda de la caza de otros animales, para pelea o para la guerra. Otro uso que se le dio fue el de seguridad como guardianes; hay rastros de esto desde la época de los romanos ya que existen obras de arte y esculturas donde están plasmadas figuras de perros. Si bien hasta el momento no es posible hacer afirmaciones claras acerca de los motivos por los cuales comenzó la sociedad entre el hombre y el lobo, sólo se puede decir que la estrecha relación de afinidad existente entre ambos es indiscutible desde su origen, siendo hoy en día nuestro amigo entrañable e incondicional. Actualmente, los perros son los animales de compañía por excelencia, asistiendo en algunos casos a personas con capacidades diferentes. No existe ningún animal que tenga mayor acercamiento con el ser humano que el perro, es por eso que se dice que *“el Perro es el Mejor Amigo del Hombre”*.

Por el lugar que ocupa hoy en día esta mascota en el hogar de miles de familias, se desprende la importancia de tratar sus enfermedades y dolencias, procurando siempre buscar su bienestar y mejor calidad de vida.

La glándula mamaria de la perra

La glándula mamaria es un tejido de origen ectodérmico, definida como sudorípara modificada, de tipo lóbulo-alveolar. Está compuesta por un parénquima secretor y un estroma de tejido conectivo. En la perra, al igual que en el resto de los mamíferos, la principal función de la glándula mamaria es nutrir a los neonatos y conferirles inmunidad pasiva. La leche es el producto de secreción de la glándula mamaria, y se forma en los alvéolos (también denominados acinos), que constituyen la unidad secretora básica de la glándula. El alvéolo está formado por una lámina simple de células epiteliales secretoras, dispuestas de forma circular, rodeando una cavidad central. Los alvéolos están cubiertos por una membrana basal, lechos capilares y células mioepiteliales que al contraerse fuerzan la leche desde el lumen a los conductos colectores. Numerosos alvéolos conforman el lobulillo, los cuales están rodeados por tejido conectivo y se agrupan formando lóbulos, que también presentan una cubierta de tejido conectivo. Los conductos intralobulillares se conectan con los conductos interlobulillares los cuales luego alcanzan los conductos galactóforos (Geneser, 2001).

La mayoría de las perras posee cinco pares de glándulas mamarias, pudiendo ocasionalmente tener cuatro o seis pares. Las mamas están dispuestas en dos cadenas (derecha e izquierda) y se designan como torácicas (craneal y caudal), abdominales (craneal y caudal) e inguinales. En esta especie los conductos galactóforos se abren directamente en la superficie del pezón (Prieto Ocejo, 1995).

Si bien el desarrollo de la glándula mamaria se inicia durante la etapa embrionaria, la pubertad es el período más importante y durante el cual se produce más rápidamente el desarrollo mamario, siendo las hormonas esteroides sexuales esenciales para que ocurra dicho proceso. Los esteroides ováricos tienen la capacidad de actuar como reguladores del crecimiento y la diferenciación de las células presentes en la glándula mamaria. Al llegar a la pubertad y establecerse la actividad ovárica cíclica, cuando los niveles de estrógenos son altos los conductos mamarios menores proliferan rápidamente produciéndose la elongación de los mismos, y sufren una pequeña regresión durante las restantes fases del ciclo estral. Dada la extensa fase lútea (60-65 días) que caracteriza el ciclo estral de la perra, en forma complementaria al crecimiento de los conductos, se produce un notable desarrollo lóbulo-alveolar por acción de la progesterona luteal, similar en cierto modo al que se produce durante la gestación (Prieto Ocejo, 1995).

Los efectos biológicos de los estrógenos y la progesterona sobre la glándula mamaria son mediados por receptores específicos, pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares, los cuales actúan como factores reguladores de la transcripción génica. Los estrógenos ejercen sus efectos a través de subtipos de receptores específicos, provenientes de distintos genes. El receptor a estrógenos α (RE α) fue el primero en ser descrito, y es el más ampliamente investigado (Greene *et al.*, 1986). El receptor a estrógenos β (RE β) fue descubierto varios años más tarde (Kuiper y Gustafsson, 1997), y se le han atribuido funciones diferentes a las del RE α . Ambos subtipos del RE parecen regular la transcripción de diferentes genes, e incluso ejercer acciones opuestas sobre un mismo gen (Kuiper y Gustafsson, 1997; Palmieri *et al.*, 2002). Existe un tercer y nuevo receptor de estrógenos, conocido como GPR30, el cual se encuentra en la membrana celular acoplado a proteínas G, y parece estar relacionado con las respuestas no genómicas (rápidas) a los estrógenos (Qiu *et al.*, 2003).

Por su parte, los efectos de la progesterona son mediados a través del receptor a progesterona (RP), el cual existe bajo dos isoformas, el receptor a progesterona A (RPA) y el B (RPB), ambos provenientes de un mismo gen. En base a estudios realizados *in vitro*, se demostró que ambas isoformas median las acciones fisiológicas de la progesterona, algunas de las cuales son compartidas por ambas isoformas y otras son propias de cada una de ellas (Graham y Clarke, 1997). Además, se cree que el RPA tendría una función represora sobre la acción del RPB, siendo este último un fuerte activador transcripcional (Vegeto *et al.*, 1993).

La proporción de RE α /RE β y RPA/RPB en la glándula mamaria varía como consecuencia del estado hormonal y del período del desarrollo. En un trabajo realizado por Aupperlee *et al.*, (2005) se estudió la expresión de las isoformas A y B del RP en la glándula mamaria de ratones hembra en diferentes estadios del desarrollo. Se observó que sólo la isoforma A se expresó en la glándula mamaria de hembras vírgenes inmaduras y vírgenes adultas. Por el contrario, durante la preñez, se incrementó la expresión de la isoforma B (principalmente en las células epiteliales alveolares), y la expresión de la isoforma A disminuyó. De este trabajo se desprende que la isoforma B tiene un rol predominante durante la preñez, induciendo una correcta alveologénesis mamaria. En la perra, en un estudio realizado por Donnay *et al.*, (1996), se mostró que aproximadamente el 95% de los tejidos mamaros normales caninos estudiados expresaron receptores a estrógenos y/o a progesterona. Los trabajos que han estudiado la presencia de las isoformas del RP en el tejido mamario normal, reportaron que ambas isoformas están presentes en el tejido mamario, siendo el

RPA equimolar o en algunos casos predominante sobre el RPB (Lantinga-van Leeuwen *et al.*, 2000; Gracanin *et al.*, 2012).

Neoplasias de la glándula mamaria en caninos

La palabra neoplasia proviene del griego, y significa “nuevo crecimiento”. Se la puede definir como una masa anormal de tejido con crecimiento autónomo, excesivo, incoordinado, y que persiste después de cesar el estímulo que le dio origen. La naturaleza de las neoplasias puede ser benigna o maligna, utilizándose el término cáncer para referirse a estas últimas.

Existen en la actualidad diferentes teorías para explicar el proceso de carcinogénesis. La Teoría de la Mutación Somática (TMS) ha sido la teoría dominante durante el siglo XX, y postula que el cáncer se origina cuando una célula ha acumulado múltiples mutaciones en su ADN a lo largo del tiempo. Además, esta teoría asume que el principal problema del cáncer es un control defectuoso en la proliferación celular, y que el estado normal de las células es la quiescencia, por lo que necesitan de factores que disparen la división celular (Curtis, 1965).

Otra de las teorías se relaciona con las alteraciones epigenéticas como causantes del cáncer, es decir, alteraciones en la expresión génica que no se acompañan de modificaciones en la secuencia de ADN. Los cambios epigenéticos pueden alterar la transcripción del ADN y provocar la activación o el silenciamiento aberrante de determinados genes. Uno de los principales mecanismos de alteración epigenética implicados en el cáncer es la metilación, que consiste en la unión entre un grupo metilo y el nucleótido citosina del ADN (Curtis, 1965).

Más recientemente, se ha propuesto una nueva teoría denominada Teoría del campo de organización tisular del cáncer (Sonnenschein y Soto, 2000), que postula que el cáncer se origina por una desregulación de la interacción normal existente entre los componentes de un tejido (parénquima y estroma). El cáncer representaría entonces un defecto en la arquitectura tisular. Una de las premisas de esta teoría es que las células se encuentran siempre en estado proliferativo, y no se dividen por la presencia de reguladores negativos. En la glándula mamaria, de acuerdo con la TMS, la iniciación y promoción del cáncer podría deberse a alteraciones genéticas que ocurren en las células madre expuestas a agentes carcinógenos. Esto daría lugar a la desregulación en los procesos de autorenovación celular. Según la Teoría del campo de organización tisular del cáncer, se postula que el estroma mamario sería el principal blanco donde actúan los agentes carcinógenos.

Las glándulas mamarias de la perra son asiento frecuente de tumores de diverso grado de malignidad, representando ésta la neoplasia más común en perras enteras (más del 40% del total de tumores), y el segundo tumor más común considerando ambos sexos. El perro macho también puede presentar tumores mamarios, aunque la incidencia es menor al 1%. Diversos estudios realizados en países europeos muestran una incidencia de tumores mamarios de aproximadamente 200 por cada 100.000 perras (Sleeckx *et al.*, 2011). La edad media de aparición de esta neoplasia es de 10 a 11 años (Zatloukal *et al.*, 2005). En base a criterios histológicos y biológicos se ha estimado que aproximadamente el 50% de los tumores mamarios caninos (TMC) son malignos (Misdorp, 2002). Los TMC son un padecimiento heterogéneo, tanto en su manifestación clínica, como en su comportamiento biológico. Las glándulas mamarias abdominal caudal e inguinal son las más comúnmente afectadas. Es frecuente la presentación de múltiples tumores mamarios, los cuales pueden ser del mismo o de diferente tipo histológico. Los tumores malignos más que los benignos tienden a adherirse a tejidos profundos de la piel y producir ulceración. Asimismo, suelen tener un crecimiento invasivo, pudiendo producir metástasis regional (ganglios linfáticos axilares o inguinales) o a distancia (pulmón, hueso, entre otros). Contrariamente, las perras con tumores benignos generalmente son asintomáticas, y los tumores suelen estar encapsulados. Desde el punto de vista histológico, la mayoría de los TMC son de origen epitelial (adenomas/carcinomas simples), algunos consisten en componentes epiteliales y mioepiteliales (adenomas/carcinomas complejos), unos pocos son de origen mesenquimático (sarcomas) y frecuentemente se observa una combinación de tejidos de origen epitelial y mesenquimático (tumores mixtos) (Misdorp, 2002; Lana *et al.*, 2007). Recientemente se ha postulado que los tumores malignos pueden desarrollarse a partir de tumores benignos preexistentes, al igual que ocurre en el cáncer mamario humano (Sorenmo *et al.*, 2009).

Factores de riesgo de los TMC

Edad

La edad representa uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de los TMC. Un estudio longitudinal realizado en perras Beagle halló que el riesgo comienza a aumentar significativamente a partir de los 8 años. Los tumores mamarios son raros en perras menores a 5 años, excepto que hayan recibido un tratamiento con hormonas exógenas (Sorenmo *et al.*, 2011).

Hormonas y factores de crecimiento

Los tumores mamarios, tanto en la especie canina como humana, se encuentran controlados por ciertas hormonas, por lo que reciben el nombre de neoplasias hormono-dependientes. Las principales hormonas que influyen sobre la aparición de los TMC son los esteroides sexuales (estrógenos y progesterona) sintetizados mayormente en los ovarios. Los esteroides sexuales pueden actuar como mitógenos, predisponiendo a alteraciones genéticas, y promoviendo de este modo la iniciación y el crecimiento tumoral (Sleeckx *et al.*, 2011).

Se ha reportado el efecto protector que tiene la ovariectomía practicada a edades tempranas del animal frente al desarrollo de tumores mamarios. Según la bibliografía, el riesgo de padecer tumores mamarios es de 0,05% para las perras esterilizadas antes del primer ciclo estral, de 8% para las esterilizadas después del primer ciclo y de 26% para aquellas esterilizadas después de dos o más ciclos (Schneider *et al.*, 1969). La influencia de los episodios de pseudopreñez sobre la aparición de tumores mamarios se encuentra en discusión, si bien en su mayoría se considera que no tienen efecto (Rutteman, 1990).

Asimismo, los tratamientos con hormonas exógenas han sido reconocidos como factores que incrementan la incidencia de TMC. La administración de progestágenos (utilizados comúnmente para la prevención del estro) se asocia con el incremento en la aparición de tumores mamarios benignos (Stovring *et al.*, 1997). De igual manera, los tratamientos a base de estrógenos, principalmente utilizados para la interrupción de la preñez, también se asocian con el riesgo de aparición de esta neoplasia (Rutteman, 1992). Los tumores mamarios malignos ocurren en particular durante el tratamiento con progesterona y estrógenos combinados o con altas dosis de progesterona (Misdorp, 2002).

En menor medida, otras hormonas han sido relacionadas con la aparición de tumores mamarios. La biosíntesis de la Hormona de Crecimiento (GH) inducida por la progesterona ha sido propuesta como uno de los mecanismos que podría promover la tumorigénesis mamaria en caninos. La GH estimularía la proliferación de las células epiteliales mamarias transformadas actuando de forma autócrina o parácrina (van Garderen *et al.*, 1997). El receptor de la GH ha sido detectado y descrito en tejido tumoral mamario canino (van Garderen *et al.*, 1999). Junto con el incremento de la producción de GH, se ha observado un aumento en los niveles plasmáticos del Factor de Crecimiento Insulino-simil-1(IGF-1), el cual estimularía la proliferación celular mamaria (Mol *et al.*, 1997). Recientemente se ha estudiado el valor pronóstico de la GH y del IGF-1, determinando su

concentración tanto sérica como intra tumoral en neoplasias mamarias caninas, observándose concentraciones elevadas de ambas hormonas en tumores malignos, las cuales se asociaron con la aparición de metástasis, con tiempos de supervivencia reducidos y por lo tanto, mal pronóstico (Queiroga *et al.*, 2010a).

En cuanto al rol de la prolactina, es sabido que esta hormona no sólo participa en la lactogénesis sino que también actúa como factor de crecimiento, siendo importante para el desarrollo epitelial mamario. La administración de esta hormona a ratones provocó un incremento en el rango de aparición de tumores mamarios (Wennbo *et al.*, 1997). En trabajos realizados por Queiroga *et al.*, (2005) se observó que perras con tumores mamarios tenían concentraciones séricas de prolactina significativamente más elevadas que perras sanas. Además, los niveles de prolactina en el tejido mamario, fueron más elevados en tumores malignos comparados con los benignos y con la glándula mamaria sana. Se postula que las células neoplásicas mamarias podrían sintetizar prolactina, la cual tendría un efecto autócrino sobre ellas, y un efecto parácrino sobre las células adyacentes, ya sean normales o neoplásicas.

Raza y predisposición genética

Los tumores mamarios pueden aparecer en perras de cualquier raza, pero algunas de ellas parecen tener una mayor predisposición a padecerlos que otras. Las razas reportadas con mayor riesgo varían dependiendo del área geográfica en la que se haya realizado el estudio, pero las mayormente citadas incluyen el Poodle, Yorkshire Terrier, Cocker Spaniel, Pastor Alemán y Dachshund (Yamagami *et al.*, 1996; Egenvall *et al.*, 2005; Zatloukal *et al.*, 2005).

Numerosos estudios tanto en humanos como en perras se han focalizado en la investigación de los genes supresores del tumor y los proto-oncogenes y su rol en la carcinogénesis mamaria. Uno de los genes supresores tumorales más ampliamente investigado es el gen p53, el cual codifica una proteína cuya función es regular la replicación del ADN, la proliferación celular y la muerte celular, impidiendo la propagación de células dañadas genéticamente. En las células que presentan mutaciones en el gen p53, el ADN no puede ser reparado ni iniciar la apoptosis, apareciendo células mutantes. Las mutaciones y la sobreexpresión del gen p53 representan la alteración genética más frecuentemente encontrada en cáncer humano y canino (Muto *et al.*, 2000; Bertheau *et al.*, 2013). Más aún, su sobreexpresión parece asociarse con un alto potencial maligno y con pobre pronóstico para los pacientes (Falette *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2004; Dolka *et al.*, 2016). Asimismo, las

alteraciones en el gen supresor tumoral BRCA1 (Breast Cancer 1) parecen estar involucradas en el desarrollo de algunos TMC. Se ha observado una baja expresión de BRCA1 en tumores benignos y más aún en tumores malignos, comparado con mamas normales y displásicas. Además, la ausencia de BRCA1 se asoció con indicadores de malignidad, como un alto índice mitótico y tumores negativos para el RE α , lo cual sugiere que BRCA1 participaría en el comportamiento maligno de esta neoplasia en caninos (Nieto *et al.*, 2003; Im *et al.*, 2013).

Los proto-oncogenes son genes normales responsables de regular la proliferación y diferenciación celular, pero en su forma mutada promueven la transformación neoplásica de las células. Ejemplos de estos genes involucrados en la carcinogénesis mamaria son c-MYC, c-RAS y c-erbB-2. Este último codifica una glicoproteína receptora con actividad tirosina quinasa, denominada Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal (ErbB-2 o HER2). Aproximadamente el 30% de los tumores mamarios malignos en la mujer presentan una sobreexpresión de la proteína HER2. Esta sobreexpresión se correlaciona con características de malignidad tumoral, como el desarrollo de metástasis y la resistencia del tumor a drogas quimioterápicas (Ross y Fletcher, 1998). En caninos, algunos trabajos han observado que la sobreexpresión del HER2 en tumores mamarios malignos se asocia con un elevado índice mitótico, lo que lleva a una rápida progresión tumoral y a una corta sobrevida global (Rungsipipat *et al.*, 1999).

Obesidad y dieta

Algunos estudios en humanos han demostrado que la obesidad, así como una dieta alta en grasas, son factores que incrementan el riesgo de cáncer mamario, sobre todo en mujeres postmenopáusicas, y que el tejido adiposo influye sobre los niveles séricos y la biodisponibilidad de los estrógenos. Este riesgo estaría relacionado con la conformación corporal de la grasa, de manera que la distribución de la grasa principalmente abdominal, se asocia con un aumento del riesgo de cáncer, incluso independientemente del grado de obesidad. La conformación del tejido adiposo en la mujer está influida por factores hormonales, por lo que el incremento del riesgo según la distribución grasa sería debido al aumento de los niveles de estrógeno metabólicamente activo asociado al acúmulo de grasa en la zona abdominal, y a la capacidad del tejido adiposo de aromatizar los andrógenos convirtiéndolos en estrógenos (Siiteri, 1987; Cleary *et al.*, 2010).

En la perra, un estudio encontró que el riesgo de desarrollar tumores mamarios era menor en aquellas que habían sido delgadas entre los 9 y 12 meses de edad (Sonnenschein *et al.*, 1991).

Posteriormente, Pérez-Alenza *et al.*, (1998) reportaron que la existencia de obesidad en los primeros años de vida o un año anterior al momento del diagnóstico del tumor mamario, así como el consumo habitual de dietas caseras con alto contenido graso se relacionan con una mayor incidencia de neoplasias mamarias.

Diagnóstico y pronóstico de los TMC

La evaluación clínica de las perras con tumores mamarios debe incluir la anamnesis y el examen físico general y particular, teniendo en cuenta la signología, el estado general del paciente, el ritmo de crecimiento del tumor, la recurrencia, tamaño, localización, consistencia, número de mamas afectadas, modo de crecimiento, ulceración, adherencia a planos profundos de la piel y deformación del pezón. Los ganglios linfáticos regionales (axilares e inguinales) deben explorarse, en busca de aumentos de tamaño y/o de consistencia. Para confirmar su afectación, se debe realizar una citología mediante punción con aguja fina. Es fundamental realizar radiografías torácicas en todas las perras con tumores mamarios, ya que el principal sitio de metástasis a distancia de esta neoplasia es el tórax (Misdorp, 2002; Sorenmo *et al.*, 2011). La obtención de datos sobre el tamaño tumoral, el estado de los linfonodos regionales y la presencia de metástasis a distancia permiten adjudicarle un estadio clínico a cada paciente, el cual tiene utilidad pronóstica y permite planificar las opciones de tratamiento. El sistema más empleado es el TNM (tumor, nódulo linfático, metástasis) de la World Health Organization, y clasifica a las perras en 5 estadios clínicos, siendo el I el que se asocia con mejor pronóstico (Owen, 1980).

El método de elección para realizar el diagnóstico definitivo consiste en el examen histológico de la biopsia escisional. Para realizar la clasificación histológica se tiene en cuenta el tejido de origen y el comportamiento de las células que forman parte del tumor. La clasificación para los TMC más empleada es aquella presentada por la World Health Organization (Misdorp *et al.*, 1999). Más recientemente, se ha propuesto una nueva clasificación, en la que se incluyen nuevos subtipos histológicos, como el comedocarcinoma y el carcinoma micropapilar invasivo (Goldschmidt *et al.*, 2011). La mayoría de los tumores mamarios malignos son designados como carcinomas (neoplasias de origen epitelial), mientras que los sarcomas (neoplasias de origen mesenquimático) como los fibrosarcomas, osteosarcomas o sarcomas de otro tipo representan la minoría. Algunos tumores malignos están compuestos por células que morfológicamente recuerdan

al tejido epitelial y células que se asemejan a elementos de tejido conectivo; estos tumores, poco comunes, son llamados carcinosarcomas (en algunos sistemas, tumor mixto maligno). Los tumores benignos incluyen adenomas simples y complejos, fibroadenomas, y tumores mixtos (relativamente común), este último tiene un componente epitelial y un componente mesenquimal de cartílago y/o hueso y/o tejido adiposo, posiblemente originados de células stem pluripotentes (Lana *et al.*, 2007).

Debido a la elevada incidencia de los TMC, es imprescindible conocer aquellos factores, tanto clínicos como patológicos que permiten establecer un pronóstico inicial y definir un tratamiento adecuado para cada paciente. Dentro de los factores clínicos considerados de valor pronóstico, la edad avanzada al momento del diagnóstico se relaciona con un corto período de supervivencia. Otros parámetros indicadores de malignidad y pobre pronóstico son el crecimiento rápido e invasivo del tumor, la adherencia del mismo a la piel y a tejidos subyacentes, el gran tamaño tumoral (mayor a 5 cm de diámetro) y la ulceración de la piel. La presencia de metástasis a linfonodos regionales y a distancia también son indicadores de mal pronóstico (Hellmén *et al.*, 1993; Pérez-Alenza *et al.*, 2000; Sorenmo *et al.*, 2011). Como fuera previamente mencionado, la determinación del estadio clínico de los TMC ayuda a determinar el pronóstico. Se ha reportado que aquellas perras que se encuentran en un estadio clínico avanzado (IV o V) tienen una esperanza de sobrevida significativamente menor comparado con aquellas en estadio menos avanzado (Philibert *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2005).

Con respecto a los factores patológicos, el tipo histológico es el primero a tener en cuenta. De todos los subtipos histológicos, el carcinoma inflamatorio es el de peor pronóstico, y es considerado el tumor más agresivo, con un promedio de sobrevida de 25 días tras el diagnóstico. Los sarcomas, así como los tumores mixtos malignos se asocian con mal pronóstico. Dentro de los carcinomas simples, los pacientes con carcinomas anaplásicos o sólidos, tienen un tiempo de sobrevida significativamente más corto que aquellos con carcinomas tubulares o papilares. Por su parte, los carcinomas *in situ* y los complejos representan los de mejor pronóstico (Misdorp *et al.*, 1999; Philibert *et al.*, 2003). Los tumores benignos en principio se asocian a buen pronóstico, siempre que se extirpen en su totalidad, ya que si no se extirpan pueden progresar hacia un tumor maligno.

Luego del tipo histológico, es importante conocer el grado histológico de malignidad (GHM), el cual es una medida de la agresividad y diferenciación del tumor y de su tendencia a

metastatizar. Si bien existen varios sistemas propuestos para la graduación histológica, el más empleado es el Método de Elston y Ellis, (1991), también conocido como método de Nottingham, el cual es utilizado en medicina humana para la graduación del cáncer mamario, y ha sido modificado para su uso en caninos (Karayannopoulou *et al.*, 2005; Goldschmidt *et al.*, 2011). Este sistema utiliza tres criterios histológicos para la asignación del grado: la formación de túbulos, el pleomorfismo nuclear y el recuento de figuras mitóticas. Cada criterio recibe una puntuación de 1 a 3, y luego la suma del puntaje determina el grado histológico de malignidad. El grado I indica que el tumor es bien diferenciado, y por ende, menos agresivo y con mejor pronóstico que los tumores de grado II (moderadamente diferenciados) y grado III (pobrementemente diferenciados).

La evaluación de la proliferación celular también es de utilidad para predecir el comportamiento biológico del tumor y su potencial maligno. Se ha demostrado que una alta expresión del marcador Ki-67 en el tumor mamario se correlaciona con el desarrollo de metástasis a distancia y bajos rangos de supervivencia (Peña *et al.*, 1998; Ferreira *et al.*, 2009). Las mutaciones y la sobreexpresión del gen supresor tumoral p53 en los TMC también se han asociado con indicadores de malignidad tumoral y pobre pronóstico (Lee *et al.*, 2004).

El proceso de angiogénesis es de vital importancia en el crecimiento e invasión tumorales y en el desarrollo de metástasis. El estudio de la angiogénesis se puede realizar estimando la densidad vascular en los tejidos mediante diferentes marcadores, lo que se conoce como densidad microvascular (DMV). La DMV ha sido estudiada en relación con parámetros clínico-patológicos y con la evolución de perras con tumores mamarios, documentándose que el incremento en la DMV se correlaciona con recurrencias locales, metástasis a linfonodos, tumores poco diferenciados, y mal pronóstico (Graham y Myers, 1999; Restucci *et al.*, 2002).

Otro factor que ha sido investigado en relación a su valor pronóstico en los TMC es la presencia de la ciclooxigenasa-2 (COX-2). La enzima ciclooxigenasa participa en la biosíntesis de prostaglandinas (PGs) y tromboxanos. La isoforma 2 de la ciclooxigenasa es inducida por factores de crecimiento, estímulos inflamatorios y promotores tumorales, entre otros. En el tumor, las PGs parecen incrementar la proliferación celular, inhibir la apoptosis de las células tumorales, e incrementar la invasión y metástasis (Fosslien, 2001). En la especie canina, se ha documentado que la expresión de la COX-2 está incrementada en varios tipos de cánceres, incluido el mamario. Además, la elevada expresión de COX-2 se relaciona con tumores poco diferenciados, gran tamaño

tumoral y presencia de ulceración de la piel (Heller *et al.*, 2005). Por último, niveles altos de COX-2 se han asociado con el desarrollo de metástasis a distancia y mal pronóstico (Queiroga *et al.*, 2010b).

Del mismo modo, otros marcadores moleculares están siendo investigados, como la sobreexpresión de HER2 en los tumores malignos (Kim *et al.*, 2011), o la presencia del gen supresor tumoral BRCA1 y su valor pronóstico en los TMC (Nieto *et al.*, 2003).

Por último, se ha reportado que la presencia de RE y RP en el tumor tiene valor pronóstico. Así, algunos autores han encontrado que una baja expresión de receptores se asocia con elevada malignidad tumoral y mal pronóstico (Nieto *et al.*, 2000; Martín de las Mulas *et al.*, 2005). Sin embargo, aún no existe un consenso general al respecto (ampliado en la sección “*Expresión del RE α , RE β y RP en la glándula mamaria tumoral canina*” de la presente Tesis).

Tratamiento de los TMC

El tratamiento de elección para los tumores mamarios tanto en humanos como en caninos es quirúrgico. Las excepciones a este tratamiento son aquellos casos en que exista metástasis a distancia, mal estado general del animal o ante la presencia de un carcinoma inflamatorio, cuyo curso clínico es fulminante (Peña *et al.*, 2003). La modalidad a seguir dentro de la cirugía dependerá del tamaño tumoral, la ubicación, el número de tumores, el estado del linfonodo drenante, la edad y el estado general del animal. Las diferentes técnicas quirúrgicas incluyen: nodulectomía, mastectomía simple, mastectomía regional y mastectomía uni o bilateral. La cirugía debe ser seguida del examen histopatológico del tejido tumoral, para determinar si el tumor en cuestión es benigno o maligno, el tipo histológico y el grado de malignidad. El tratamiento quirúrgico es curativo en aquellas perras con tumores benignos y en aproximadamente el 50% que presentan tumores malignos. El restante 50% de los pacientes con tumores malignos podrían beneficiarse con tratamientos adyuvantes que reduzcan las probabilidades de recidiva del tumor y la aparición de metástasis (Lana *et al.*, 2007).

La quimioterapia se emplea frecuentemente como terapia adyuvante post quirúrgica en mujeres con cáncer mamario agresivo, con el objetivo de erradicar las micrometástasis e incrementar el período libre de enfermedad y de supervivencia total. Sin embargo, la efectividad de la quimioterapia en perras con cáncer mamario es controvertida. Karayannopoulou *et al.*, (2001) reportaron un aumento en el tiempo de supervivencia en perras tratadas con cirugía más quimioterapia

basada en 5 - fluorouracilo combinado con ciclofosfamida, comparado con aquellas tratadas únicamente con cirugía. Otros autores evaluaron la combinación de doxorubicina más docetaxel en perras con tumores mamarios malignos, no observándose un incremento en la supervivencia de las pacientes (Simon *et al.*, 2006). El uso de mitoxantrona en combinación con vincristina y ciclofosfamida duplicó el tiempo de supervivencia en perras con carcinoma inflamatorio, en comparación con aquellas tratadas únicamente con terapia paliativa (Clemente *et al.*, 2009). Más recientemente, se reportó un aumento significativo en la supervivencia global de perras con cáncer mamario tratadas con cirugía más carboplatino e inhibidores de COX-2, en comparación con las perras tratadas sólo con cirugía (Lavalle *et al.*, 2012).

La radioterapia es utilizada como tratamiento local de elección en mujeres con cáncer mamario inflamatorio, o en aquellas con cáncer no inflamatorio con altas probabilidades de recidiva local y/o regional. En la perra, la efectividad de la radioterapia aún no ha sido evaluada, pero podría ser una buena opción terapéutica en pacientes con tumores resecados en forma incompleta, con enfermedad metastásica, y en aquellas con carcinoma mamario inflamatorio.

El beneficio de la ovariectomía (OVH) realizada al momento de la extirpación quirúrgica del tumor mamario sobre la supervivencia general de las perras se encuentra en discusión. En un estudio realizado por Yamagami *et al.*, (1996) se observó que la OVH no tuvo efecto sobre la supervivencia de pacientes que presentaban tumores mamarios malignos. Contrariamente, un trabajo posterior reportó que aquellas perras que eran ovariectomizadas al momento de la remoción del tumor mamario o dentro de los 2 años de desarrollado el tumor tenían una supervivencia significativamente mayor que aquellas que no eran ovariectomizadas (Sorenmo *et al.*, 2000). Recientemente, un estudio demostró que la OVH realizada al momento de la remoción del tumor mamario, redujo el riesgo de recidiva en aquellas perras con carcinomas mamarios positivos para el RE α y de GHM II (Kristiansen *et al.*, 2015).

En la mujer, la terapia hormonal con drogas antiestrogénicas para el tratamiento del cáncer mamario resulta efectivo en muchos casos. El tamoxifeno es uno de los antiestrogénicos más conocidos y utilizados, y se indica luego de la cirugía de tumores positivos para el RE α (Platet *et al.*, 2004). Sin embargo, esta droga tiene la desventaja de producir efectos no deseados debido a que mientras que en la glándula mamaria actúa como antiestrogénico, en otros tejidos (útero, oviducto, vagina y vulva) imita su acción (es decir, actúa como agonista estrogénico) (Hoffmann y Schuler, 2000). En la perra, el uso de tamoxifeno no está aconsejado debido a que produce una gran variedad

de efectos adversos, entre los que se incluyen edema y descargas vulvares, cambios comportamentales y piómetra (Tavares *et al.*, 2010).

Los antagonistas de la progesterona (antiprogestágenos), se proponen como una opción terapéutica adyuvante para los tumores de mama positivos para el RP. Al momento, un trabajo *in vitro* demostró que los antiprogestágenos mifepristone y onapristone inhibieron la proliferación de la línea celular CMT-U27 de cáncer mamario canino (Guil-Luna *et al.*, 2014). Un estudio más reciente reportó un incremento en el período libre de enfermedad de perras con tumores mamarios malignos positivos para el RP tratadas con aglepristone como tratamiento adyuvante (Guil-Luna *et al.*, 2016). No obstante, nuevos estudios son necesarios para confirmar su eficacia en el manejo de los TMC.

En la mujer, el uso de fármacos agonistas de la GnRH resulta efectivo en el tratamiento del cáncer mamario hormono-dependiente. Los agonistas de la GnRH, cuando son administrados a dosis sostenidas en el tiempo, actúan inhibiendo reversiblemente el eje gonadal. En la perra, la Goserelina administrada cada 21 días durante 12 meses, redujo significativamente el tamaño tumoral e incrementó el período libre de enfermedad de las perras tratadas (Lombardi *et al.*, 1999).

Dado que los TMC expresan elevados niveles de la enzima COX-2, y que esta expresión se relaciona con una elevada malignidad tumoral (Millanta *et al.*, 2006), algunos estudios han evaluado la eficacia del tratamiento con inhibidores de COX-2, ya sea solos o en combinación con quimioterapia. En un trabajo realizado en perras con carcinoma inflamatorio, los autores observaron una mejora de la calidad de vida así como un incremento de la supervivencia en aquellos animales tratados con piroxicam, comparado con las perras tratadas sólo con quimioterapia (De M Souza *et al.*, 2009). Recientemente, se reportó un incremento significativo en el período libre de enfermedad y sobrevida global de perras con cáncer mamario tratadas con firocoxib (inhibidor de la COX-2) como terapia adyuvante, comparado con perras tratadas con quimioterapia (mitoxantrona) o únicamente con cirugía (Arenas *et al.*, 2016).

Recientemente, se ha investigado la desmopresina (1-deamino-8-D-arginina vasopresina, también conocida como DDAVP) en el tratamiento de los TMC. La DDAVP es un análogo sintético de la hormona antidiurética, también conocida como arginina vasopresina (AVP). Este compuesto ejerce sus efectos uniéndose al receptor de membrana de tipo 2 de la vasopresina, siendo por tanto un agonista V2 (Birnbaumer, 2010). La DDAVP tiene efectos hemostáticos, provocando la liberación del activador tisular del plasminógeno, Factor de von Willebrand y Factor VIII de la

coagulación. Es a causa de estas propiedades que la DDAVP ha sido utilizada en procedimientos quirúrgicos que cursen con diátesis hemorrágicas (Mannucci, 1997). Además de esta propiedad, en estudios realizados en roedores con carcinomas mamarios se ha observado que la DDAVP aplicada de forma perioperatoria, tiene la capacidad de impedir la diseminación de células tumorales y contribuye a la encapsulación del tejido tumoral (Girón *et al.*, 2002). También se ha reportado que la DDAVP puede modular el crecimiento tumoral y la secreción de urokinasa (enzima profibrinolítica) en cultivos de células tumorales mamarias de ratones (Alonso *et al.*, 1997). Algunos estudios *in vitro* han demostrado que el tratamiento de la línea celular de cáncer mamario humano MCF-7 con DDAVP induce la formación de angiostatina, un inhibidor natural de la angiogénesis, siendo esto importante para evitar la neoformación de vasos sanguíneos necesarios durante el proceso de metástasis (Ripoll *et al.*, 2008). Más recientemente, la DDAVP ha sido evaluada en un ensayo clínico de fase II como terapia adyuvante en mujeres con carcinomas mamarios y sometidas a cirugía. El tratamiento con DDAVP antes y después de la cirugía, redujo el sangrado intraoperatorio, produjo un aumento en los niveles del vWF, y provocó una caída en los niveles de células tumorales circulantes (Weinberg *et al.*, 2015).

En la perra, se ha realizado un estudio clínico sobre pacientes con cáncer mamario (Hermo *et al.*, 2008) a las cuales se les administró DDAVP a dosis de 1 mcg/kg endovenosa en forma perioperatoria, observándose posteriormente un mayor período libre de enfermedad y de supervivencia global en comparación con las perras que recibieron el placebo. Teniendo en cuenta las propiedades antitumorales de DDAVP, este compuesto podría ser un excelente candidato como adyuvante durante la cirugía de tumores mamarios malignos en caninos.

Por último, existen otras terapias en experimentación las cuales tienen diferentes blancos de acción, y si bien algunas de ellas están bien estudiadas en humanos, aún faltan estudios en perras. Se ha demostrado que las células cancerosas requieren de grandes concentraciones de colesterol y sus precursores para vivir y crecer. Por lo tanto, inhibiendo la síntesis de colesterol o restringiendo su disponibilidad se podría inhibir el crecimiento de las células tumorales. La lovastatina es un inhibidor sintético de la enzima reductasa (necesaria para la formación del mevalonato, precursor de varios compuestos incluyendo el colesterol) y por tanto, sería eficaz en el tratamiento anti-tumoral (Farina *et al.*, 2002). Los inhibidores de la aromatasa (enzima que transforma los andrógenos en estrógenos) son otro grupo de drogas que pueden reemplazar al tamoxifeno en los casos de resistencia al mismo (Boccardo *et al.*, 2006). La inmunoterapia es otra opción interesante a la hora

de pensar en una terapia adyuvante a la cirugía. La producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra determinados blancos celulares (ej. inhibidores de la tirosina cinasa) es una de las más recientes y novedosas opciones terapéuticas. Al igual que en humanos, la expresión de la proteína HER-2 en tumores mamarios caninos abre la posibilidad del uso de anticuerpos anti HER-2 para su tratamiento (Rungsipipat *et al.*, 1999).

Expresión del RE α , RE β y RP en la glándula mamaria tumoral

Si bien en la última década el estudio sobre los receptores a hormonas en TMC ha tomado auge, aún quedan dudas acerca de su rol y su influencia en el inicio y progresión de esta neoplasia. A pesar de existir varios reportes al respecto, algunos de ellos son contradictorios, siendo necesarios nuevos estudios que permitan conocer más profundamente los cambios que ocurren en la población de receptores a hormonas durante la tumorigénesis mamaria. Esta información permitirá conocer más en detalle el mecanismo implicado en el desarrollo tumoral, emitir un pronóstico adecuado y diseñar y seleccionar la mejor terapia para cada tipo de tumor.

Se sugiere que durante la carcinogénesis mamaria ocurre un cambio en la proporción de cada subtipo o isoforma del RE y RP respectivamente. En humanos, se sabe que la terapia de reemplazo hormonal que combina estrógenos y progesterona en mujeres post menopáusicas aumenta el riesgo de padecer cáncer mamario. Se postula que la supresión de los subtipos o isoformas que inhiben la proliferación, (RE β y RPA) podría ser uno de los mecanismos por los cuales se produce un incremento de la proliferación celular durante la terapia de reemplazo hormonal (Gustafsson y Warner, 2000; Isaksson *et al.*, 2003). Un trabajo realizado por Lofgren *et al.*, (2006) estudió la proporción RE β /RE α en cáncer mamario humano, observándose una disminución de esta proporción. Se cree que la pérdida del RE β estaría relacionada con la progresión tumoral dependiente de estrógenos. Hasta el momento no está claro cómo se regula la expresión de los diferentes receptores y cómo ocurre el cambio en esta expresión entre el tejido mamario normal y tumoral.

Como se dijo anteriormente, los RE y RP están presentes tanto en el tejido mamario normal como neoplásico. En humanos, la presencia de estos receptores en cáncer mamario ha sido ampliamente estudiada, y en la actualidad el análisis del RE α y RP se ha vuelto una herramienta muy útil para determinar la prognosis y predecir la respuesta que tendrá un tumor a la terapia

hormonal. Al momento, se ha establecido que mujeres con tumores de mama positivos para el RE α tienen mejores rangos de supervivencia y mejor respuesta al tratamiento hormonal que pacientes que no expresan dicho receptor en el tejido mamario tumoral (Platet *et al.*, 2004; Yamashita *et al.*, 2006). El RE β también ha sido detectado en biopsias de tejido mamario tumoral humano y en líneas celulares de cáncer mamario. Sin embargo, su rol en el cáncer mamario humano, así como su valor pronóstico y predictivo están aún en discusión (Järvinen *et al.*, 2000; Hartman *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2014).

En la mujer, la presencia de RP en tumores mamarios positivos para el RE está asociado a un buen pronóstico, e indica que los tumores tendrán una buena respuesta a la terapia de supresión de estrógenos orientada hacia el RE (Bardou *et al.*, 2003). Por su parte, los tumores RE + pero RP - tienden a no responder a la terapia, y por lo tanto estos pacientes tienen peor pronóstico que aquellos con tumores RE+/RP+. Estos hallazgos sugieren que los RP tienen un rol complejo en el cáncer mamario, y no son sólo marcadores de la función de los RE.

En caninos, más del 50% de los tumores mamarios expresan RE y RP (MacEwen, 1982; Donnay *et al.*, 1993). Además, esta expresión es mayor en tumores benignos en comparación con los malignos (Yang *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2009). En base a esto, se postula que la dependencia hormonal de los TMC en general decrece a medida que incrementa la malignidad del tumor y la proliferación de las células tumorales, y se podría pensar que, al igual que en humanos, la existencia de una desviación en la regulación de la expresión de receptores a hormonas contribuiría a un progresivo desarrollo del tumor.

Con respecto a la relación entre la expresión de receptores a hormonas y su valor pronóstico en TMC malignos, los resultados no son concordantes en todos los casos. Algunos trabajos reportaron que la presencia del RE α en el tumor se relaciona con características clínico-patológicas indicadoras de baja malignidad tumoral, y parece estar relacionado con un mejor pronóstico (Nieto *et al.*, 2000; Martín de las Mulas *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2009). Sin embargo, otros trabajos no han encontrado relación alguna entre la pérdida de receptores hormonales y un peor pronóstico (Millanta *et al.*, 2005).

La expresión del subtipo β del RE ha sido menos estudiada, por lo que aún quedan dudas acerca de su papel en el desarrollo de los TMC. Un primer reporte observó una mayor expresión del RE β en tumores benignos que en malignos (Martín De Las Mulas *et al.*, 2004). Por el contrario, Port Louis *et al.*, (2012) no encontraron diferencias significativas en la expresión del RE β entre tumores benignos y malignos.

Asimismo, se ha estudiado la presencia de RE α y RP en tumores mamarios benignos y malignos, observándose que la expresión de uno o ambos receptores fue más frecuente en tumores benignos que en malignos. A su vez, en el grupo de tumores malignos, la presencia de uno o ambos receptores fue más frecuente en tumores que presentaban indicadores de pronóstico favorables. Generalmente, los tumores mamarios caninos positivos para el RE α y RP tienen mejores resultados clínicos (Martin de las Mulas *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2009) que aquellos que expresan pocos o ningún receptor.

Expresión de receptores a Oxitocina y Vasopresina en cáncer mamario humano y efectos de estas hormonas sobre células tumorales mamarias in vitro

El nonapéptido hipotalámico oxitocina (OT) juega un rol crucial en varias funciones reproductivas y de comportamiento. En años recientes, estudios realizados en cáncer humano han identificado un nuevo rol de esta hormona en las neoplasias. Luego de detectarse la presencia de esta hormona en tejido mamario tanto normal como tumoral (Taylor *et al.*, 1990), se demostró la presencia del receptor a oxitocina (ROT) en aproximadamente el 80% de los carcinomas mamarios humanos estudiados (Bussolati *et al.*, 1996). En experimentos realizados *in vitro* se observó un efecto inhibitorio de la OT sobre la proliferación de células neoplásicas, tanto de origen epitelial, endometrial, nervioso y óseo, todas expresando ROT. La magnitud de la inhibición varió de un 30-50% para todas las líneas celulares, y se hizo evidente a las 48 horas del tratamiento con OT (Cassoni *et al.*, 1994). La inhibición del crecimiento del tumor mamario fue también confirmada en experimentos *in vivo*, realizados en ratones con carcinomas mamarios a los cuales se les inyectó OT subcutánea de forma pulsátil (Cassoni *et al.*, 1996). Sin embargo, en células neoplásicas derivadas de endotelio y trofoblasto, la OT promovió la proliferación celular, un efecto opuesto al anterior (Cassoni *et al.*, 2001). Así, se postula que esta hormona actuaría como un regulador del crecimiento en las células neoplásicas, y que los efectos opuestos de esta hormona involucrarían la activación de distintas vías; el efecto inhibitorio sería mediado por la vía del adenosin monofosfato cíclico (AMPC) y la proteína quinasa A, mientras que el efecto mitogénico lo sería por la vía del inositol trifosfato (IP3) y el aumento de calcio intracelular (Cassoni *et al.*, 2004). También se observó que la progesterona y el estradiol regulan la expresión del ROT (Amico *et al.*, 2002). Más recientemente, se demostró la existencia de una fuente local de síntesis de OT, tanto en la glándula mamaria sana

como tumoral (Cassoni *et al.*, 2006). Este inesperado rol de la OT en la regulación de la proliferación celular, así como la expresión de sus receptores en tejidos neoplásicos de distinto origen, abre nuevas perspectivas acerca del rol biológico de esta hormona en el cáncer. La expresión del ROT podría encontrar futuras aplicaciones como por ejemplo en la terapia del cáncer, usando péptidos análogos a la oxitocina. Para nuestro conocimiento, no existen reportes en los que se haya estudiado la población de ROT en TMC ni su relación con los receptores a hormonas esteroideas, o factores clínico-patológicos de valor pronóstico. Asimismo, se desconoce el efecto de la OT sobre la proliferación de células tumorales mamarias caninas en cultivo.

Con respecto a la vasopresina, su presencia también ha sido demostrada en tumores mamarios malignos humanos (Taylor *et al.*, 1990). North *et al.*, (1999) demostraron la presencia de los tres subtipos de receptores a Vasopresina (V1A, V1B y V2) en la línea de cáncer mamario humano MCF-7. Recientemente, se demostró la presencia del receptor V2 en carcinomas mamarios de mujeres por la técnica de inmunohistoquímica (Weinberg *et al.*, 2015).

La administración de vasopresina exógena en cultivos de la línea MCF-7 produce un efecto mitogénico sobre las células neoplásicas, sin embargo, dosis mayores inhiben el crecimiento de las mismas. Se postula que el efecto mitogénico de la AVP sería mediado por la vía del RV1, mientras que sus efectos antiproliferativos estarían mediados por la vía del RV2 (Keegan *et al.*, 2006). Además, puesto que se ha demostrado la presencia del ARN_m de la pro-vasopresina en cinco líneas celulares mamarias y en extractos tisulares de cáncer mamario humano, se sugiere que esta hormona actuaría como un factor modulador del crecimiento de forma autócrina (Keegan *et al.*, 2006). Así, la DDAVP, al ser un análogo de la vasopresina agonista del RV2, tendría efectos antiproliferativos sobre las células de cáncer mamario.

A pesar de los numerosos estudios realizados en humanos, hasta el momento no se ha estudiado la presencia del RAVP V2 en células tumorales mamarias caninas, así como tampoco los efectos de análogos de la AVP, como la DDAVP, en cultivos de células tumorales mamarias caninas.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

OBJETIVO GENERAL

La presente tesis doctoral tiene como objetivo general aportar conocimientos acerca de la influencia del componente hormonal sobre el desarrollo de los tumores mamarios caninos, mediante el estudio de la población de receptores a hormonas esteroideas, oxitocina y vasopresina en el tejido mamario tumoral canino y la evaluación de los posibles efectos antitumorales de péptidos en una línea celular de cáncer mamario canino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar la caracterización clínica e histológica de los tumores mamarios caninos.
2. Caracterizar la población de receptores a estrógenos α y β y determinar su proporción en tumores mamarios benignos y malignos caninos.
3. Evaluar la asociación entre la expresión de receptores a estrógenos α y β y factores clínico-patológicos de valor pronóstico.
4. Estudiar la expresión del receptor a progesterona en tumores mamarios benignos y malignos caninos, y su asociación con receptores a estrógenos y parámetros clínico-patológicos.
5. Investigar la presencia del receptor a oxitocina en tejido mamario tumoral canino, y evaluar la posible relación con receptores a estrógenos y factores clínico-patológicos de valor pronóstico.
6. Investigar la presencia del receptor V2 a vasopresina en tejido tumoral canino y evaluar la posible relación con receptores a estrógenos y parámetros clínico-patológicos.
7. Evaluar el efecto de la oxitocina y desmopresina sobre la proliferación en una línea celular establecida de cáncer mamario canino.

HIPÓTESIS

1. La expresión de RE α y RE β difiere entre los tumores mamarios benignos y malignos caninos.
2. La expresión de RE α y RE β en tumores malignos se asocia positivamente con factores clínico-patológicos indicadores de buen pronóstico.
3. La expresión del RP en tumores malignos se asocia positivamente con factores clínico-patológicos indicadores de buen pronóstico.
4. El receptor a oxitocina se expresa en los tumores mamarios benignos y malignos caninos.
5. El receptor a vasopresina V2 se expresa en los tumores mamarios benignos y malignos caninos.
6. La oxitocina inhibe la proliferación de células mamarias tumorales caninas *in vitro*.
7. La desmopresina inhibe la proliferación de células mamarias neoplásicas caninas *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Las muestras de tejido mamario tumoral provinieron de perras intervenidas quirúrgicamente en distintas clínicas veterinarias de las ciudades de Tandil, Ayacucho, Bahía Blanca, Bolívar, Pinamar, Mar del Plata, Junín y Santa Rosa. Luego de la mastectomía, los tejidos fueron colocados inmediatamente en solución de paraformaldehído al 4% hasta su posterior análisis.

Recolección de datos clínicos

En todos los casos, junto con la toma de muestras se procedió a la recolección de datos sobre reseña, historia clínica y examen físico del animal en un protocolo previamente confeccionado. Los datos incluyeron edad, raza, peso, condición reproductiva (entera/castrada), número y tamaño de los tumores, localización, presencia/ausencia de ulceración, agrandamiento de linfonodos regionales, y presencia/ausencia de metástasis a distancia (a través de la realización de radiografías torácicas) (Figuras 1 y 2). La estadificación clínica de cada paciente se efectuó de acuerdo al sistema TNM (Owen, 1980, ver cuadro 1).



Figura 1. Paciente mestiza de Ovejero alemán con un tumor mamario único, presentando ulceración de la piel.



Figura 2. A. Tumor mamario único, de más de 5 cm de diámetro, con presencia de ulceración en la piel. B. Tumores mamarios múltiples menores a 3 cm de diámetro. C. Tumores mamarios múltiples, el de mayor tamaño medía 8 cm de diámetro. D. Tumor mamario único de 13 cm de diámetro.

Estadio clínico	Tamaño del tumor primario	Estado del linfonodo regional	Metástasis a distancia
I	< 3 cm	No afectado	Sin metástasis
II	3 – 5 cm	No afectado	Sin metástasis
III	> 5 cm	No afectado	Sin metástasis
IV	Cualquiera	Afectado	Sin metástasis
V	Cualquiera	Afectado	Metástasis a distancia

Cuadro 1. Sistema TNM de estadificación de los tumores mamarios caninos (Owen, 1980).

Estudio Histopatológico

Procesado de muestras para histopatología

Las muestras tumorales fueron seleccionadas para que sean representativas del tumor, y se colocaron en cassettes histológicos. Luego, los cassettes fueron sometidos a una serie de alcoholes de graduación creciente, luego a xileno y finalmente fueron incluidos en parafina fundida a 60°C. A partir de los bloques de parafina, se obtuvieron secciones de 5 micras de grosor mediante micrótopo (HM 315, Microm®). Para su tinción con hematoxilina y eosina (H/E), las secciones se desparafinaron en xileno, luego se hidrataron pasando por una serie de alcoholes de graduación decreciente y por último se tiñeron con Hematoxilina de Harris (Biopack®, Argentina) y Eosina (Biopack®, Argentina). Luego de la tinción, las muestras fueron deshidratadas, sumergidas en xileno, y montadas con Bálsamo de Canadá sintético (Biopack®, Argentina).

Diagnóstico histopatológico de los tumores mamarios

El diagnóstico histopatológico de los tumores mamarios caninos se realizó empleando la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para neoplasias caninas y felinas (Misdorp *et al.*, 1999). El Grado Histológico de Malignidad (GHM) se determinó de acuerdo al método de Nottingham (Elston y Ellis, 1991) (ver Cuadros 2 y 3).

Criterios para el Grado Histológico de Malignidad		
A. Formación de túbulos	Puntaje	
	1	> 75%
	2	Entre el 10-75%
	3	< 10%
B. Pleomorfismo nuclear		
	1	Núcleos pequeños, regulares. cromatina uniforme
	2	Moderado grado de variación en el tamaño y forma nuclear
	3	Marcada variación en el tamaño nuclear, nucléolos prominentes
C. Mitosis por 10 HPF*		
	1	0-9 mitosis/ 10 HPF
	2	10-19 mitosis / 10 HPF
	3	≥ 20 mitosis/ 10 HPF

Cuadro 2. Sistema de graduación histológica para cáncer mamario canino. (*) HPF: high-power field: figuras mitóticas en 10 campos de observación (objetivo 40X).

Score Total para el Grado Histológico de Malignidad (A+B+C)	
Puntos	Grado de Malignidad
3-5	I (bajo, bien diferenciado)
6-7	II (intermedio, moderadamente diferenciado)
8-9	III (alto, pobremente diferenciado)

Cuadro 3. Score final para asignar el grado de malignidad.

Estudio Inmunohistoquímico de receptores hormonales

El tejido mamario fue procesado siguiendo el procedimiento previamente validado en otras especies (Bianchi *et al*; 2010) a fin de visualizar la intensidad de tinción y distribución de los RE α , RE β , RP, ROT y RAVPV2. Para la realización de la presente tesis doctoral la técnica de inmunohistoquímica fue puesta a punto para su implementación en muestras de tumores mamarios caninos, en el Laboratorio de Endocrinología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA, Tandil, Argentina.

Brevemente, luego de desparafinar y rehidratar las muestras de tejido, fueron pre-tratadas en horno microondas (700 watt) sumergidas en citrato de sodio 0.01 M, pH 6.0 y la actividad endógena de la peroxidasa inespecífica bloqueada con peróxido de hidrógeno al 10% en metanol. Luego, las muestras fueron expuestas a suero normal equino (non-immunoblocking – Vectastain ABC-kit, Elite, Cat # S-2000) más 1% de albúmina sérica bovina (BSA, para el ROT) o suero normal equino más 1,5% de leche descremada en polvo (RE β), o suero normal de cabra (NGS-023, LETH®, Santa Fe) más 1% de BSA (RE α , RP y RAVPV2). Posteriormente, los cortes fueron incubados con el anticuerpo primario (ver Cuadro 3), y en todos los casos se incubó toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Al día siguiente, se realizaron lavados con Buffer Fosfato Salino (PBS) o Tris Buffer Salino (TBS), y se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado (ver Cuadro 3) y finalmente con el complejo peroxidasa de rabanita-avidina-biotina (Vectastain Elite ABC-kit, Vector Laboratories®, Cat N° PK- 6102). Los controles negativos fueron obtenidos al reemplazar el anticuerpo primario por PBS o TBS. El sitio de unión a la enzima se visualizó por la aplicación del sustrato 3,3'-diaminobenzidina en H₂O₂ (DAB kit; DAKO®), un cromógeno que produce un precipitado marrón insoluble al incubarse con la enzima. Los portaobjetos fueron contrastados levemente con Hematoxilina de Mayer, y luego fueron deshidratados antes de ser montados con Bálsamo de Canadá sintético (Biopack®, Argentina).

Receptor	Origen y Laboratorio	Dilución	Segundo anticuerpo
REα	Policlonal, (H-184): sc-7207, Santa Cruz Biotechnology.	1:50 en TBS	IgG de cabra anti conejo, AR-B1, LETH®, Santa Fe.
REβ	Monoclonal, NCL-ER-beta, clone EMR02, Novocastra®, Leica Biosystems.	1:50 en PBS	IgG equina anti ratón, BA-2000, Vectastain, Vector Laboratories®.
RP	Policlonal, PR130, LETH®, Santa Fe.	1:100 en TBS	IgG de cabra anti conejo, AR-B1, LETH®, Santa Fe.
ROT	Policlonal, (A-16): sc-34078, Santa Cruz Biotechnology.	1:50 en TBS	IgG equina anti cabra, BA-9500, Vector Laboratories®.
RAVPV2	Policlonal, ab188748, Abcam, UK.	1:50 en PBS	IgG de cabra anti conejo, AR-B1, LETH®, Santa Fe.

Cuadro 3: Descripción del origen y nombre comercial, dilución y anticuerpo secundario para cada uno de los anticuerpos utilizados en la inmunohistoquímica.

Análisis de Imagen

El análisis de imagen se realizó por medio de un método subjetivo para estimar la población de los diferentes receptores en las células epiteliales tumorales. La visualización se realizó por dos observadores independientes que desconocían los datos particulares de cada muestra. Se analizaron 10 campos con un aumento de 1000X.

Se utilizó el sistema de Allred, que tiene en cuenta el porcentaje de células positivas y la intensidad de tinción (Allred *et al.*, 1998). El porcentaje de células tumorales con tinción positiva (Proportion Score, PS) se graduó de 0 a 5 puntos, de acuerdo a la siguiente escala: 0= ausencia de tinción, 1= < 1% de tinción, 2= 1-10%, 3= 11-33%, 4= 34-66% y 5= >66%. La intensidad de tinción (Intensity Score, IS) se analizó a través de la siguiente fórmula: $1 \times n1 + 2 \times n2 + 3 \times n3$, y se graduó de 0 a 3,

donde 0 fue ausencia de intensidad de tinción, 1= tinción leve, 2= tinción moderada y 3= tinción intensa.

Los resultados de la inmunohistoquímica se expresaron como Score Total (TS), calculado como la suma del PS y la IS (Allred *et al.*, 1998). Una muestra fue considerada positiva cuando más del 10% de las células tumorales presentaban sus núcleos/citoplasmas con tinción ($TS > a 3$) (De Andrés *et al.*, 2016).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó a través del programa InfoStat (InfoStat, 2014). Los resultados fueron expresados en forma de media \pm error estándar. Para evaluar las variables continuas entre sí se empleó la prueba de T-Student que compara las medias. La relación entre las variables categóricas y las continuas fue estudiada mediante el test de Análisis de la Varianza (ANOVA) y post Test de Tukey. Los parámetros clínico-patológicos de valor pronóstico seleccionados para su análisis fueron el subtipo histológico, el GHM, el tamaño tumoral, el estadio clínico y la afectación de linfonodos regionales. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas con $P \leq 0,05$.

Estudios *in vitro*

Línea celular de cáncer mamario canino

Para la realización de los ensayos *in vitro* se empleó la línea celular CMT-U27 (Figura 1), la cual fue amablemente cedida por la Prof. Eva Hellmén, de la Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), Upsala, Suecia. La línea CMT-U27 fue aislada a partir de un carcinoma simple ductal proveniente de una perra de raza Poodle de 12 años de edad (Hellmén, 1992). El carcinoma simple es un subtipo histológico de diagnóstico frecuente en la perra, y se asocia con un corto período libre de enfermedad luego de la cirugía. En estudios previos, la línea CMT-U27 ha demostrado poseer una alta tasa de crecimiento, un elevado potencial anti-apoptótico (Krol *et al.*, 2009), y además ha mostrado ser sensible a los antiprogéstágenos, a inhibidores de la Ciclooxygenasa 2 (Guil-Luna *et al.*, 2014), y a la doxorubicina (Bakirel *et al.*, 2016). Por estos motivos, esta línea celular resulta ser un modelo *in vitro* de utilidad para evaluar los efectos de potenciales drogas antineoplásicas.

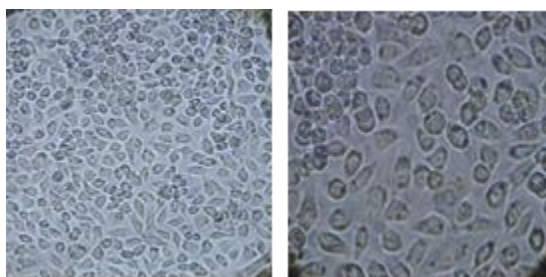


Figura 1. Células CMT-U27 en cultivo. Se observan algunas células de forma redondeada, y otras de aspecto elongado.

Condiciones de trabajo y cultivo de la línea celular

Todas las soluciones y medios de cultivo utilizados para trabajar con la línea celular fueron preparados en una Cabina de Seguridad Biológica Clase II en condiciones de esterilidad. Las células CMT-U27 fueron cultivadas en botellas de cultivo estériles de 25 cm² (Corning® Inc., USA), utilizando 4,5 ml de medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich®, USA) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Natocor®, Córdoba, Argentina) y antibióticos: penicilina (100 UI/ml) y estreptomicina (100 µg/ml) (Sigma-Aldrich®, USA). Las células se incubaron en estufa (Panasonic®, Lobov Científica, Argentina) a 37°C, en atmósfera humedecida y 5% de CO₂. Se realizó el seguimiento diario de las células observándolas en un microscopio invertido (Leica Biosystems®, USA). El medio de cultivo se reemplazó cada dos días, y las células fueron repicadas cada 5 días aproximadamente. El proceso de subcultivo se realizó lavando con PBS, y añadiendo 0,5 ml de EDTA. Tras una pequeña incubación a 37°C (5-10 min), se añadió medio de cultivo realizando la dilución correspondiente. Para mantener siempre un stock de la línea celular, al momento del subcultivo parte de las células fueron congeladas en nitrógeno líquido a -196 °C. El proceso de congelación consistió en despegar las células de la superficie utilizando 1 ml de EDTA. Luego, la suspensión celular fue centrifugada durante 10 min a 800 rpm, se eliminó el sobrenadante, y las células fueron resuspendidas en 1 ml de medio de congelación frío (4 °C), formado por un 90% de SFB más 10% de Dimetil Sulfoxido (DMSO). Finalmente, los criotubos fueron transferidos a termos de nitrógeno líquido.

Péptidos

La OT fue suministrada por el Laboratorio Chemo-Romikin S.A.® (Buenos Aires, Argentina) y la desmopresina (Laboratorios Elea®, Argentina) fue amablemente cedida por el Dr. Daniel Alonso, del Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires. Ambos péptidos se encontraban en forma liofilizada; al inicio de los ensayos fueron disueltos en PBS estéril a una concentración final de 100 µM (Solución Madre) y posteriormente fueron almacenados a -20 °C. Las diferentes concentraciones de droga utilizadas durante los ensayos se obtuvieron realizando diluciones seriadas a partir de la Solución Madre.

Ensayo preliminar

De forma previa a la realización del ensayo de proliferación celular, se realizó el estudio de la presencia del ROT y RAVP V2 en las células de la línea CMT-U27 mediante la técnica de inmunohistoquímica. Brevemente, las células fueron cultivadas de manera rutinaria en botellas de 25 cm², con medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB y antibióticos. Cuando alcanzaron una confluencia del 80% aproximadamente, se las lavó con PBS, y se adicionó EDTA durante 5 min para desprender la monocapa. Luego, fueron transferidas a un tubo cónico y centrifugadas durante 10 min a 1000 rpm. Se descartó el sobrenadante, y se adicionó paraformaldehído al 4% para fijar las células. Transcurridos 5-10 min, las células fueron centrifugadas, se descartó el sobrenadante, y se agregaron 20 µl de agar fundido al 2%, asegurándose que las células queden inmersas en el agar. Posteriormente, se procesó el culot de agar con células hasta incluirlo en parafina siguiendo el procedimiento histológico de rutina previamente descrito en materiales y métodos. Luego, se realizaron cortes de 4 micras en el micrótopo, y se realizó la técnica de inmunohistoquímica como fuera descrito previamente en la sección materiales y métodos.

Ensayo de proliferación celular

Para determinar el posible efecto antiproliferativo de la OT y la DDAVP sobre las células tumorales, se utilizó el método colorimétrico del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Éste se basa en la reducción metabólica del MTT realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color azul (formazán), permitiendo de esta manera evaluar la viabilidad de las células. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido (Iannucci *et al.*, 2011).

Los ensayos se iniciaron cuando las células se encontraban en un 80% de confluencia aproximadamente. Luego de descartar el medio, las células fueron lavadas 3 veces con 4 ml de PBS estéril, pH 7.4 y disociadas utilizando EDTA al 0,12% durante 5-7 minutos. Para poder determinar el número de células por ml, se realizó el recuento celular en cámara de Neubauer, utilizando la tinción de Azul Tripán (Sigma Aldrich®, USA) en una dilución 1:5. Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos en dos densidades: 4×10^3 y 8×10^3 células por pocillo, en un volumen total de 200 μ l de RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB. Se incubaron en estufa a 37°C en atmósfera humedecida con 5% de CO₂ durante 24 horas para permitir su adherencia. Posteriormente, el medio de cultivo fue removido y reemplazado por 200 μ l de medio nuevo adicionado con la droga (OT o DDAVP) en concentraciones crecientes: 10, 50, 100, 500 y 1000 nanomolar (nM), dejando pocillos con medio sin droga como control. Cada concentración fue evaluada por triplicado, y cada ensayo fue realizado cuatro veces. Las células fueron expuestas a los tratamientos por 72 horas. Al finalizar el período de incubación, se añadieron 20 μ l de MTT (Sigma Aldrich®, USA) (5 mg/ml diluido en PBS), y se incubaron por 2 horas a 37°C para permitir la formación de los cristales. Posteriormente, se descartó el sobrenadante cuidadosamente y se adicionaron 100 μ l de isopropanol a cada pocillo con el fin de disolver los cristales de formazán, producto del metabolismo del MTT. Por último, las placas fueron leídas en un lector de placas a una longitud de onda de 595 nm (Beckman Coulter, DTX 880 Multimode Detector) (Figura 2). Los valores de densidad óptica (DO) de los pocillos control fueron tomados como el 100% de viabilidad. La DO de los pocillos tratados fue convertida a porcentaje de células vivas con respecto al control.

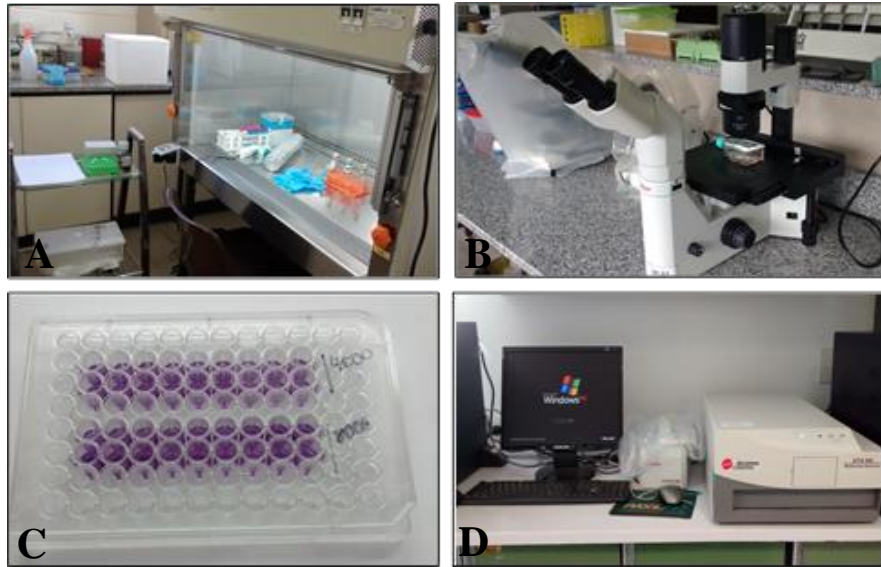


Figura 2. A. Cabina de seguridad biológica Clase II. B. Las células se evaluaron diariamente en un microscopio invertido. C. Ensayo MTT en placas de 96 pocillos. D. Las placas se leyeron en un lector a 595 nm de longitud de onda.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los cuatro experimentos independientes fueron analizados por un Análisis de Varianza (ANOVA) contrastado con el método de Dunnett para comparaciones múltiples, con un nivel de significancia de $P < 0,05$.

RESULTADOS

A fin de facilitar la comprensión de los resultados de la presente tesis, la sección Resultados ha sido dividida en tres partes. La primera parte lleva por título: “*Expresión de receptores a estrógenos α y β , y receptor a progesterona en muestras de tejido mamario tumoral canino*”, e incluye los estudios 1.1, 1.2 y 1.3. La segunda parte se denomina: “*Estudios sobre la expresión de receptores a oxitocina y vasopresina en tejido mamario tumoral canino*” e incluye los estudios 2.1 y 2.2. La tercera parte se denomina: “*Estudios sobre los efectos de la oxitocina y análogos de la vasopresina en cultivos de células tumorales mamarias caninas*”, e incluye un estudio preliminar, el estudio 3.1 y 3.2.

PRIMERA PARTE

Estudio 1.1

CARACTERIZACIÓN CLÍNICA E HISTOPATOLÓGICA DE TUMORES MAMARIOS CANINOS

Reseña

Las neoplasias mamarias representan el 50% de todos los tumores que ocurren en la hembra canina. La influencia de las hormonas esteroides sexuales representa el principal factor de riesgo de esta enfermedad, y aquellas hembras que son ovariectomizadas a edades tempranas (antes de los 2 años) se encuentran protegidas frente al desarrollo de tumores mamarios (Lana *et al.*, 2007). La bibliografía cita una edad promedio de aparición de esta neoplasia entre 9 y 10 años, encontrándose raramente en perras menores a 5 años (Sorenmo *et al.*, 2011). Se ha descrito una mayor incidencia de tumores mamarios en las razas Cocker Spaniel, Poodle y Daschund, aunque también se reportan otras razas como el Ovejero Alemán y el Pointer (Sleeckx *et al.*, 2011). La estadificación clínica de los pacientes con tumores mamarios resulta fundamental para definir la extensión del proceso tumoral y emitir un pronóstico inicial. Los TMC son muy variables desde el punto de vista histológico, y se estima que un 50% es de naturaleza maligna (Misdorp, 2002). El conocimiento de los aspectos clínicos y patológicos de los TMC brinda información pronóstica y permite establecer un tratamiento adecuado. El objetivo del presente estudio fue recolectar datos, tanto clínicos como

patológicos, de las neoplasias mamarias caninas ocurridas en la ciudad de Tandil y alrededores. Esta información resulta fundamental para realizar los posteriores estudios de la presente Tesis.

Materiales y métodos

La recolección, procesamiento y análisis de las muestras de tumores mamarios caninos se realizaron como fuera descripto en la sección materiales y métodos de la presente tesis doctoral.

Resultados

En el presente estudio se incluyeron 65 muestras de tumores mamarios benignos y malignos caninos. A continuación se presentan los resultados obtenidos para los distintos aspectos clínicos y patológicos analizados.

Edad.

La edad de las perras que presentaron tumores mamarios varió entre los 4 y 15 años, con una media de $9,7 \pm 2,6$ años.

Raza.

La distribución de los tumores mamarios caninos recolectados en la presente tesis según la raza fue muy diversa. Las razas en que se presentaron con mayor frecuencia fueron las mestizas, y entre las razas puras, el Pastor Alemán, el Cocker Spaniel y el Pequinés (Figura 1).

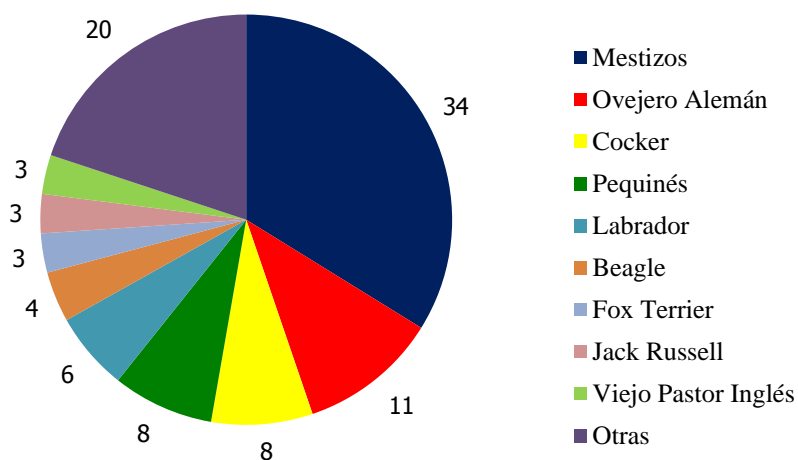


Figura 1. Distribución de tumores mamarios caninos según la raza en las muestras estudiadas.

Condición reproductiva.

Al momento de la evaluación clínica, 50 de las 65 (76,9%) perras incluidas en el estudio estaban enteras. Dentro del grupo que se encontraba castrada (23,1%), todas ellas habían sido ovariectomizadas a partir de los cuatro años de edad en adelante.

Estadificación clínica.

Las pacientes con tumores mamarios fueron estadificadas clínicamente, de acuerdo al Sistema TNM (Owen, 1980) previamente descrito en la sección materiales y métodos. En la Figura 2 se describe el porcentaje de pacientes que se encontraba en cada uno de los estadios clínicos.

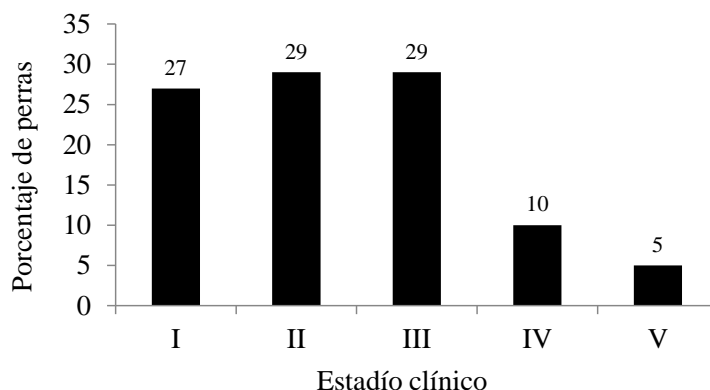


Figura 2. Porcentaje de perras con tumores mamarios que se encontraban en cada uno de los estadios clínicos.

Estudio histopatológico.

El estudio histopatológico de las muestras reveló que 26 de las 65 muestras eran tumores benignos (40%), y 39 eran malignos (60%). Dentro del grupo de tumores benignos, el tipo histológico diagnosticado con mayor frecuencia fue el tumor mixto benigno (n=10, 38,5%), seguido del adenoma simple (n=8, 30,7%), adenoma complejo (n=4, 15,4%) y fibroadenoma (n=4, 15,4%) (Figura 3). En el grupo de tumores malignos, el tipo histológico predominante fue el carcinoma túbulo-papilar, que fue diagnosticado en el 51,2% de los casos (n=20), seguido de los carcinosarcomas (n=5, 12,8%), sarcomas (n=5, 12,8%); y carcinomas sólidos (n=4, 10,2%). Con menor frecuencia se diagnosticaron carcinoma rico en lípidos (n=1, 2,5%), carcinoma de células fusiformes (n=1, 2,5%), carcinoma mucinoso (n=1, 2,5%), carcinoma complejo (n=1, 2,5%) y carcinoma anaplásico (n=1, 2,5%) (Figura 4). En la Tabla 1 se describen los tipos histológicos hallados. Con respecto al GHM, el 50% de los tumores mamarios malignos analizados fue de Grado I, el 36% fue de Grado II, y el 14% de Grado III (Figura 5).

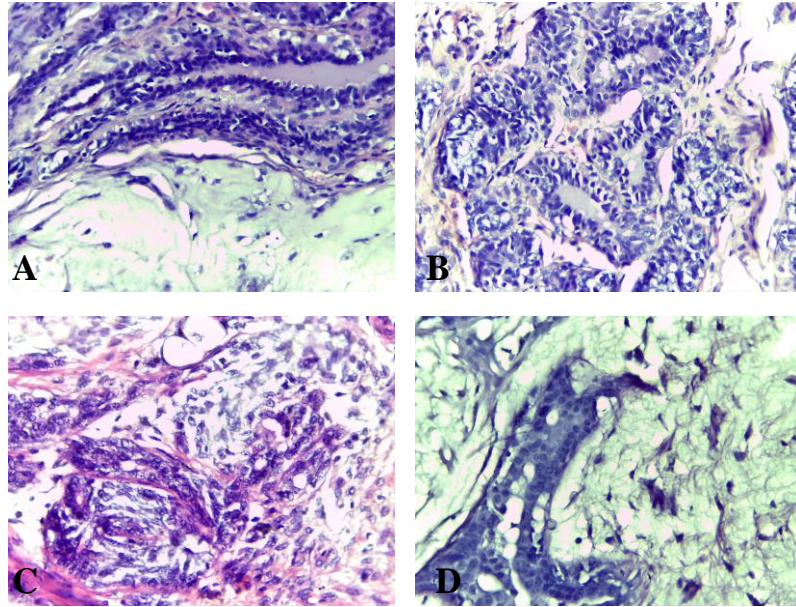


Figura 3. Tumores mamarios benignos (tinción H/E). A. Tumor mixto benigno. Se observa tejido epitelial y metaplasia cartilaginosa (400 X). B. Adenoma simple. Se observan células epiteliales dispuestas en túbulos (400 X). C. Adenoma complejo. Se presentan células epiteliales y mioepiteliales (400 X). D. Fibroadenoma. Se aprecian células epiteliales y proliferación de fibroblastos (400 X).

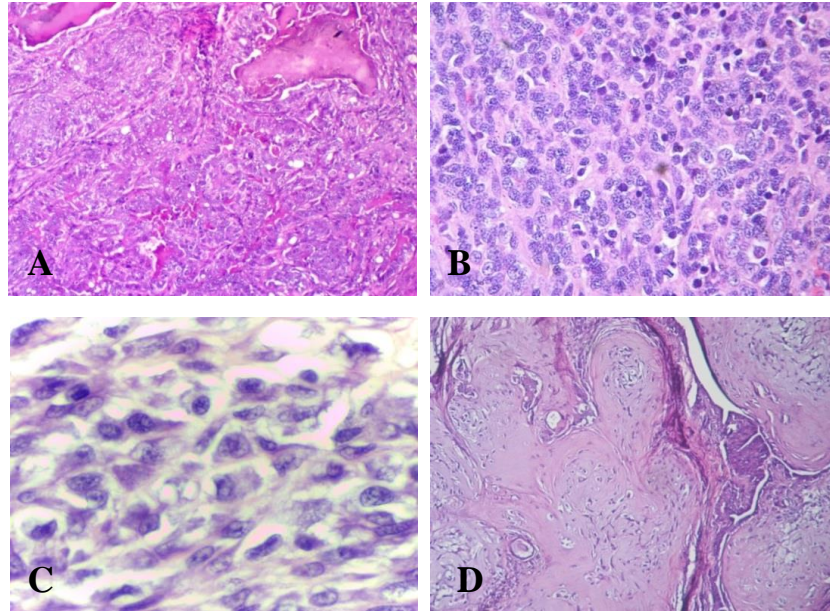


Figura 4. Tumores mamarios malignos (tinción H/E). A. Carcinoma túbulo-papilar. Se observan estructuras túbulo-papilares rodeadas por tejido conectivo (100 X) B. Carcinoma sólido. Se aprecian células dispuestas en cordones o formando nidos (400 X). C. Sarcoma. Se observan células de aspecto fusiforme (1000 X). D. Carcinosarcoma. Se observa proliferación de tejido mesenquimático junto con tejido epitelial (100 X).

Tipo Histológico	Nro. de tumores	Tipo Histológico	Nro. de tumores
Tumores Benignos	26	Tumores Malignos	39
Tumor mixto benigno	10	Carcinoma túbulo-papilar	20
Adenoma simple	8	Carcinosarcoma	5
Adenoma complejo	4	Sarcomas	5
Fibroadenoma	4	Carcinoma sólido	4
		Carcinoma rico en lípidos	1
		Carcinoma de células fusiformes	1
		Carcinoma mucinoso	1
		Carcinoma complejo	1
		Carcinoma anaplásico	1

Tabla 1. Tipos histológicos hallados en 65 muestras de tumores mamarios caninos.

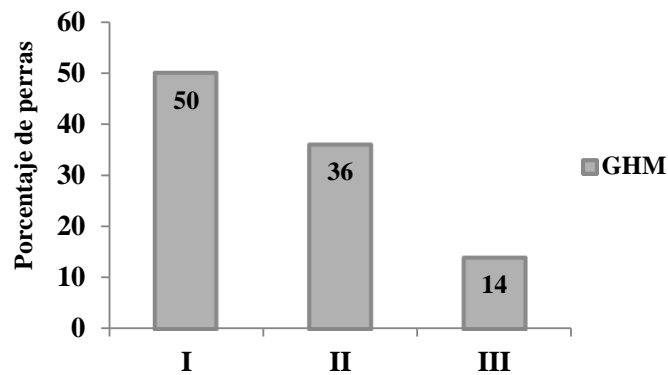


Figura 5. Clasificación de los tumores mamarios malignos de acuerdo al GHM.

Estudio 1.2

CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE RECEPTORES A ESTRÓGENOS α Y β EN TUMORES MAMARIOS CANINOS. ASOCIACIÓN CON PARAMETROS CLÍNICO – PATOLÓGICOS.

Reseña

La presencia de RE en el tejido mamario tumoral canino fue reportada varias décadas atrás, y desde entonces, varios trabajos han estudiado su implicancia en el desarrollo y progresión de esta neoplasia (Rutteman *et al.*, 1988). Si bien en los últimos años se ha avanzado en su conocimiento, la mayoría de los trabajos se basan en el estudio del subtipo α del RE, y los datos no son concordantes en todos los casos. Algunos autores consideran que, al igual que en el cáncer de mama en la mujer, la presencia de RE α en el tumor se asocia con un mejor pronóstico (Nieto *et al.*, 2000). Sin embargo, otros no han encontrado asociación alguna (Millanta *et al.*, 2005). Con respecto al subtipo β , la información existente resulta escasa, por lo que el significado de su presencia en los tumores mamarios caninos aún no está claro. El objetivo del presente estudio fue evaluar la expresión del RE α y RE β en tumores mamarios benignos y malignos caninos, y analizar su asociación con parámetros clínicos y patológicos de valor pronóstico. Esta información sería de utilidad para la selección de terapias adyuvantes más eficaces y adaptadas a cada paciente, que contribuyan finalmente a mejorar su calidad de vida.

Materiales y métodos

Muestras

Del total de muestras tumorales recolectadas en el Estudio 1.1, se seleccionaron aquellas que se encontraban en mayor número por tipo histológico. El análisis inmunohistoquímico se llevó a cabo en un total de 43 muestras, de las cuales 24 fueron tumores malignos y 19 tumores benignos. Dentro de los tumores malignos, los tipos histológicos analizados fueron el carcinoma túbulo-papilar (n=15), el carcinoma sólido (n=5) y el carcinosarcoma (n=4), y dentro de los benignos, los tipos histológicos analizados fueron el tumor mixto benigno (n=9), el adenoma simple (n=6) y el fibroadenoma (n=4).

Inmunohistoquímica

La técnica inmunohistoquímica fue realizada siguiendo el procedimiento descrito en la sección materiales y métodos de la presente tesis doctoral. Brevemente, luego de la exposición a suero normal de cabra (RE α) o suero equino normal (RE β), los cortes fueron sucesivamente incubados con el anticuerpo primario: RE α (anticuerpo policlonal, (H-184): sc-7207, Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA), RE β (anticuerpo monoclonal, NCL-ER-beta, Novocastra, Leica Biosystems, USA), anticuerpo secundario biotinilado (IgG de cabra anticonejo para RE α , IgG equina antiratón para RE β) y finalmente con el complejo peroxidasa de rabanito-avidina-biotina (Vectastain, Elite ABC-Kit, Vector Laboratories, Cat N° PK-6102).

Como controles positivos se utilizaron ovarios y úteros de perras sanas, las cuales fueron intervenidas quirúrgicamente en el Hospital Escuela de Pequeños Animales (HEPA) de esta Facultad. Los tejidos fueron procesados de la misma manera que las muestras tumorales.

Análisis de imagen

El análisis de imagen se realizó siguiendo la metodología descrita en la sección materiales y métodos de la presente tesis doctoral.

Análisis estadístico

La variable analizada fue el Total Score (TS), obtenido de la suma del porcentaje de área positiva (PS) y la intensidad de tinción (IS). Se realizó el análisis como fuera descrito en la sección materiales y métodos de la presente tesis doctoral.

Resultados

Observaciones generales de la inmunotinción

La inmunotinción para los RE α y RE β se observó exclusivamente en el núcleo de las células tumorales. Cuando los anticuerpos específicos fueron sustituidos por PBS o TBS, la ausencia de tinción fue indicativa de la especificidad de la inmunotinción observada para ambos receptores. En las muestras de útero (Figura 1A) y ovario (Figura 1B) (controles positivos) el anticuerpo se expresó de manera intensa en las células endometriales y foliculares, respectivamente.

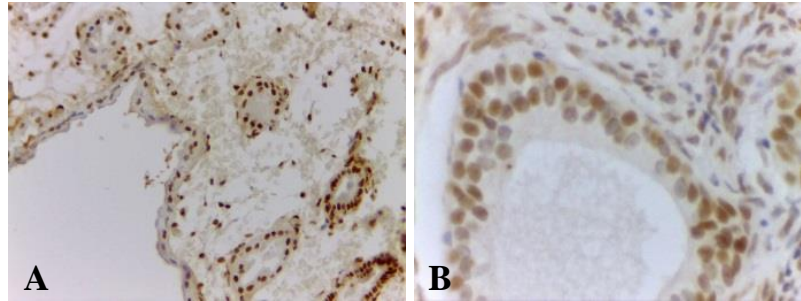


Figura 1. A. Endometrio canino utilizado como control positivo del RE α . Se observa tinción nuclear en las células del epitelio luminal y glandular (400 X). B. Ovario canino utilizado como control positivo del RE β . Se observa tinción positiva en los núcleos de las células foliculares (1000 X).

Receptor a estrógenos α

El 70% de los tumores mamarios analizados resultó positivo al RE α . Cuando se analizaron los tumores benignos y malignos por separado, el RE α fue positivo en el 84% y 58% de los casos, respectivamente (Figura 2). Cuando los valores se expresaron como el TS, éste fue significativamente mayor en los tumores benignos en comparación con los malignos ($P < 0,01$) (Figura 3 y 4).

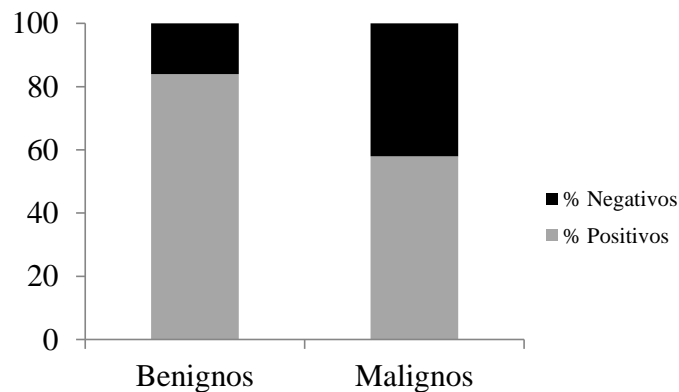


Figura 2. Porcentaje de tumores mamarios benignos y malignos que resultaron positivos y negativos a la presencia del RE α .

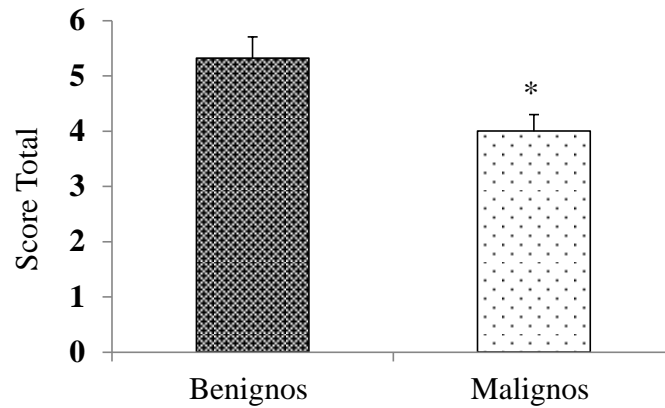


Figura 3. Score Total para el RE α en tumores mamarios benignos y malignos caninos. El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas.

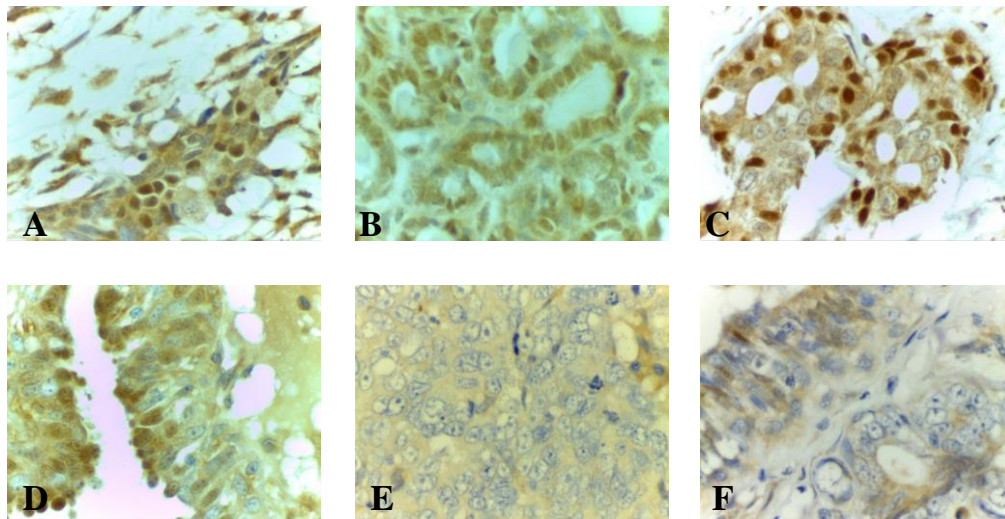


Figura 4. Inmunohistoquímica para RE α en tumores mamarios caninos. A, B, C: Tumores mamarios benignos mostrando expresión intensa y moderada en las células epiteliales tumorales (1000 X). D, E, F: Tumores mamarios malignos mostrando expresión moderada, leve o ausente en las células epiteliales tumorales (1000 X).

Receptor α estrógenos β

El RE β se expresó en el 53% de los tumores mamarios analizados. Cuando se analizó su expresión comparando benignos con malignos, el porcentaje de tumores positivos fue muy similar en ambos grupos (52% y 54%, respectivamente) (Figura 5). Cuando los valores se expresaron como el TS, tampoco se observaron diferencias entre tumores benignos y malignos (Figuras 6 y 7).

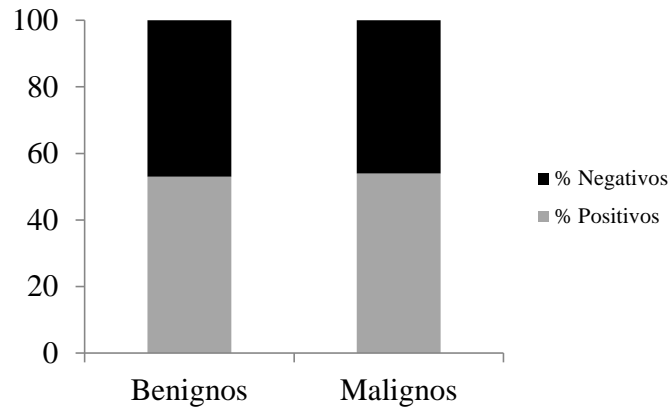


Figura 5. Porcentaje de tumores mamarios benignos y malignos que resultaron positivos y negativos a la presencia del RE β .

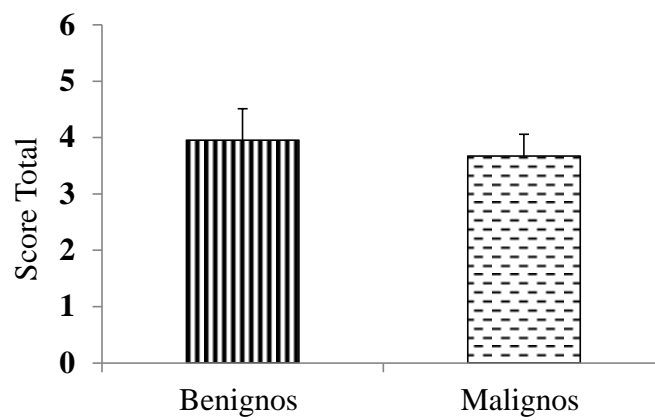


Figura 6. Score Total para el RE β en tumores mamarios benignos y malignos caninos.

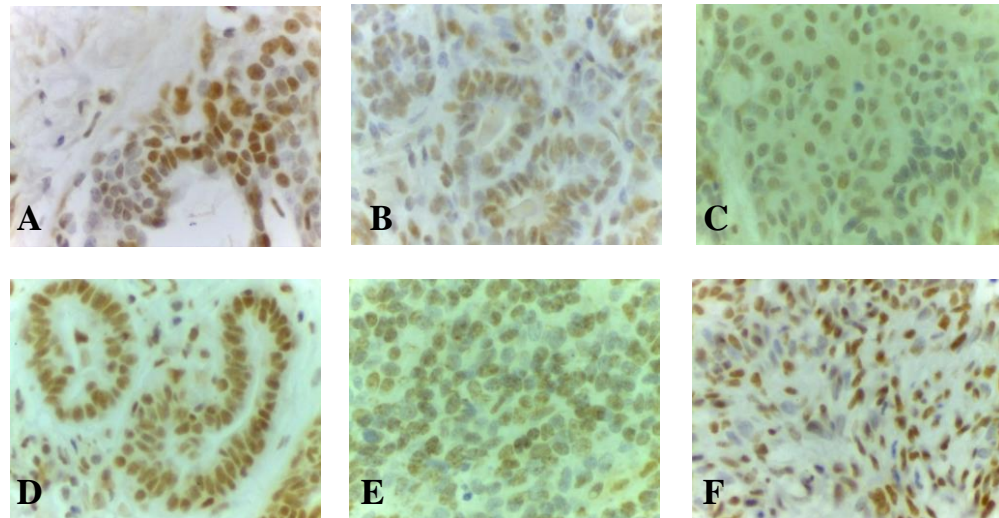


Figura 7. Inmunohistoquímica para RE β en tumores mamarios caninos. Se observa expresión intensa y moderada tanto en las células de tumores benignos (A, B, C) como malignos (D, E, F) (1000 X).

Expresión combinada del RE α y RE β

En la totalidad de muestras analizadas, la presencia de uno o ambos receptores se detectó en 34 de los 43 tumores (79%). Además, la expresión de uno o ambos receptores ocurrió en el 89% de los tumores benignos, y en el 71% de los malignos. Dentro de los tumores benignos, la combinación más frecuente fue RE α +/RE β + (9/19 [47%]), seguida por la combinación RE α +/RE β - (7/19 [37%]), mientras que en los malignos, el grupo predominante fue RE α +/RE β + (10/24 [41%]), seguido por el grupo RE α -/RE β - (7/24 [29%]) (Figura 8).

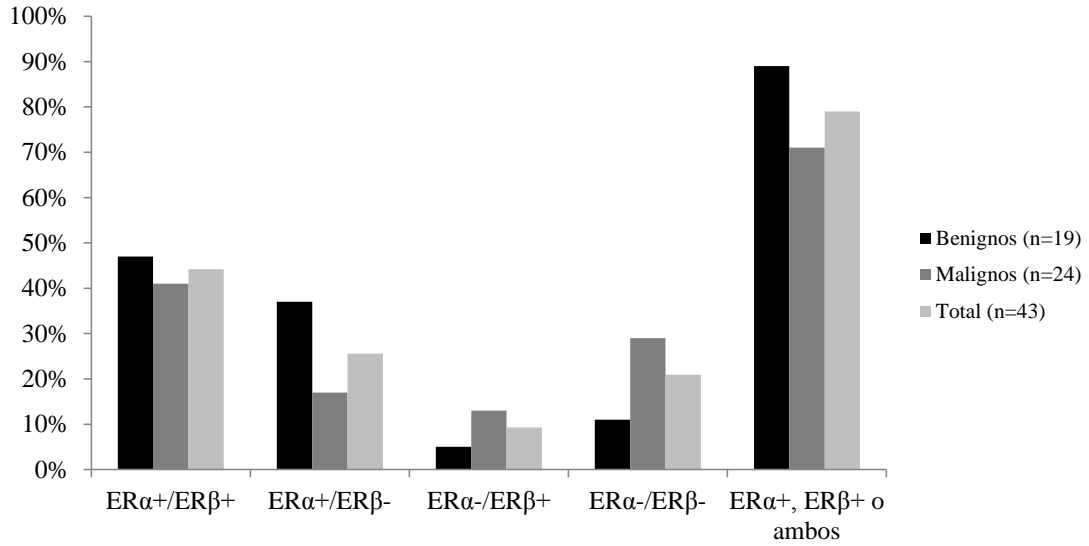


Figura 8. Expresión combinada del RE α y RE β en los tumores mamarios caninos.

Asociación entre receptores hormonales y parámetros clínico-patológicos

Con respecto al subtipo histológico, no existieron diferencias en el TS del RE α entre tumores benignos (Figura 9), mientras que entre los malignos, el TS fue significativamente mayor en los carcinomas túbulo-papilares, en comparación con los carcinomas sólidos (Figura 10). Cuando se analizó el TS del RE β , no se encontraron diferencias ni entre tumores benignos ni entre malignos (Figuras 11 y 12).

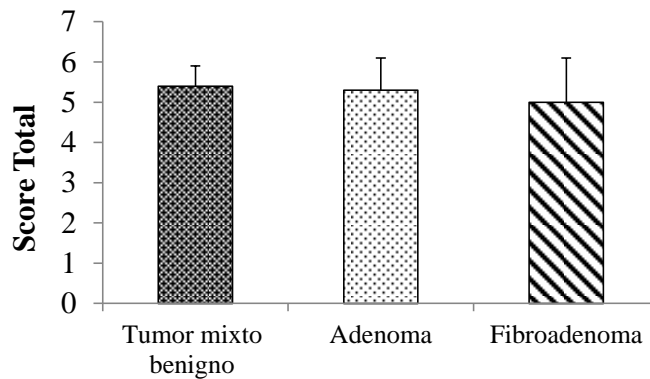


Figura 9. Score Total para el RE α en tumores mamarios benignos de acuerdo al tipo histológico.

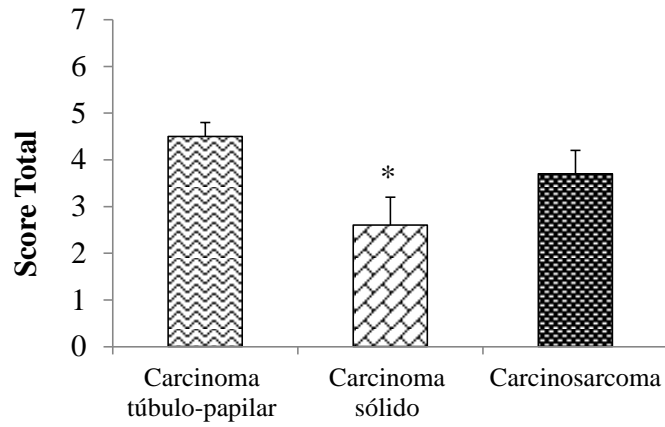


Figura 10. Score Total para el RE α en tumores mamarios malignos de acuerdo al tipo histológico. El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas.

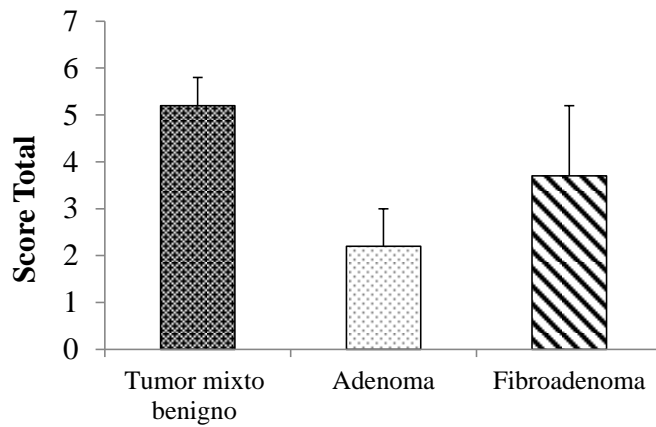


Figura 11. Score Total para el RE β en tumores mamarios benignos de acuerdo al tipo histológico.

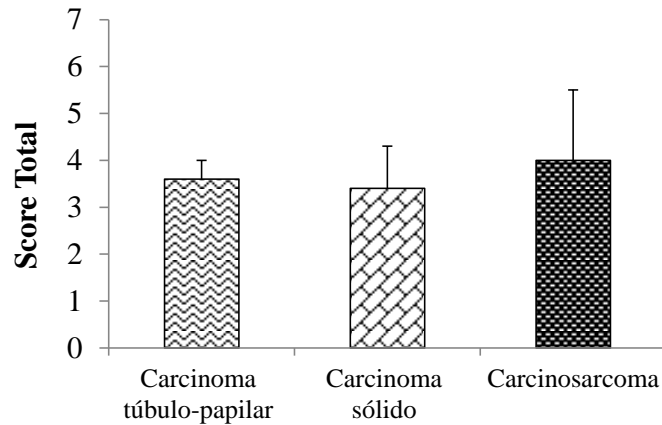


Figura 12. Score Total para el RE β en tumores mamarios malignos de acuerdo al tipo histológico.

Para las restantes variables analizadas, se observó que el TS para el RE α fue mayor en aquellos tumores de GHM I, comparado con aquellos de GHM III ($4,5 \pm 0,4$ vs. $2,0 \pm 1,0$) ($P < 0,05$) (Figura 13 y Tabla 1). Con respecto al RE β , no existió asociación entre su expresión y las variables clínico-patológicas analizadas (Tabla 1).

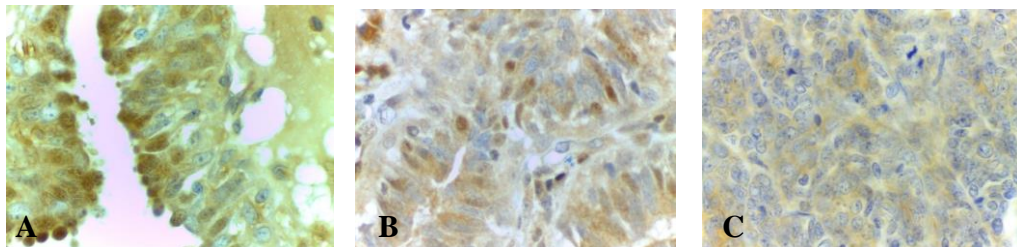


Figura 13. Inmunohistoquímica para RE α en tumores mamarios malignos A. Carcinoma de GHM I mostrando tinción intensa en las células tumorales. B. Carcinoma de GHM II mostrando expresión moderada y leve en las células tumorales. C. Carcinoma de GHM III mostrando ausencia de tinción en las células tumorales.

Variable	Total Score REα	Total Score REβ
<i>Tamaño tumoral</i>		
< 5 cm (n=14)	3,7 \pm 0,4	4,0 \pm 0,5
> 5 cm (n=10)	4,4 \pm 0,4	3,2 \pm 0,6
<i>Estadío clínico</i>		
I, II o III (n=17)	3,9 \pm 0,4	3,6 \pm 0,4
IV o V (n=7)	4,1 \pm 0,4	3,7 \pm 1,1
<i>Grado de malignidad</i>		
I (n=10)	4,5 \pm 0,4 †	3,8 \pm 2,0
II (n=7)	4,3 \pm 0,5	4,0 \pm 2,2
III (n=3)	2,0 \pm 1,0	3,3 \pm 0,6
<i>Afectación de linfonodos</i>		
SI (n=8)	4,5 \pm 0,5	3,2 \pm 3,0
NO (n=16)	3,7 \pm 0,5	4,1 \pm 1,3

Tabla 1. Asociación entre variables clínico - patológicas de valor pronóstico y la expresión del RE α y RE β en los tumores mamarios malignos. Los valores se expresaron como el promedio del Total Score \pm el error estándar. El signo † indica diferencias estadísticamente significativas.

Estudio 1.3

CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DEL RECEPTOR A PROGESTERONA EN TUMORES MAMARIOS CANINOS. ASOCIACIÓN CON RE α , RE β Y PARÁMETROS CLÍNICO - PATOLÓGICOS.

Reseña

En el cáncer de mama humano, el estado de RE/RP en el tumor se considera un factor pronóstico de utilidad, siendo beneficioso para identificar aquellas pacientes que podrían responder a la terapia hormonal. Es sabido que aquellas mujeres con tumores RP-positivos, responden mejor a la terapia antiestrogénica que aquellas pacientes con tumores RP-negativos. En la especie canina, los estudios en relación al RP reportan una menor expresión en tumores mamarios malignos comparado con los benignos (Martin de las Mulas *et al.*, 2005; Millanta *et al.*, 2005). Sin embargo, los porcentajes de tumores positivos y negativos en cada grupo (benignos vs malignos) son bastante dispares entre estudios. Por otro lado, trabajos recientes están evaluando el uso de antiprogéstágenos en el tratamiento de pacientes con tumores malignos positivos para el RP (Guil-Luna *et al.*, 2016). El objetivo del presente estudio fue determinar la expresión del RP en tumores mamarios benignos y malignos, así como evaluar su asociación con factores de valor pronóstico.

Materiales y Métodos

Muestras

En el presente estudio se analizaron un total de 26 muestras tumorales, de las cuales 15 fueron de naturaleza maligna y 11 fueron de naturaleza benigna. Dentro de los tumores malignos, los tipos histológicos analizados fueron el carcinoma túbulo-papilar (n=10) y el carcinoma sólido (n=5), y dentro de los benignos, el tumor mixto benigno (n=5) y el adenoma (n=6).

Inmunohistoquímica

La técnica inmunohistoquímica fue realizada siguiendo el procedimiento descrito en la sección materiales y métodos de la presente tesis doctoral. Brevemente, luego de la exposición a suero normal de cabra, los cortes fueron sucesivamente incubados con el anticuerpo primario: RP (anticuerpo policlonal, PR130, LETH, Santa Fe, Argentina), anticuerpo secundario biotinilado (IgG de cabra anticonejo) y finalmente con el complejo peroxidasa de rabanita-avidina-biotina (Vectastain®, Elite ABC-Kit, Vector Laboratories, Cat N° PK-6102). Como control positivo del RP se utilizó útero canino normal.

Análisis de imagen

El análisis de imagen se realizó siguiendo la metodología descrita en la sección materiales y métodos de la presente tesis doctoral.

Análisis estadístico

La variable analizada fue el Total Score (TS), obtenido de la suma del porcentaje de área positiva (PS) y la intensidad de tinción (IS). Se realizó el análisis como fuera descrito en la sección materiales y métodos de la presente tesis doctoral.

Resultados

Observaciones generales de la inmunotinción

La inmunotinción para el RP se observó en el núcleo de las células epiteliales tumorales. En las muestras de útero (control positivo), el anticuerpo reaccionó de manera intensa tanto en los núcleos de las células del epitelio glandular (Figura 1A) como del epitelio luminal del endometrio (Figura 1B).

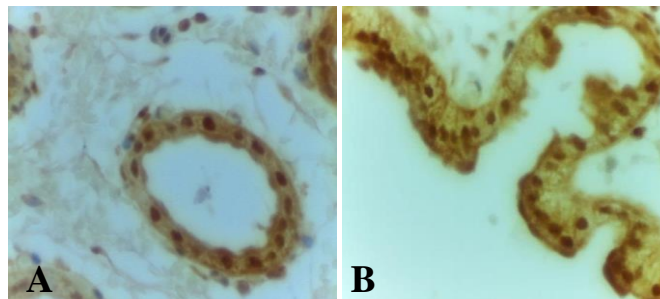


Figura 1. Endometrio canino utilizado como control positivo. A. Se observan numerosos núcleos de color marrón en el epitelio glandular. B. Los núcleos positivos también se observan en el epitelio luminal.

Expresión del RP en tumores mamarios caninos

De los 26 tumores mamarios estudiados, 6 (23%) resultaron positivos al RP. Al analizar los tumores mamarios benignos y malignos por separado, resultaron positivos el 27% y el 20% de los casos, respectivamente (Figura 2). Cuando los valores se expresaron como el TS, éste fue menor a 4 tanto en tumores benignos como malignos, sin observarse diferencias significativas entre ellos (Figura 3).

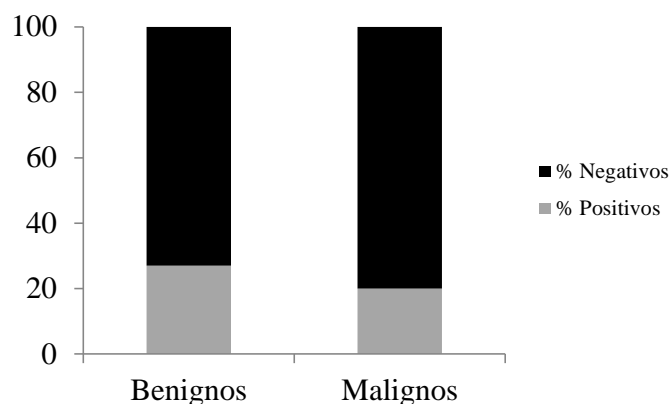


Figura 2. Porcentaje de tumores mamarios benignos y malignos que resultaron positivos y negativos a la presencia del RP.

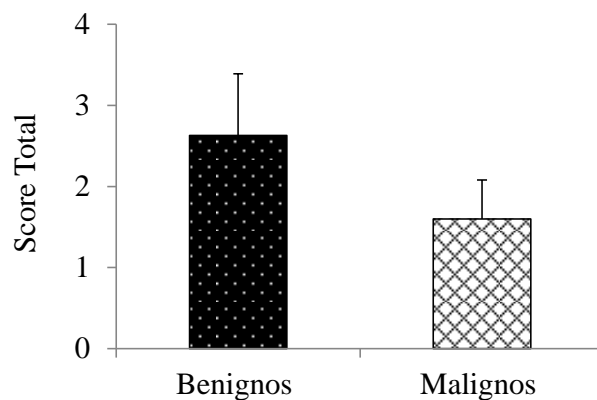


Figura 3. Score Total para el RP en tumores mamarios benignos y malignos.

Asociación con RE α , RE β y parámetros clínico-patológicos

El análisis de acuerdo al subtipo histológico no reveló diferencias entre ellos, ni entre tumores benignos ni entre malignos (Figuras 4, 5 y 6). Con respecto a las restantes variables clínico-patológicas analizadas, se observó que aquellas perras que se encontraban en estadíos clínicos I, II o III al momento de la evaluación clínica, tuvieron un TS del RP menor comparado con aquellas que se encontraban en estadíos IV o V (Tabla 1).

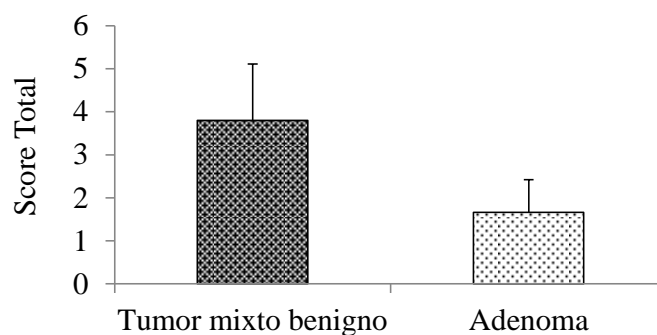


Figura 4. Score Total para el RP en tumores mamarios benignos de acuerdo al tipo histológico.

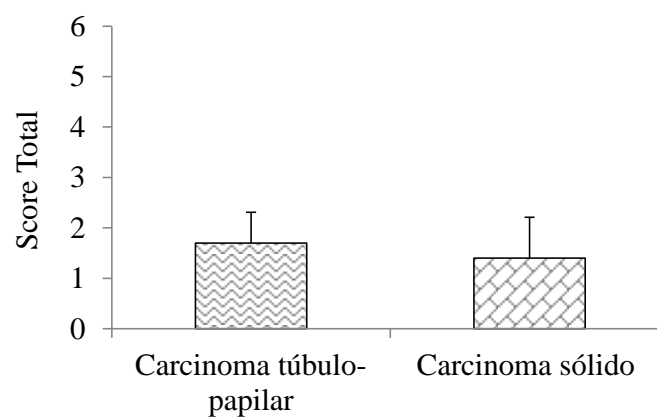


Figura 5. Score Total para el RP en tumores mamarios malignos de acuerdo al tipo histológico.

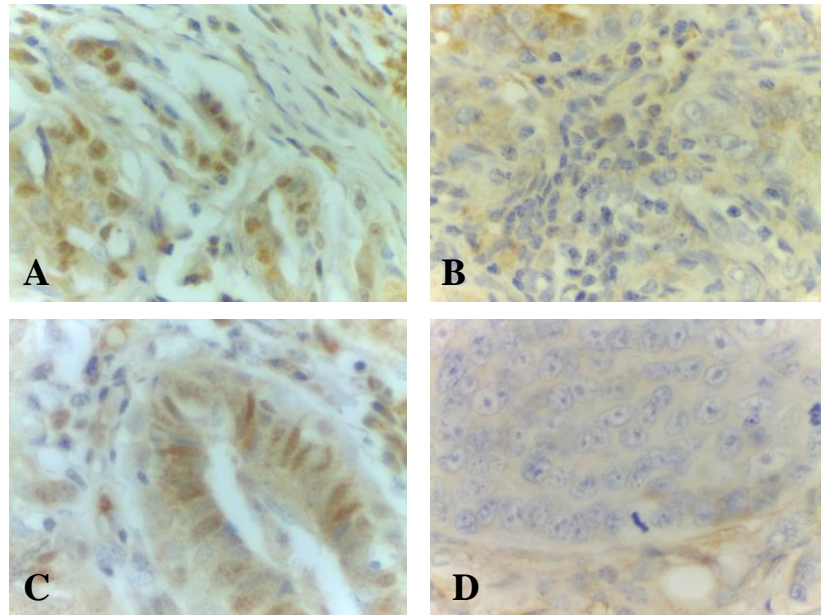


Figura 6. Inmunohistoquímica para RP en tumores mamarios caninos. Se observa expresión moderada, leve o ausente tanto en las células de tumores benignos (A, B) como malignos (C, D) (1000 X).

Variable	Total Score RP
<i>Tamaño tumoral</i>	
< 5 cm (n=10)	1,9 ± 0,5
> 5 cm (n=5)	1 ± 1
<i>Estadío clínico</i>	
I, II o III (n=10)	0,8 ± 0,4 *
IV o V (n=5)	3,2 ± 0,8
<i>Grado de malignidad</i>	
I (n=6)	1 ± 0,6
II (n=6)	2,5 ± 0,8
III (n=3)	1 ± 1
<i>Afectación de linfonodos</i>	
SI (n=6)	2,6 ± 0,8
NO (n=9)	0,8 ± 0,4
<i>Expresión de REα</i>	
Positivos (n=9)	1,2 ± 0,6
Negativos (n=6)	2,1 ± 0,7
<i>Expresión de REβ</i>	
Positivos (n=8)	1,5 ± 0,7
Negativos (n=7)	1,7 ± 0,6

Tabla 1. Asociación entre variables clínico - patológicas de valor pronóstico y la expresión del RP en los tumores mamarios malignos. Los valores se expresaron como el promedio del Total Score \pm el error estándar. El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas.

SEGUNDA PARTE

Estudio 2.1

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL RECEPTOR A OXITOCINA EN TEJIDO MAMARIO TUMORAL. ASOCIACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE RE α , RE β Y PARÁMETROS CLÍNICO – PATOLÓGICOS.

Reseña

La demostración de la presencia del ROT en líneas celulares de cáncer mamario humano, así como en carcinomas primarios de mama humanos, sugiere que la OT, a través de la interacción con su receptor, podría jugar un rol importante en la iniciación y/o progresión de este tipo de neoplasia (Bussolati *et al.*, 1996). Para nuestro conocimiento, hasta el momento no existen reportes en los que se haya estudiado la población de ROT en tumores mamaros caninos, ni su relación con los receptores a hormonas esteroideas o parámetros clínico - patológicos de valor pronóstico. Un único estudio ha demostrado la presencia del ROT en una línea celular de cáncer mamario canino, lo cual permite sugerir que este receptor también podría expresarse en tumores mamaros espontáneos de perras. El objetivo del presente estudio fue evaluar la presencia del ROT en tumores mamaros de perras, y analizar su asociación con la expresión de RE α , RE β y parámetros clínico-patológicos.

Materiales y métodos

Muestras

Las muestras tumorales fueron aquellas utilizadas en el Estudio 1.2. Se analizaron un total de 43 muestras, de las cuales 24 fueron tumores malignos y 19 tumores benignos. Dentro de los tumores malignos, los tipos histológicos analizados fueron el carcinoma túbulo-papilar (n=15), el carcinoma sólido (n=5) y el carcinosarcoma (n=4), y dentro de los benignos, los tipos histológicos analizados fueron el tumor mixto benigno (n=9), el adenoma simple (n=6) y el fibroadenoma (n=4).

Inmunohistoquímica

La técnica inmunohistoquímica fue realizada siguiendo el procedimiento descrito en la sección materiales y métodos de la presente tesis doctoral. Brevemente, luego de la exposición a suero equino normal, los cortes fueron sucesivamente incubados con el anticuerpo primario: ROT (anticuerpo policlonal, A-16: sc-34078, Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA), luego el anticuerpo secundario biotinilado (IgG equina conjugada-biotinilada anticabra, BA-9500, Vector Laboratories)

y finalmente con el complejo peroxidasa de rabanito-avidina-biotina (Vectastain, Elite ABC-Kit, Vector Laboratories, Cat N PK-6102). Como control positivo del ROT se utilizó útero canino normal.

Análisis de imagen

El análisis de imagen se realizó siguiendo la metodología descrita en la sección materiales y métodos de la presente tesis doctoral.

Análisis estadístico

La variable analizada fue el Total Score (TS), obtenido de la suma del porcentaje de área positiva (PS) y la intensidad de tinción (IS). Se realizó el análisis como fuera descrito en la sección materiales y métodos de la presente tesis doctoral.

Resultados

Observaciones generales de la inmunotinción

La inmunotinción del ROT se visualizó en la membrana y el citoplasma de las células tumorales. Con respecto al patrón de tinción, en algunos casos la tinción fue bien focalizada, mientras que en otros casos se observó una tinción difusa. Ambos patrones se observaron en forma indistinta tanto en tumores benignos como en malignos. Cuando los anticuerpos específicos fueron sustituidos por TBS, la ausencia de tinción fue indicativa de la especificidad de la inmunotinción observada para el receptor. En las muestras de útero (control positivo), la inmunotinción se observó en la membrana y el citoplasma de las células del epitelio luminal (Figura 1A) y glandular del endometrio (Figura 1B).

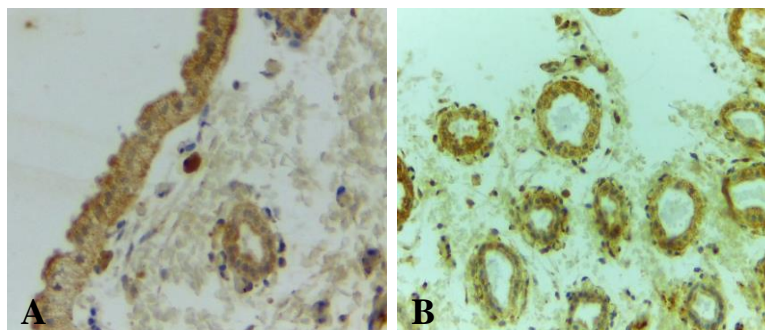


Figura 1. Endometrio canino utilizado como control positivo del ROT. A. Se observa tinción positiva en la membrana de las células del epitelio luminal (400 X). B. La inmunoreacción también se observa en el epitelio glandular (400 X).

Expresión del ROT en tumores mamarios caninos

El ROT se expresó en el 100% de los tumores mamarios caninos evaluados. No existieron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al TS entre tumores benignos y malignos (P=0,08) (Figuras 2 y 3).

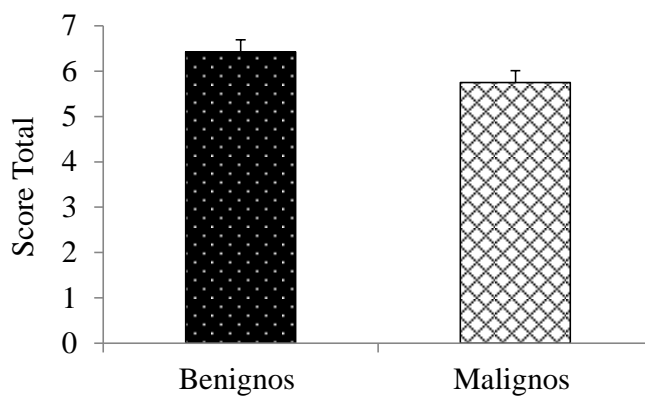


Figura 2. Score Total para el ROT en tumores mamarios benignos y malignos caninos.

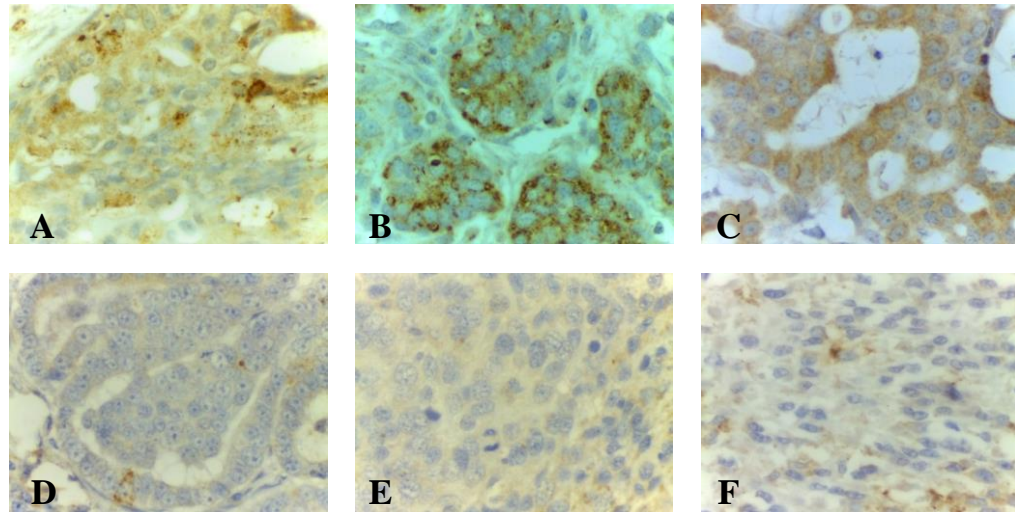


Figura 3. Inmunohistoquímica para el ROT en tumores mamarios caninos. A, B, C: Tumores mamarios benignos mostrando expresión intensa y moderada en las células epiteliales tumorales (1000 X); D, E, F: Tumores mamarios malignos mostrando expresión leve o ausente en las células tumorales (1000 X).

Asociación con RE α , RE β y parámetros clínico-patológicos

Al evaluar el TS del ROT en tumores mamarios benignos y malignos según el subtipo histológico, no se observaron diferencias significativas entre ellos (Figuras 4 y 5). En los tumores mamarios malignos estudiados, se evidenció una asociación significativa entre el GHM y la expresión del ROT, teniendo aquellos tumores de GHM I y II, un TS mayor en comparación con aquellos de GHM III (Tabla 1 y Figura 6). Asimismo, aquellos tumores malignos positivos para el RE α tendieron a tener un mayor TS para el ROT, comparado con aquellos tumores RE α -negativos (P=0,06) (Tabla 1).

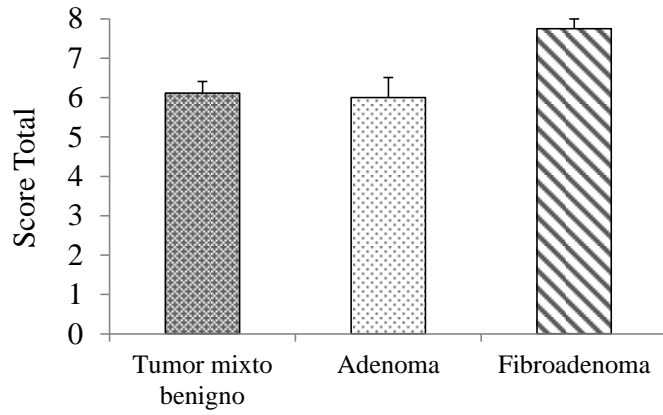


Figura 4. Score Total para el ROT en tumores mamarios benignos de acuerdo al tipo histológico.

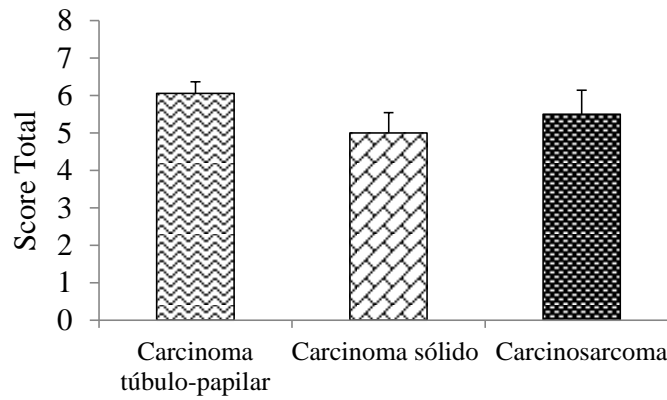


Figura 5. Score Total para el ROT en tumores mamarios malignos de acuerdo al tipo histológico.

Variable	Total Score ROT
Tamaño tumoral	
< 5 cm (14)	5,5 ± 0,33
> 5 cm (10)	6,1 ± 0,40
Estadío clínico	
I, II o III (17)	5,94 ± 0,26
IV o V (7)	5,28 ± 0,60
Grado de malignidad	
I (10)	6,2 ± 0,29 *
II (7)	6 ± 0,53 *
III (3)	4 ± 0
Afectación de linfonodos	
SI (8)	5,37 ± 0,53
NO (16)	5,93 ± 0,28
Expresión de REα	
Positivos (14)	6,27 ± 0,21 †
Negativos (10)	5,54 ± 0,37
Expresión de REβ	
Positivos (13)	6,26 ± 0,26
Negativos (11)	5,8 ± 0,27

Tabla 1. Asociación entre variables clínico - patológicas de valor pronóstico y la expresión del ROT en los tumores mamarios malignos. Los valores se expresaron como el promedio del Total Score \pm el error estándar. Los asteriscos (*) y el signo † indican diferencias estadísticamente significativas.

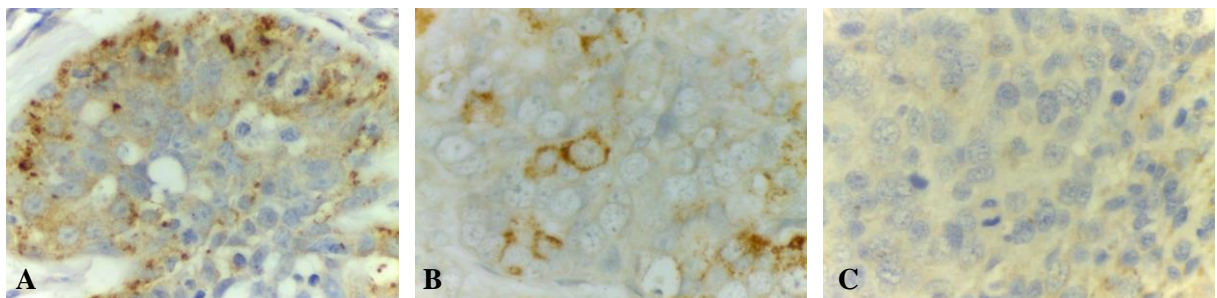


Figura 6. Inmunohistoquímica para ROT en tumores mamarios malignos. A. Carcinoma de GHM I mostrando tinción moderada en las células epiteliales tumorales. B. Carcinoma de GHM II mostrando tinción leve en las células tumorales. C. Carcinoma de GHM III mostrando ausencia de tinción en las células tumorales.

Estudio 2.2

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR A VASOPRESINA V2 EN TEJIDO MAMARIO TUMORAL CANINO. ASOCIACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE RE α , RE β Y PARÁMETROS CLÍNICO - PATOLÓGICOS.

Reseña

Diversos estudios en medicina humana han demostrado la presencia de la hormona arginina vasopresina tanto en tejido mamario normal como tumoral (Taylor *et al.*, 1990). Además, se ha reportado la presencia de los receptores a esta hormona en líneas celulares tumorales de diferentes orígenes, incluida la línea de cáncer mamario humano MCF-7 (North *et al.*, 1999). Más recientemente, mediante la técnica de inmunohistoquímica se ha demostrado la presencia del receptor V2 en carcinomas mamaros de mujeres (Weinberg *et al.*, 2015). Estos hallazgos sugieren que la vasopresina, a través de la interacción con sus receptores, podría influir sobre el desarrollo tumoral, lo cual reviste importancia al momento de investigar terapias orientadas a estos blancos moleculares. A pesar de los numerosos estudios realizados en medicina humana, hasta el momento se desconoce la existencia del RAVP V2 en las neoplasias mamaras caninas. El presente estudio tuvo como objetivo determinar la presencia del RAVP V2 en tumores mamaros benignos y malignos caninos, así como evaluar su posible asociación con RE α , RE β y parámetros clínico-patológicos.

Materiales y métodos

Muestras

Las muestras tumorales fueron las mismas que las del Estudio 1.3. Se analizaron un total de 26 muestras tumorales, de las cuales 15 fueron de naturaleza maligna y 11 fueron de naturaleza benigna. Dentro de los tumores malignos, los tipos histológicos analizados fueron el carcinoma túbulo-papilar (n=10) y el carcinoma sólido (n=5), y dentro de los benignos, el tumor mixto benigno (n=5) y el adenoma (n=6).

Inmunohistoquímica

La técnica inmunohistoquímica fue realizada siguiendo el procedimiento descrito en la sección materiales y métodos de la presente tesis doctoral. Brevemente, luego de la exposición a suero normal de cabra, los cortes fueron sucesivamente incubados con el anticuerpo primario:

RAVP V2 (anticuerpo policlonal, ab188748, Abcam, UK), anticuerpo secundario biotinilado (IgG de cabra conjugada-biotinilada anticonejo, AR-B1, LETH, Santa Fe, Argentina) y finalmente con el complejo peroxidasa de rabanita-avidina-biotina (Vectastain, Elite ABC-Kit, Vector Laboratories, Cat N PK-6102). Como control positivo del RAVP V2 se utilizó una muestra de riñón canino normal.

Análisis de imagen

El análisis de imagen se realizó siguiendo la metodología descrita en la sección materiales y métodos de la presente tesis doctoral.

Análisis estadístico

La variable analizada fue el Total Score (TS), obtenido de la suma del porcentaje de área positiva (PS) y la intensidad de tinción (IS). Se realizó el análisis como fuera descrito en la sección materiales y métodos de la presente tesis doctoral.

Resultados

Observaciones generales de la inmunotinción

La inmunotinción del RAVP V2 se visualizó en la membrana y el citoplasma de las células tumorales. La tinción fue focalizada en algunas células, mientras que en otras fue difusa. Ambos patrones de tinción ocurrieron en forma indistinta en tumores benignos y en malignos. Cuando los anticuerpos específicos fueron sustituidos por PBS, la ausencia de tinción fue indicativa de la especificidad de la inmunotinción observada para el receptor. En la muestra de riñón canino (control positivo), se observó tinción positiva en la membrana plasmática de las células tubulares renales (Figuras 1A y 1B).

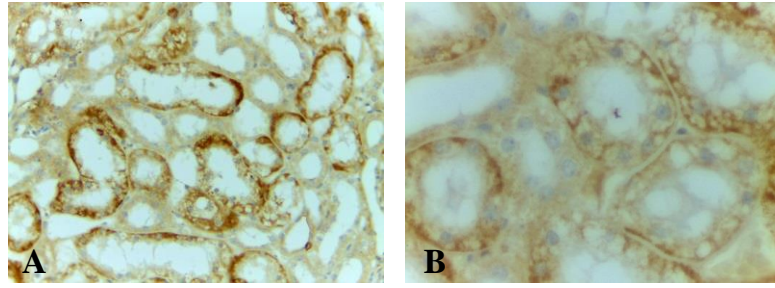


Figura 1. Riñón canino utilizado como control positivo para el RAVP V2. A. Células tubulares renales con tinción intensa (400 X). B. Células tubulares a mayor aumento, mostrando reacción positiva en la membrana celular (1000 X).

Expresión del RAVP V2 en tumores mamarios caninos

El RAVP V2 se expresó en el 100% de los tumores mamarios caninos evaluados. Cuando se comparó el TS de los tumores benignos con los malignos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas, siendo el TS muy elevado en todos los casos (Figuras 2 y 3).

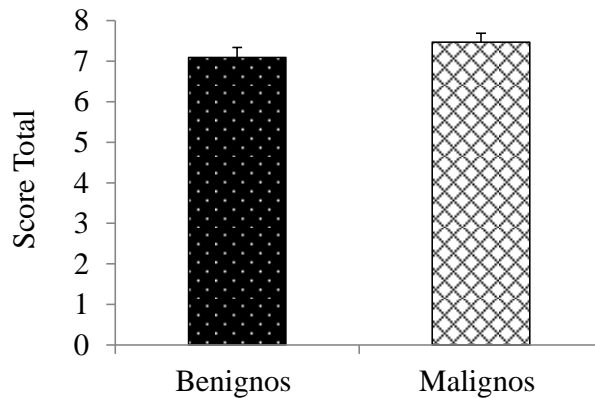


Figura 2. Score Total para el RAVP V2 en tumores mamarios benignos y malignos caninos.

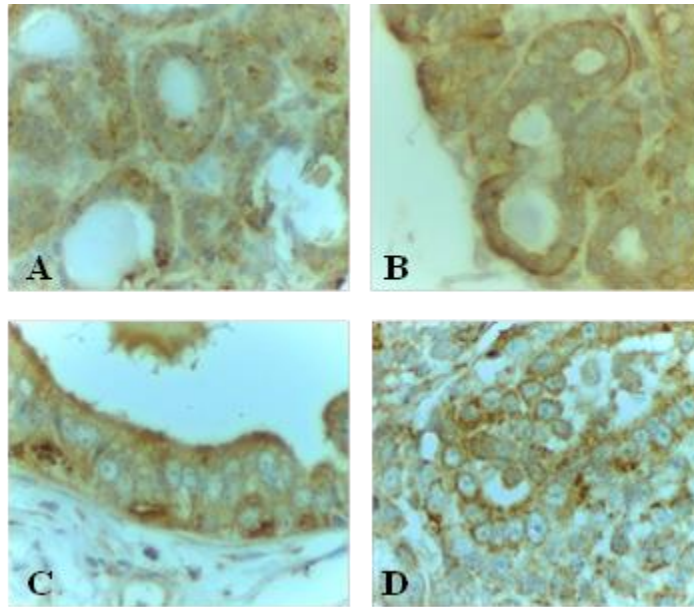


Figura 3. Inmunohistoquímica para el RAVP V2 en tumores mamarios caninos. Se observa expresión intensa y moderada en la membrana y el citoplasma de las células tumorales, tanto en tumores benignos (A y B) como malignos (C y D) (1000 X).

Asociación con receptores hormonales y parámetros clínico-patológicos

En referencia al subtipo histológico, no existió asociación entre este parámetro y la expresión del RAVP V2 (Figuras 4 y 5). Tampoco se observó asociación entre la expresión del RAVP V2 y las diferentes variables analizadas en el grupo de tumores mamarios malignos (Tabla 1).

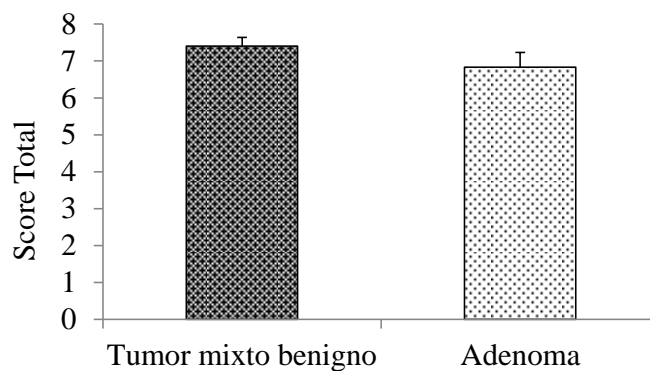


Figura 4. Score Total para el RAVP V2 en tumores mamarios benignos, de acuerdo al tipo histológico.

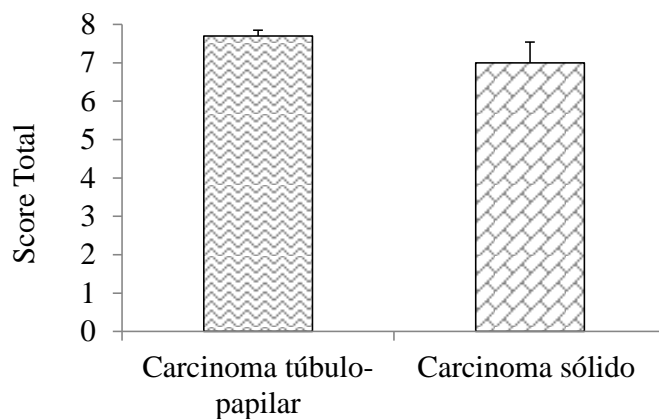


Figura 5. Score Total para el RAVP V2 en tumores mamarios malignos, de acuerdo al tipo histológico.

Variable	Total Score RAVP V2
<i>Tamaño tumoral</i>	
< 5 cm (n=10)	7,5 ± 0,3
> 5 cm (n=5)	7,4 ± 0,2
<i>Estadío clínico</i>	
I, II o III (n=10)	7,3 ± 0,3
IV o V (n=5)	7,8 ± 0,2
<i>Grado de malignidad</i>	
I (n=6)	7,5 ± 0,2
II (n=6)	7,6 ± 0,2
III (n=3)	7,0 ± 1,0
<i>Afectación de linfonodos</i>	
SI (n=6)	7,6 ± 0,2
NO (n=9)	7,3 ± 0,3
<i>Expresión de REα</i>	
Positivos (n=9)	7,5 ± 0,1
Negativos (n=6)	7,3 ± 0,5
<i>Expresión de REβ</i>	
Positivos (n=8)	7,5 ± 0,1
Negativos (n=7)	7,4 ± 0,4

Tabla 1. Asociación entre variables clínico - patológicas de valor pronóstico y la expresión del RAVP V2 en los tumores mamarios malignos. Los valores se expresaron como el promedio del Total Score \pm el error estándar.

TERCERA PARTE

Estudio preliminar

EXPRESIÓN DEL RECEPTOR A OXITOCINA Y VASOPRESINA V2 EN UNA LÍNEA CELULAR ESTABLECIDA DE CÁNCER MAMARIO CANINO

Reseña

Diversos trabajos en líneas celulares de cáncer mamario humano han demostrado la presencia del ROT y RAVP V2 en las células tumorales (Bussolati *et al.*, 1996; North *et al.*, 1999). El conocimiento de la presencia del ROT y RAVP V2 en una línea celular de cáncer mamario canino sería de utilidad para evaluar el efecto de drogas que utilicen como mecanismo de acción la unión a alguno de estos receptores. El presente estudio tuvo como objetivo determinar la presencia del ROT y RAVP V2 en las células tumorales de la línea CMT-U27.

Materiales y métodos

La determinación de la presencia del ROT y RAVP V2 en la línea CMT-U27 se realizó mediante la técnica de inmunohistoquímica. Brevemente, las células fueron cultivadas de manera rutinaria en botellas de 25 cm², con medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB y antibióticos. Cuando la monocapa alcanzó una confluencia aproximada del 80%, las células fueron lavadas con PBS estéril, y desprendidas con EDTA al 0,12% durante 5 min. La suspensión celular fue transferida a un tubo cónico y centrifugada durante 10 min a 1000 rpm. Posteriormente, se descartó el sobrenadante, y se adicionó paraformaldehído al 4% para fijar las células. Transcurridos 5-10 min, las células fueron centrifugadas, se descartó el sobrenadante, y se adicionaron 20 µl de agar fundido al 2%, asegurándose que las células queden inmersas en el agar. Posteriormente, se procesó el culot de agar con células hasta su inclusión en parafina siguiendo el procedimiento histológico de rutina previamente descrito en la sección materiales y métodos. Luego, se realizaron cortes de 4 µ mediante un micrótomo, y se realizó la técnica de inmunohistoquímica como fuera descrito previamente en la sección materiales y métodos.

Resultados

Las células de la línea CMT-U27 mostraron expresión para el ROT (Figura 1) y el RAVP V2 (Figura 2). La inmunotinción para ambos receptores se localizó tanto en la membrana plasmática como en el citoplasma de las células tumorales.

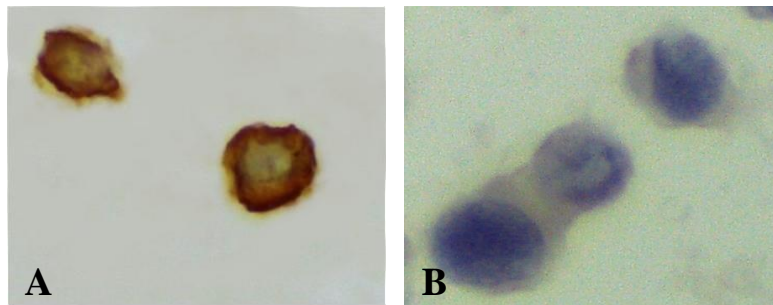


Figura 1. A. Presencia del ROT en las células de la línea CMT-U27. Se observa tinción en la membrana plasmática, así como en el citoplasma de las células tumorales (1000 X). B. Control negativo para el ROT (1000 X).

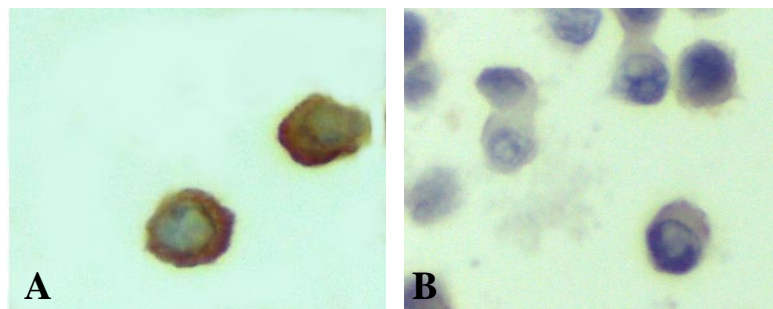


Figura 2. A. Presencia del RAVP V2 en las células tumorales de la línea CMT-U27. Se observa tinción en la membrana plasmática, así como en el citoplasma de las células (1000 X). B. Control negativo para el RAVP V2 (1000 X).

Estudio 3.1

EFFECTOS DE LA OXITOCINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MAMARIAS TUMORALES CANINAS IN VITRO.

Reseña

Estudios realizados *in vitro* utilizando líneas celulares de cáncer humano de diversos orígenes (mamario, endometrial, óseo, neural) han demostrado la capacidad de la OT de inhibir la proliferación de las células neoplásicas (Cassoni *et al.*, 1994; Cassoni *et al.*, 1998). Para nuestro conocimiento, hasta el momento existe un único estudio en el que se evaluó el efecto de esta hormona sobre células mamarias tumorales caninas (Bergman, 2012).

Materiales y métodos

Como fuera mencionado anteriormente, para los ensayos *in vitro* se utilizó la línea celular CMT-U27 de cáncer mamario canino. Las células fueron cultivadas en botellas de 25 cm², con medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB y antibióticos, hasta la realización del ensayo. Se realizó el seguimiento diario observando las células en un microscopio invertido (Leica Biosystems). Luego de descartar el medio, las células fueron lavadas 3 veces con PBS estéril, y disociadas utilizando EDTA al 0,12% durante 5-7 minutos. Se realizó el recuento celular en cámara de Neubauer, utilizando la tinción de Azul Tripán. Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos en dos densidades: 4x10³ y 8x10³ células por pocillo, con 200 µl de medio RPMI 1640 y 10% SFB, y se incubaron en estufa a 37 °C en atmósfera humedecida con 5% de CO₂ durante 24 horas para permitir su adherencia. Posteriormente, el medio de cultivo fue removido y reemplazado por medio nuevo adicionado con OT (Chemo-Romikin S.A., Argentina) en cinco concentraciones: 10, 50, 100, 500 y 1000 nM, dejando pocillos con medio sin droga como control. Cada una de las concentraciones fue evaluada por triplicado, y cada ensayo fue realizado cuatro veces. Luego de 72 horas, se realizó el ensayo colorimétrico del MTT para evaluar la viabilidad celular. Las placas fueron leídas en un lector de placas a una longitud de onda de 595 nm (Beckman Coulter, DTX 880 Multimode Detector). El análisis estadístico se realizó como fuera descripto en la sección materiales y métodos de la presente tesis doctoral. En el cuadro 1 se incluyen los datos sobre el número de pasaje celular, los días transcurridos desde la resiembra al inicio del ensayo, y los días transcurridos desde el cambio de medio al inicio del ensayo en cada uno de los experimentos realizados.

Nro ensayo OT	Nro repique	Días desde la resiembra al ensayo	Días desde el cambio de medio al ensayo
1	143	4	2
2	145	7	3
3	147	8	4
4	148	4	4

Cuadro 1. Datos sobre número de pasaje celular, y días transcurridos desde la resiembra de las células y el cambio del medio de cultivo al inicio del ensayo en los 4 experimentos realizados.

Resultados

Con 4×10^3 células/well, la OT disminuyó el crecimiento celular a concentraciones de 50 y 500 nM, en un 18 y un 9%, respectivamente. La menor dosis de OT administrada a los cultivos, mostró una leve tendencia a disminuir el crecimiento. La OT en concentraciones más elevadas (1000 nM) logró reducir la proliferación en un 25%, lo cual resultó estadísticamente significativo ($P < 0.01$). A concentraciones de 100 nM, la OT no afectó la proliferación de las células tumorales (Figura 1).

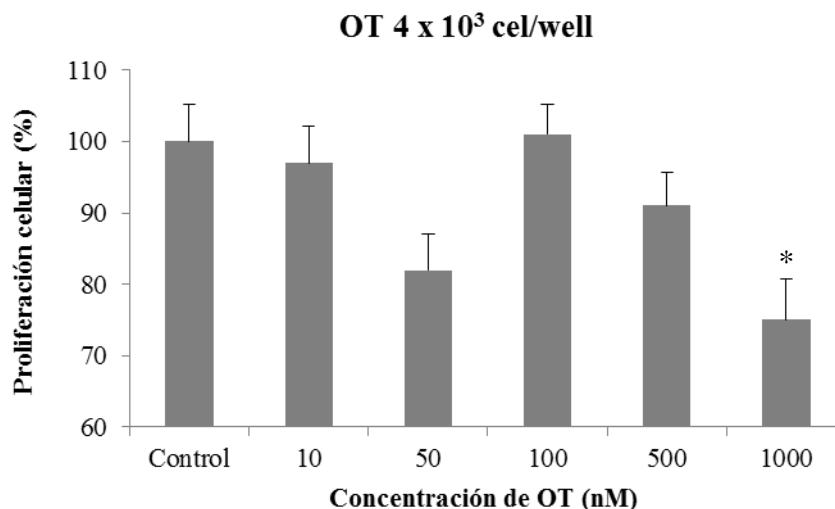


Figura 1: Efectos de la OT sobre la línea celular CMT-U27. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos (4×10^3 cel/well) con las respectivas concentraciones de la droga. El MTT fue realizado a las 72 h. El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$). Los valores representan el promedio \pm el error estándar de 12 medidas replicativas de cuatro experimentos independientes.

Con respecto a los experimentos con 8×10^3 células/well, la OT a concentraciones de 10, 50, 100 y 500 nM mostró un efecto antiproliferativo leve a moderado (7-12% aproximadamente). La dosis más elevada de OT (1000 nM) causó una inhibición significativa del crecimiento de las células CMT-U27 (22%) ($P < 0,05$) (Figura 2).

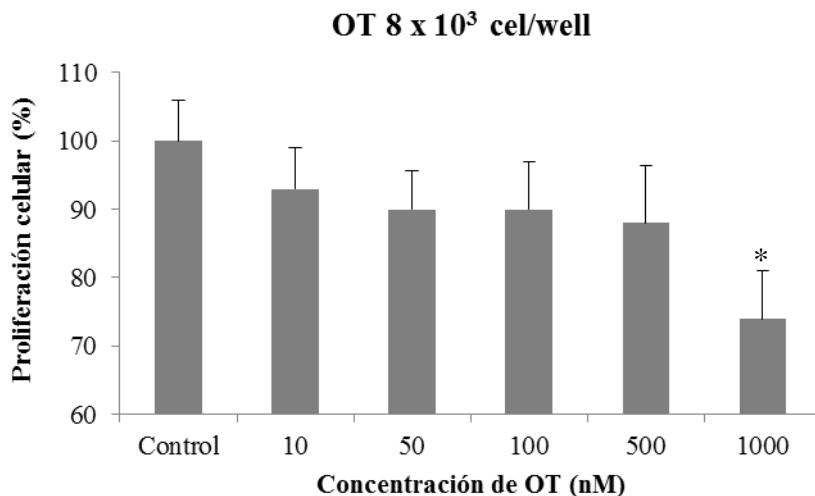


Figura 2: Efectos de la OT sobre la línea celular CMT-U27. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos (8×10^3 cel/well) con las respectivas concentraciones de la droga. El MTT fue realizado a las 72 h. El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$). Los valores representan el promedio \pm el error estándar de 12 medidas replicativas de cuatro experimentos independientes.

Estudio 3.2

EFFECTOS DE LA DESMOPRESINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MAMARIAS TUMORALES CANINAS IN VITRO.

Reseña

Estudios realizados *in vitro*, utilizando líneas celulares de cáncer mamario murino y humano han demostrado que tanto la vasopresina como los péptidos análogos a ella tienen la capacidad de modular el crecimiento de las células tumorales (Keegan *et al.*, 2006, Ripoll *et al.*, 2008). Este efecto modulador del crecimiento puede ser estimulatorio o inhibitorio, y estaría mediado por la interacción de las moléculas con los distintos subtipos del receptor a vasopresina presentes en la membrana celular. El efecto inhibitorio del crecimiento tumoral también se ha demostrado *in vivo*, en modelos murinos de cáncer mamario (Girón *et al.*, 2002). Hasta el momento, se desconoce el efecto de la Desmopresina (análogo de la vasopresina) sobre el crecimiento de células mamarias tumorales caninas *in vitro*.

Materiales y métodos

El ensayo se realizó siguiendo la metodología descrita para el Estudio 3.1, con la diferencia que las células fueron incubadas con el péptido Desmopresina (Laboratorios Elea, Buenos Aires, Argentina). En el cuadro 2 se incluyen los datos sobre el número de pasaje celular, los días transcurridos desde la resiembra al inicio del ensayo, y los días transcurridos desde el cambio de medio al inicio del ensayo en cada uno de los experimentos realizados.

Nro ensayo DDAVP	Nro repique	Días desde la resiembra al ensayo	Días desde el cambio de medio al ensayo
1	149	6	3
2	149	4	4
3	150	4	3
4	151	9	3

Cuadro 2. Datos sobre número de pasaje celular, y días transcurridos desde la resiembra de las células y el cambio del medio de cultivo al inicio del ensayo en los 4 experimentos realizados.

Resultados

Con la menor densidad celular (4×10^3 células/well) el crecimiento de la línea CMT-U27 tendió a ser menor con la adición de DDAVP en concentraciones de 50, 100 y 500 nM. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. El tratamiento de los cultivos con DDAVP 1000 nM, resultó en un efecto antiproliferativo significativo (22%) ($P < 0,05$). La adición de DDAVP 10 nM no mostró efectos sobre el crecimiento de las células tumorales (Figura 3).

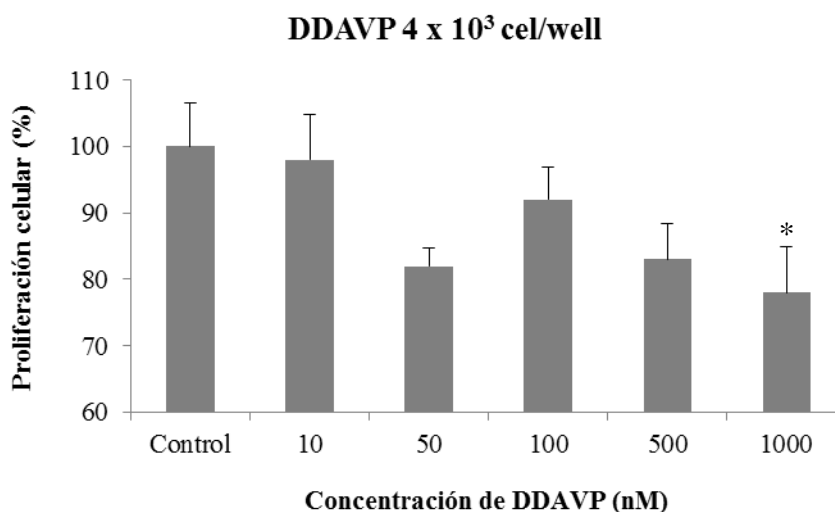


Figura 3: Efectos de la DDAVP sobre la línea celular CMT-U27. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos (4×10^3 cel/well) con las respectivas concentraciones de la droga. El MTT fue realizado a las 72 h. El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$). Los valores representan el promedio \pm el error estándar de 12 medidas replicativas de cuatro experimentos independientes.

Con 8×10^3 células/well, DDAVP en concentraciones de 100, 500 y 1000 nM ejerció un moderado efecto inhibitorio (15% aproximadamente). Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($P > 0,05$). La adición del péptido en concentraciones bajas (10 y 50 nM) no modificó el crecimiento de las células tumorales (Figura 4).

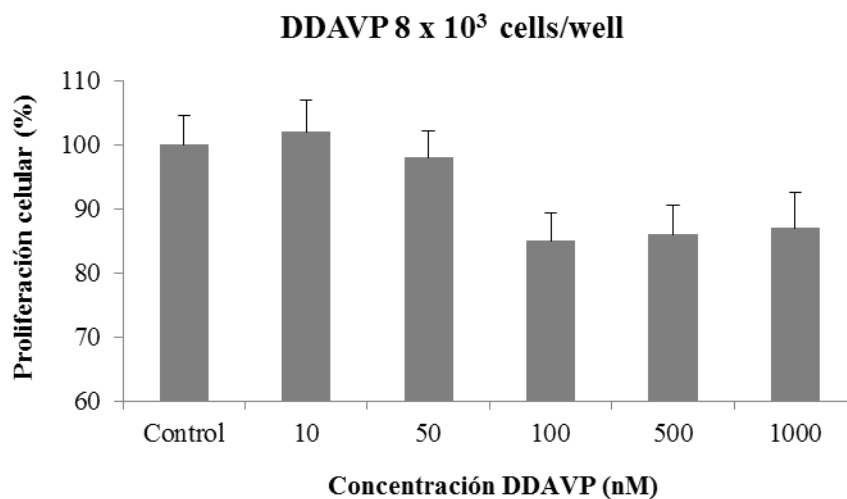


Figura 4: Efectos de la DDAVP sobre la línea celular CMT-U27. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos (8×10^3 cel/well) con las respectivas concentraciones de la droga. El MTT fue realizado a las 72 h. Los valores representan el promedio \pm el error estándar de 12 medidas replicativas de cuatro experimentos independientes.

DISCUSION

La presente tesis doctoral ha permitido aportar conocimientos acerca de la influencia del componente hormonal sobre el desarrollo de las neoplasias mamarias en caninos. Particularmente, se ha aportado información referente a la expresión de receptores a hormonas en tumores mamarios benignos y malignos, así como su asociación con factores clínicos y patológicos de valor pronóstico en la hembra canina. Asimismo, se ha evaluado el efecto de dos péptidos (oxitocina y desmopresina) sobre la proliferación de células mamarias tumorales caninas *in vitro*.

En la literatura existen numerosos estudios en los que se describen y analizan diferentes aspectos de los tumores mamarios en caninos, incluyendo características epidemiológicas, clínicas y patológicas. Sin embargo, la mayor parte de estos trabajos son de origen europeo o norteamericano, existiendo pocos reportes provenientes de nuestro país. Por este motivo, en el estudio 1.1 de la presente tesis se ha realizado una caracterización clínica y patológica de los tumores mamarios caninos, con el objetivo de obtener información local acerca de estos aspectos. Asimismo, esta información resultó fundamental para realizar los posteriores estudios de la presente tesis. En cuanto a los aspectos clínicos observados en las perras con tumores mamarios incluídas en el estudio 1.1, se observó que la edad promedio de aparición de esta neoplasia fue de 9,4 años, con un rango de 4 a 16 años. Esta información es coincidente con reportes de otros autores, que indican un incremento en la aparición de tumores mamarios entre los 8 y 10 años (Misdorp, 2002; Lana *et al.*, 2007), siendo rara la presentación en perras menores a 5 años, salvo que hayan sido tratadas con progestágenos exógenos (Sorenmo *et al.*, 2011). En coincidencia, en nuestro estudio, la única paciente que presentó tumores mamarios a los 4 años de edad, había sido tratada con progestágenos con fines anticonceptivos.

Con respecto a la condición reproductiva de las perras incluídas en nuestro estudio, el 77% de ellas estaban enteras al momento de la evaluación clínica. Resulta interesante destacar que, del 23% restante que se encontraban castradas, todas habían sido operadas luego de los tres años de edad. Estos hallazgos dan mayor sustento a la hipótesis de que las hormonas esteroides sexuales juegan un papel fundamental en la patogénesis de las neoplasias mamarias en caninos, y que si la ovariectomía es realizada luego del segundo celo (después de los 2-2,5 años aproximadamente), el efecto protector de la misma desaparece (Schneider *et al.*, 1969; Sonnenschein *et al.*, 1991). Asimismo, se ha demostrado que la incidencia de tumores mamarios caninos es menor en países como Estados Unidos y algunos de Europa Occidental, donde es habitual realizar la ovariectomía de

las mascotas a edades tempranas (Egenvall *et al.*, 2005). Por el contrario, en países como España o regiones de Latinoamérica, en los que la castración de los animales no se efectúa de rutina, la incidencia de tumores mamarios es más elevada (Pérez-Alenza *et al.*, 2000). Por tanto, los hallazgos del presente estudio nos permiten reforzar la recomendación de que las perras sean esterilizadas antes del segundo celo, con el objetivo de reducir las posibilidades de padecer tumores mamarios en el futuro.

En la literatura existen diversos estudios epidemiológicos que analizan la predisposición de las diferentes razas a padecer esta patología. Entre las razas mayormente citadas por los autores se encuentran el Poodle, Cocker Spaniel, Dachshund, Yorkshire Terrier, Ovejero Alemán, Pointer y Maltés, entre otros (Itoh *et al.*, 2004; Zatloukal *et al.*, 2005). La variabilidad que se observa en las razas entre los diferentes estudios podría deberse al área geográfica donde se hayan realizado los mismos, lo que determina que exista una mayor población de perros de una u otra raza en particular. En nuestro estudio, dado que sólo observamos la distribución de los tumores mamarios según la raza en las muestras analizadas, sin realizar un estudio epidemiológico, no es posible realizar inferencias acerca de una mayor o menor predisposición a padecer tumores mamarios en las razas observadas. Así, la mayor presentación de neoplasias mamarias que se observó en perros mestizos podría deberse a una mayor cantidad de este tipo de animales en nuestro país. Sin embargo, resulta interesante destacar que, luego de los mestizos, las razas puras que se presentaron en mayor número fueron el Ovejero Alemán y el Cocker, las cuales se encuentran entre las razas propuestas por algunos autores como predisuestas a padecer tumores mamarios (Zatloukal *et al.*, 2005; Salas *et al.*, 2015).

En lo que respecta a la clasificación de las perras por estadio clínico, un hallazgo para destacar es que la gran mayoría de ellas (85%) se encontraban en estadios clínicos I, II, o III al momento de la evaluación clínica. Estos tres estadios suelen asociarse con una mayor supervivencia general luego del tratamiento quirúrgico en comparación con los estadios IV y V (Owen, 1980; Chang *et al.*, 2005). La elevada presentación de perras que se observó en los primeros tres estadios clínicos podría estar relacionada con la mayor atención que reciben las mascotas por parte de los propietarios en la actualidad, influyendo en la rapidez con que éstos las llevan al veterinario una vez que detectan un nódulo. La identificación de pacientes en los primeros estadios de la enfermedad representa una ventaja a la hora de incorporar nuevas propuestas terapéuticas que permitan reducir

las probabilidades de recidiva del tumor, y así lograr un mayor período de sobrevida de las pacientes.

En cuanto a la incidencia de tumores benignos y malignos, de 65 casos se encontró que 26 (40%) correspondieron a neoplasias benignas, y 39 (60%) a neoplasias malignas, resultados que coinciden con el trabajo de Torres Vidales y Botero Espinosa (2008). Sin embargo, otros reportes describen porcentajes inferiores respecto de la malignidad histológica, habiendo autores que señalan incidencias del 50% (Lana *et al.*, 2007) y del 30% (Misdorp, 2002). Se especula que estas diferencias entre estudios podrían deberse a errores en el diagnóstico, ya que si bien la discriminación entre un tumor benigno y uno maligno se basa en diversas características histológicas, en algunos casos resulta difícil poder distinguir entre uno y otro. De este modo, se estima que alrededor del 10% de los tumores malignos son erróneamente diagnosticados como benignos, lo cual representa un problema al momento de establecer un pronóstico y tratamiento adecuados (Sleekx *et al.*, 2011). Considerando el tejido de origen de la neoplasia, el 74% de los tumores malignos analizados en el presente estudio fueron de origen epitelial, es decir carcinomas, hallazgos que concuerdan con la mayoría de los trabajos al respecto (Hellmén *et al.*, 1993; Novosad, 2003; Salas *et al.*, 2015). Dentro del grupo de tumores benignos, el tipo histológico más comúnmente diagnosticado fue el adenoma (considerando los simples y los complejos), lo cual coincide con los reportes de Benjamin *et al.*, (1999) y Sorenmo *et al.*, (2009). Otros autores, por el contrario, reportan para los tumores benignos una mayor frecuencia de tumores mixtos benignos (Torres Vidales y Botero Espinosa, 2008; Salas *et al.*, 2015), tipo histológico que en nuestro estudio ocupó el segundo lugar. Al momento se desconoce el verdadero origen de los tumores mixtos, pero algunos autores postulan que este subtipo histológico podría derivar de un estadio intermedio constituido por un adenoma complejo, en el que las células mioepiteliales sufrirían metaplasia para transformarse en tejido óseo o cartilaginoso, característico de los tumores mixtos (Benjamin *et al.*, 1999; Goldschmidt *et al.*, 2011).

Considerando la gran complejidad en lo que respecta a la clasificación histológica de los tumores mamarios, el sistema de graduación histológica de malignidad tumoral (GHM) permite completar la información diagnóstica y emitir un pronóstico más preciso. Como fuera mencionado previamente, aquellos pacientes con tumores de GHM I se asocian a un buen pronóstico, mientras que los que presentan tumores de GHM II y III tienen más probabilidades de sufrir una recidiva y por lo tanto se asocian con peor pronóstico (Karayannopoulou *et al.*, 2005). En el presente estudio,

el 50% de los tumores mamarios malignos fueron de GHM I, el 36% fueron de GHM II y el 14% fueron de GHM III. El hecho de que la mitad de los tumores malignos hayan sido de GHM I y II, podría estar relacionado con la gran proporción de carcinomas simples túbulo-papilares diagnosticados, tipo histológico que se asocia con mejor pronóstico en comparación con otros carcinomas simples (sólido o anaplásico), con tumores mixtos malignos o con sarcomas. Además, también se encuentra en relación con el elevado porcentaje de perras que se encontraban en estadíos clínicos I, II y III, como fuera mencionado previamente. Por lo tanto, dada la valiosa información que aportan el subtipo histológico y el GHM, es conveniente la realización del estudio histológico ante cada tumor mamario que se presenta en la clínica veterinaria, a fin de poder predecir el pronóstico y establecer el tratamiento más adecuado para cada paciente.

Teniendo en cuenta que las hormonas sexuales estrógenos y progesterona juegan un papel importante en la etiopatogenia de los tumores mamarios caninos, y que se ha demostrado la presencia de receptores a estas hormonas en el tejido tumoral (Rutteman *et al.*, 1988), se realizó un estudio para determinar la población de RE α , RE β y RP en los tumores mamarios caninos, con el objetivo de aportar información acerca de estos marcadores.

Se considera pertinente aclarar que las neoplasias mamarias en caninos comparten bastantes similitudes con las neoplasias mamarias en la mujer, por lo que a lo largo de la presente tesis se realizarán comparaciones o referencias acerca del cáncer mamario en humanos. Las similitudes incluyen aspectos clínicos, epidemiológicos e histológicos (Sonnenschein *et al.*, 1991). Entre otras, tanto el cáncer mamario humano como canino ocurren principalmente en hembras, y la incidencia aumenta con la edad. Además, en ambas especies la mayoría de los tumores malignos derivan de tejido epitelial, y suelen hacer metástasis a pulmón y otros órganos distantes. La influencia de las hormonas esteroides sexuales en la aparición de tumores mamarios ha sido demostrada en ambas especies. Por último, las perras están expuestas a los mismos factores de riesgo ambientales que los seres humanos (Kumaraguruparan *et al.*, 2006; Thuroczy *et al.*, 2007). Incluso, la perra se ha planteado como un modelo para estudiar la patogénesis e investigar nuevas estrategias terapéuticas del cáncer mamario en la mujer.

Los resultados obtenidos en el estudio 1.2 para el RE α en el total de tumores mamarios analizados fueron similares a los descritos previamente por otros autores (MacEwen *et al.*, 1982; Yang *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2009), dado que el 70% de ellos fueron positivos. Asimismo, y en concordancia con lo reportado por otros trabajos (Rutteman *et al.*, 1988; Nieto *et al.*, 2000), los

valores del RE α fueron significativamente mayores en tumores benignos comparados con malignos. En la perra, al contrario de lo que ocurre en la mujer, la mama normal expresa RE α , y esta expresión disminuye progresivamente desde las hiperplasias, a los tumores benignos y los malignos (Gerald *et al.*, 2000; Nieto *et al.*, 2000; Millanta *et al.*, 2005). Dicho de otro modo, la expresión del RE α disminuye a medida que el tumor progresa hacia la malignidad. Si bien en general todos los autores concuerdan con esta idea, el porcentaje de tumores positivos benignos y malignos varía considerablemente entre estudios, reportándose tumores benignos positivos en el 49% (Martin de las Mulas *et al.*, 2005), 65% (Morris *et al.*, 2009), 95% (Millanta *et al.*, 2005) y 100% (Yang *et al.*, 2006) de los casos, y para los malignos, se han descrito tumores positivos en el 10% (Illera *et al.*, 2006), 22% (Martin de las Mulas *et al.*, 2005), 46% (Morris *et al.*, 2009), 67% (Yang *et al.*, 2006) y 92% (Millanta *et al.*, 2005) de los casos. En el presente estudio, el porcentaje de tumores benignos y malignos positivos al RE α fue del 84% y 58%, respectivamente. Se especula que las variaciones entre estudios podrían deberse a diferencias en el método de detección de los receptores, así como a los distintos métodos de evaluación y puntuación utilizados (Peña *et al.*, 2014). Además, los resultados pueden verse afectados por factores como una inadecuada fijación de los tejidos, deficiencias en el sistema de recuperación antigénica, o falta de controles positivos y negativos adecuados. Recientemente, Peña *et al.*, (2014) publicaron una serie de lineamientos y criterios para la cuantificación de receptores a estrógenos y progesterona en tumores mamarios caninos, los cuales fueron tenidos en cuenta al realizar y analizar las inmunohistoquímicas del presente trabajo de tesis.

En la mujer, numerosos estudios hacen referencia a la asociación del RE α con parámetros clínicos y patológicos de las neoplasias mamarias malignas, así como al valor pronóstico de este receptor. Actualmente, la detección de los receptores hormonales en el cáncer mamario humano es una práctica que se realiza de rutina, dado que brinda información para predecir el pronóstico y establecer la modalidad terapéutica más adecuada (Hammond *et al.*, 2010). En general, se considera que aquellas pacientes con tumores positivos para el RE α responderán a la terapia hormonal (ej.: antiestrógeno tamoxifeno). Por su parte, la ausencia de RE α en el tumor se relaciona con características de malignidad tumoral, con un corto período libre de enfermedad y una menor supervivencia de las pacientes (Platet *et al.*, 2004). En la perra, los estudios que evalúan la asociación entre la expresión del RE α y factores clínico-patológicos o el pronóstico no son concordantes en todos los casos, por lo cual, en el estudio 1.2 de la presente tesis, se analizó la asociación entre este receptor y algunas variables clínico patológicas de conocido valor pronóstico.

Respecto del subtipo histológico, se observó un mayor TS en los carcinomas túbulo-papilares en comparación con los carcinomas sólidos, resultados que coinciden con reportes previos (Martin de las Mulas *et al.*, 2005). En forma similar, Chang *et al.*, (2009) reportaron una mayor expresión del RE α en los carcinomas de tipo complejo, en comparación con aquellos de tipo simple o con sarcomas. Estudios previos demostraron que el subtipo histológico puede influir sobre la sobrevida de las perras con tumores mamarios malignos. En este sentido, los carcinomas complejos y los simples túbulo-papilares tienen un comportamiento menos agresivo comparado con otros carcinomas simples o con sarcomas, y por tanto tienen mejor pronóstico (Misdorp *et al.*, 1999; Philibert *et al.*, 2003; Rasotto *et al.*, 2017). Por el contrario, otros autores no han encontrado relación alguna entre el RE α y el subtipo histológico (Millanta *et al.*, 2005; Toniti *et al.*, 2009).

Al igual que ocurrió con el subtipo histológico, se pudo observar asociación entre una elevada expresión del RE α y un bajo GHM, lo cual concuerda con trabajos previos en caninos (Martin de las Mulas *et al.*, 2005). El GHM establece el grado de diferenciación celular de las neoplasias, y para su determinación se utiliza el sistema de graduación del cáncer mamario humano, conocido como el método de Elston y Ellis (o método de Nottingham) (Elston y Ellis, 1991), el cual ha sido modificado para su utilización en caninos. El valor pronóstico de este parámetro en los tumores mamarios caninos ha sido demostrado tanto en estudios prospectivos como retrospectivos (Karayannopoulou *et al.*, 2005; Peña *et al.*, 2012; Rasotto *et al.*, 2012).

En el presente trabajo de tesis, las perras de las cuales se obtuvieron muestras tumorales provenían de clínicas veterinarias particulares diferentes, por lo que no fue posible realizar el seguimiento de los animales luego de la mastectomía. Por tanto, no se pudo obtener información acerca de la asociación entre la expresión del RE α y la sobrevida libre de enfermedad o sobrevida total de las pacientes, que permitan hacer inferencias acerca del valor pronóstico del RE α . Sin embargo, dada la asociación hallada entre este receptor y el subtipo histológico y el GHM (parámetros de conocido valor pronóstico), se podría sugerir que, al igual que en el cáncer mamario humano, la expresión del RE α es un indicador de diferenciación de las células tumorales, y estaría asociada con un mejor pronóstico comparado con pacientes con tumores RE α negativos. Teniendo en cuenta los resultados de la presente Tesis, junto con aquellos de otros autores, sería recomendable incorporar la determinación de la expresión del RE α de manera rutinaria para las neoplasias mamarias caninas, dado su potencial valor pronóstico.

Por último, en el presente estudio no se observó asociación entre la expresión del RE α y el tamaño tumoral, el estadio clínico o el estado de los linfonodos regionales, lo cual se contrapone con reportes previos en los que la expresión de este receptor se asoció con un bajo tamaño tumoral (menor a 5 cm), estadíos clínicos I, II o III, y ausencia de metástasis a linfonodos regionales (Nieto *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2009).

En la perra, los trabajos acerca del RE β en tumores mamarios son escasos, por lo que en el estudio 1.2 se determinó la expresión de este receptor en neoplasias benignas y malignas, y se evaluó su posible asociación con factores de valor pronóstico. Del total de tumores mamarios analizados en el presente estudio, el RE β resultó positivo en el 53% de los casos. Además, el porcentaje de tumores benignos y malignos positivos observado fue muy similar en ambos grupos (52% y 54%, respectivamente). En coincidencia con nuestras observaciones, Port Louis *et al.*, (2012) reportaron una expresión del RE β muy similar entre tumores mamarios benignos y malignos (82% y 78% respectivamente), aunque los valores hallados en ambos grupos fueron más elevados que en nuestro estudio. Al igual que el trabajo de Port Louis *et al.*, (2012), otros autores han reportado una alta positividad del RE β en los tumores mamarios malignos (Hermo *et al.*, 2010), incluso en carcinomas inflamatorios (Illera *et al.*, 2006), tipo histológico altamente angiogénico, invasivo y con un curso clínico fulminante. Dado que se han encontrado niveles elevados de 17 β -estradiol en los tejidos tumorales malignos (Peña *et al.*, 2003), los autores sugieren que en carcinomas inflamatorios y no inflamatorios, los estrógenos podrían actuar de forma local a nivel mamario estimulando el crecimiento de las células tumorales a través de la unión al RE β y no a través del RE α , dado que en general estos tumores son negativos al RE α . A diferencia de los resultados del presente estudio de tesis, y de los trabajos que reportan una elevada expresión del RE β en TMC, un estudio previo acerca del RE β en caninos reportó una mayor expresión del RE β en tumores benignos (60%) comparado con tumores malignos (26%) (Martín de Las Mulas *et al.*, 2004). En el cáncer mamario humano, en los últimos años se ha determinado que el subtipo β del RE cumpliría una función en la patogenia del cáncer mamario humano. Sin embargo, su función aún no está clara, reportándose en algunos casos una menor o igual expresión en tumores malignos en comparación con benignos (Conde *et al.*, 2004). Asimismo, los estudios acerca de su valor pronóstico reportan resultados contrapuestos. Así, Järvinen *et al.* (2000) encontraron que el 60% de los tumores mamarios malignos eran positivos al RE β , y que esta expresión estaba asociada con indicadores de baja agresividad tumoral, como un bajo grado de malignidad y linfonodos negativos

a la metástasis. Posteriormente, se identificó al RE β como un indicador de pronóstico favorable en mujeres con cáncer mamario (Nakopoulou *et al.*, 2004). Sin embargo, un estudio más reciente reportó que altos niveles del RE β en el tumor se asociaron con cortos períodos de supervivencia, junto con pobre diferenciación tumoral y metástasis a linfonodos, lo cual sugiere que este receptor sería un indicador de mal pronóstico (Kim *et al.*, 2012). En consecuencia, tanto en caninos como en humanos, aún no se ha podido determinar el rol de este receptor en los tumores mamarios.

En cuanto a la relación del RE β con los parámetros clínicos y patológicos, en el presente estudio no se encontraron asociaciones significativas entre ellos. Para nuestro conocimiento, existe un único reporte previo acerca de la asociación de este receptor con variables clínico-patológicas, y en coincidencia con nuestros resultados, tampoco observó asociación significativa con las variables analizadas (Merlo *et al.*, 2013). Por tanto, es fundamental continuar el análisis de este receptor para determinar su implicancia en las neoplasias mamarias caninas, así como su utilidad no sólo en el pronóstico, sino también como potencial blanco terapéutico.

En la mujer, se postula que las alteraciones en la relación RE α /RE β en la glándula mamaria sana podrían ser responsables del desarrollo y la progresión de las neoplasias mamarias (Löfgren *et al.*, 2006). Por lo tanto, el análisis conjunto del RE α y RE β permite por un lado conocer cómo son estos cambios en la relación RE α /RE β durante el proceso de carcinogénesis, y por otro lado permite identificar subgrupos de pacientes que se beneficien con diferentes tratamientos. Se ha observado que aquellas pacientes con tumores negativos para el RE α pero positivos al RE β se pueden beneficiar con la terapia hormonal utilizando drogas que actúen sobre este subtipo de RE (ej. antiestrógeno fulvestrant) (Mishra *et al.*, 2016). Por tanto, la determinación de ambos subtipos del RE en las neoplasias mamarias caninas también podría ser de utilidad al momento de evaluar el uso de la terapia hormonal. En el estudio 1.2 se observó que en el grupo de tumores benignos, la combinación más frecuentemente hallada fue RE α +/RE β +, seguida por la combinación RE α +/RE β -. En los tumores malignos, el grupo predominante también fue RE α +/RE β +, pero el segundo más frecuente fue RE α -/RE β -. Por tanto, el presente estudio muestra que en la progresión de tumores benignos hacia malignos, la expresión del RE β (tumores benignos: RE α +/RE β -) se perdió antes que la expresión del RE α (tumores malignos: RE α -/RE β -), evento que podría estar implicado en el proceso de carcinogénesis, al igual que se postula en humanos (Löfgren *et al.*, 2006).

Como fuera mencionado previamente, en el cáncer mamario humano la presencia de RE en el tumor es un predictor de la respuesta a la terapia endocrina. Sin embargo, se ha observado que cuando su evaluación se combina con la determinación del Receptor a Progesterona (RP), mejora su valor predictivo. Esto se debe a que la síntesis del RP es estrógeno-dependiente, por lo que su presencia en el tumor indica la funcionalidad del RE. Aquellas pacientes con tumores positivos para RE y RP tendrán mejor respuesta a la terapia hormonal que mujeres con tumores RE positivos pero RP negativos, las cuales tienden a no responder a la terapia (Bardou *et al.*, 2003). En la perra, los reportes acerca del RP en tumores mamarios han demostrado que su expresión es mayor en tumores benignos comparado con tumores malignos, al igual que ocurre con el RE α (Martín de las Mulas *et al.*, 2005). Asimismo, su expresión en tumores malignos parece estar relacionada con características de baja malignidad tumoral, por lo que sería un indicador de buen pronóstico (Chang *et al.*, 2009). Sin embargo, Millanta *et al.* (2005) no han observado relación entre la pérdida del RP y un peor pronóstico. Asimismo, el porcentaje de tumores benignos y malignos positivos varía entre estudios. En el estudio 1.3 de la presente tesis, el porcentaje de tumores (benignos y malignos) positivos para el RP fue del 23%. Dichos resultados resultan inferiores a los reportados por Port Louis *et al.*, (2012) y Chang *et al.*, (2005), los cuales describen positividad en el 51% y 77,9% de los casos, respectivamente. Asimismo, en la presente tesis, el análisis de los tumores de acuerdo a su naturaleza dio como resultado que el 27% de los tumores benignos y el 20% de los malignos fueron positivos al RP. Reportes previos describen mayores porcentajes de positividad para tumores benignos, que van desde el 50% al 100% (Martín de las Mulas *et al.*, 2005; Millanta *et al.*, 2005), mientras que para los malignos, nuestros resultados se asemejan a los de Millanta *et al.*, (2005) y Hermo *et al.*, (2010), quienes reportan que el 23,8% y 23,6% de los tumores malignos fueron positivos al RP, respectivamente. Como fuera mencionado previamente, las diferencias entre estudios podrían deberse a varios factores, como los distintos criterios utilizados para considerar los tumores positivos y negativos. Así, trabajos previos en caninos han considerado por ejemplo tumores positivos aquellos con un TS \geq a 3 (Chang *et al.*, 2009), o aquellos con un PS \geq a 1 y un TS \geq a 2 (Martín de las Mulas *et al.*, 2005). Además, trabajos en cáncer mamario humano han considerado aquellos tumores con un TS de 3 o 4 como leves positivos, y aquellos con TS de 5 a 8, como positivos (Muñoz de Toro *et al.*, 1998). Sin embargo, en el presente trabajo de tesis, siguiendo con las pautas establecidas recientemente por Peña *et al.* (2014), se consideraron tumores positivos aquellos con un Total Score $>$ a 3. Si se hubieran tenido en cuenta los criterios utilizados por los

autores anteriormente citados, el porcentaje de tumores positivos del presente trabajo de Tesis habría arrojado valores bastante más elevados, dado que muchos de los tumores analizados tenían un TS igual a 3.

Respecto de la relación entre el RP y los parámetros clínicos y patológicos, en el estudio 1.3 no se observó asociación entre ellos a excepción del estadio clínico, en el que el TS del RP fue significativamente mayor en aquellas perras en estadios clínicos IV o V, en comparación con perras en estadios I, II o III. Estos hallazgos difieren de los reportados por Chang *et al.*, (2009), quienes hallan mayor expresión del RP en estadios clínicos I, II y III, indicando que el RP se asocia con características de baja malignidad tumoral. Sin embargo, en un reporte reciente en caninos se observó que carcinomas altamente malignos (GHM III) expresaban elevados niveles del RP (De Andrés *et al.*, 2016). Considerando que los tumores de GHM III suelen tener un comportamiento más agresivo, tienen más probabilidades de hacer metástasis (estadios clínicos IV o V). Por lo tanto, los resultados de nuestro estudio podrían estar relacionados con los hallazgos de Andrés *et al.*, (2016), y justifican la investigación de agentes antiprogestágenos para el tratamiento del cáncer mamario avanzado.

En la mujer, además de las hormonas esteroides sexuales, cuya influencia en el cáncer de mama es ampliamente conocida, otras hormonas parecen participar en el desarrollo y/o la progresión de esta neoplasia. Una de ellas es la OT, un péptido de origen hipotalámico cuyas acciones a nivel mamario se relacionan con el reflejo de eyección láctea (Kimura *et al.*, 1998). Considerando algunos estudios en humanos en los que se demostró la presencia del ROT en líneas celulares de cáncer mamario y en tumores primarios de mama (Bussolati *et al.*, 1996), se realizó un estudio que tuvo como objetivo investigar la presencia de este receptor en las neoplasias mamarias caninas. Así, los resultados del estudio 2.1 describen por primera vez la presencia del ROT en tumores mamarios caninos, al igual que ocurre en el cáncer mamario humano. Un estudio realizado sobre glándula mamaria humana lactante y no lactante, demostró que el receptor para esta hormona se localiza en las células epiteliales ductales y glandulares, y no sólo en las células mioepiteliales como anteriormente se creía (Kimura *et al.*, 1998). La expresión del ROT se visualizó tanto en las células epiteliales de tumores benignos como malignos, similar a lo reportado por Bussolati *et al.* (1996), sin observarse diferencias significativas entre ambos tipos tumorales. Dado que en el presente trabajo de Tesis se reporta por primera vez la expresión del ROT en tumores mamaros caninos, no

es posible hacer comparaciones en la especie. La observación de una mayor expresión del ROT en tumores de GHM I y II, así como en tumores malignos positivos para el RE α , permite especular que esta expresión estaría asociada con factores indicadores de buen pronóstico. En la mujer, para nuestro conocimiento no existen reportes en los que se evalúe la asociación de este receptor con factores de valor pronóstico o con receptores a hormonas esteroideas en tumores mamarios malignos. La asociación entre las hormonas sexuales esteroideas y la expresión del ROT ha sido evaluada *in vitro*, donde se reportó un incremento en el ARNm del ROT luego de la adición de estradiol a cultivos de la línea celular MCF-7 de cáncer mamario humano, y una reducción del ARNm cuando las células eran expuestas a progesterona (Amico *et al.*, 2002), lo cual parece indicar que los estrógenos y la progesterona pueden regular la expresión del ROT en células de cáncer mamario humano.

Como fuera mencionado en la introducción de la presente Tesis, las acciones antiproliferativas de DDAVP parecen estar mediadas por el subtipo V2 del receptor a la vasopresina (RAVP V2), que involucra el incremento en las concentraciones intracelulares de AMPc (Kaufmann y Vischer, 2003). En la presente Tesis se demostró la presencia del RAVP V2 en tumores mamarios espontáneos de perras (estudio 2.2), resultados que representan el primer reporte acerca de la expresión de este receptor en neoplasias mamarias caninas. Estos resultados concuerdan con trabajos previos en humanos, en lo que se demostró la presencia del RAVP V2 en la línea MCF-7 de cáncer mamario humano (North *et al.*, 1999), así como en carcinomas primarios de mama humanos (Weinberg *et al.*, 2015). Resulta interesante destacar, que el 100% de los tumores mamarios analizados en el estudio 2.2 expresaron el RAVP V2, siendo esta expresión elevada tanto en neoplasias benignas como malignas. Por el contrario, el trabajo realizado en humanos acerca de este receptor, reporta su expresión en 6 de los 18 (33%) carcinomas mamarios analizados (Weinberg *et al.*, 2015). La mayor expresión del RAVP V2 observada en nuestro estudio, podría estar relacionada con el elevado número de tumores malignos con características de baja malignidad histológica, es decir carcinomas del tipo túbulo-papilar y de GHM I, en comparación con el trabajo en humanos, en el que la mayor parte de los carcinomas mamarios eran del tipo invasivo. Si bien en el estudio 2.2 no se observaron diferencias significativas en el TS para el RAVP V2 entre tumores benignos y malignos ni entre tipos histológicos, su expresión podría disminuir en aquellos tumores malignos más agresivos.

En la perra, como fuera mencionado previamente, el tratamiento de elección para los tumores mamarios, sean de origen benigno o maligno, consiste en su extirpación quirúrgica. Por este motivo, el análisis histológico de la biopsia incisional de forma previa a la cirugía no suele realizarse, sino que directamente se analiza el tumor una vez que se extirpó en forma completa. Dado que la DDAVP se administra de forma perioperatoria, y que resulta difícil conocer en forma previa a la cirugía si el tumor expresa el RAVP V2 (a través del cual actúa la DDAVP), hasta el momento resultaba cuestionable el uso de esta droga sin conocer la presencia del receptor para un tumor en particular. Sin embargo, considerando que más de la mitad de las perras se presentan con múltiples tumores mamarios (pudiendo coexistir tumores benignos con malignos), que se ha demostrado que los tumores benignos pueden progresar hacia la malignidad, y teniendo en cuenta la elevada expresión del RAVP V2 que se observó en los tumores mamarios benignos y malignos de la presente Tesis, se justificaría el uso de DDAVP durante la cirugía de todos los tumores mamarios caninos, sean estos de naturaleza benigna o maligna. Dada la elevada expresión del RAVP V2 que se apreció en todos los tumores analizados, no se pudo demostrar una asociación entre su expresión y variables clínico-patológicas de valor pronóstico en tumores mamarios malignos. En la mujer, al momento no existen reportes acerca de la asociación de este receptor con factores pronóstico.

Considerando algunos estudios en humanos que relacionan a la OT con la modulación del crecimiento de células tumorales en cultivo, se decidió realizar un estudio *in vitro* para evaluar los efectos de esta hormona en células de cáncer mamario canino. De forma preliminar, se demostró la presencia del ROT en la línea celular CMT-U27 de cáncer mamario canino, lo cual indica que esta línea celular es óptima para evaluar el efecto *in vitro* de la OT, dado que expresa el receptor para esta hormona. Los resultados obtenidos con OT en el estudio 3.1, indican que esta hormona tiene un claro efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la línea celular CMT-U27. Para nuestro conocimiento, existe un único reporte acerca del efecto *in vitro* de la OT sobre células mamarias tumorales de origen canino (Bergman, 2012), en el cual se demostró que, al igual que en los ensayos de la presente tesis, la OT disminuyó la proliferación celular a una concentración de 1000 nM. Sin embargo, los autores reportan que el efecto inhibitorio no fue consistente entre los sucesivos ensayos (seis en total) realizados, y se lo atribuyen a diferentes aspectos relacionados con la línea celular, y con el manejo de la misma en cada ensayo. En este sentido, los resultados obtenidos podrían verse influidos por el estadio del ciclo celular en el cual se encontraban las células al momento del ensayo,

los días transcurridos desde la última resiembra hasta el inicio del ensayo, o los días desde el último cambio de medio hasta el inicio del ensayo. Asimismo, el estudio de Bergman, (2012) reportó una inhibición significativa del crecimiento con OT 100 nM, efecto que no se observó en la presente tesis para esa dosis de OT. El efecto inhibitor de la OT fue reportado previamente sobre líneas de cáncer mamario humano, incluso con concentraciones mínimas del péptido (1 nM) (Cassoni *et al.*, 1994). El efecto antiproliferativo de OT también ha sido observado *in vivo* en ratones con carcinomas mamaros, en los que la OT, administrada en forma subcutánea, redujo el crecimiento tumoral (Cassoni *et al.*, 1996). Un estudio más reciente demostró que las células mioepiteliales de la glándula mamaria normal, así como algunas líneas celulares de carcinoma mamario, pueden sintetizar OT localmente, y que los estrógenos pueden modular esta síntesis (Cassoni *et al.*, 2006). También se observó que cuando la OT es administrada en cultivos organotípicos (3 dimensiones), estimula la diferenciación de las células mioepiteliales (Sapino *et al.*, 1993). Esto demuestra que la OT, además de participar en la contracción de las células mioepiteliales para producir la bajada de la leche, también actúa regulando la diferenciación y el crecimiento de la glándula mamaria sana y tumoral. Sin embargo, al contrario de lo que ocurre en células de origen mamario, endometrial y nervioso, en las que la OT inhibe el crecimiento celular, sobre líneas celulares de coriocarcinoma, sarcoma de Kaposi y cáncer de pulmón, se ha observado que la OT ejerce el efecto contrario, es decir que estimula el crecimiento celular (Cassoni *et al.*, 2001). Estas acciones opuestas estarían mediadas por la activación de diferentes vías de señalización celular; los efectos antiproliferativos parecen involucrar la activación de la proteína quinasa A y el aumento intracelular del AMPc (Cassoni *et al.*, 1997). Por el contrario, los efectos proliferativos de la OT estarían mediados por la activación de la enzima fosfolipasa C, que lleva a la formación de los segundos mensajeros inositol 1, 4, 5 trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ conduce al aumento de calcio citosólico, mientras que el DAG estimula a la proteína quinasa C, que fosforila a proteínas reguladoras del crecimiento celular (Cassoni *et al.*, 2002). Dado que esta última vía de señalización se considera el mecanismo “tradicional” por el cual actúa la OT, algunos autores postulan que el efecto antiproliferativo de OT podría deberse a la unión de esta hormona al subtipo V2 del receptor a vasopresina (el cual estimula la formación de AMPc), por el cual la OT mantiene cierta afinidad (Cassoni *et al.*, 2004). También se ha propuesto que los efectos estimuladores o inhibidores del crecimiento de la OT, dependen de la localización de la proteína G (que se encuentra unida al receptor) en la membrana plasmática. Las caveolas son regiones de la membrana que participan en

el tráfico de proteínas y en la transducción de señales. Se postula que cuando la proteína G y el receptor se encuentran dentro de una caveola, se produce la formación de IP_3 y DAG, con la consecuente estimulación del crecimiento celular, mientras que cuando la proteína G se ubica fuera de las caveolas, se produce formación de AMPc, lo que resulta en efectos antiproliferativos (Guzzi *et al.*, 2002). Por lo tanto, diferentes aspectos a nivel del ROT y su localización en la membrana plasmática parecen regular la diferenciación/crecimiento de la glándula mamaria sana y tumoral. Los resultados de la presente tesis, acerca de la presencia del ROT en tumores mamarios de la especie canina, así como la demostración de los efectos inhibidores de OT sobre el crecimiento de células tumorales mamarias caninas, junto con los reportes previos en humanos (Imanieh *et al.*, 2014), sugieren que la OT o sus análogos, podrían ser una opción en el tratamiento del cáncer mamario humano y canino.

Como fuera previamente mencionado, dada la elevada incidencia de los tumores mamarios en la especie canina, y considerando la importancia que tiene la búsqueda de nuevas y más eficaces opciones terapéuticas adyuvantes, se realizó un ensayo *in vitro* que tuvo como objetivo evaluar los efectos del péptido desmopresina (DDAVP) sobre el crecimiento de la línea celular CMT-U27. Del mismo modo que con OT, de forma previa a la realización del ensayo *in vitro* propiamente dicho, se realizó un estudio preliminar en el que se demostró la presencia del RAVP V2 en la línea celular canina CMT-U27, lo cual justifica el empleo de esta línea celular para evaluar el efecto de la DDAVP. Para nuestro conocimiento, este es el primer reporte en el que se evalúan los efectos de la DDAVP sobre células de cáncer mamario de origen canino. Cuando las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de DDAVP, se obtuvo una inhibición del crecimiento celular. Estos resultados concuerdan con aquellos de trabajos previos realizados sobre líneas de cáncer mamario humano y murino, en los que la adición de DDAVP a los cultivos inhibió la proliferación celular (Alonso *et al.*, 1997; Keegan *et al.*, 2006). El efecto antitumoral también ha sido reportado *in vivo* en modelos murinos de cáncer mamario, donde se observó que la administración endovenosa de DDAVP redujo la metástasis pulmonar. En la especie canina, un estudio piloto demostró el efecto beneficioso de la administración perioperatoria de DDAVP (administrada a dosis de 1 μ g/Kg, 30 minutos antes y 24 horas después de la cirugía) sobre la supervivencia de perras con cáncer mamario avanzado, sin causar efectos adversos (Herms *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis parecen apoyar la hipótesis de que DDAVP inhibe el crecimiento de las células malignas residuales, limitando de esta manera la progresión tumoral. Más recientemente, DDAVP

ha sido evaluada en un ensayo clínico de fase II realizado en mujeres con cáncer mamario. La administración endovenosa de DDAVP, antes y después de la resección quirúrgica del tumor, se asoció con una reducción del sangrado intraoperatorio, y con una disminución en el número de células tumorales circulantes, además de ser bien tolerada por las pacientes (Weinberg *et al.*, 2015). Considerando los efectos hemostáticos, antiproliferativos y antimetastásicos de DDAVP, junto con la ausencia de efectos adversos tras su administración, esta molécula resulta un buen candidato como tratamiento adyuvante de las neoplasias mamarias, tanto en la mujer como en la perra. Más recientemente, se está investigando un nuevo análogo de DDAVP, denominado [V⁴Q⁵]DDAVP, sobre líneas celulares de cáncer mamario humano y en modelos murinos de cáncer mamario, cuyos efectos antitumorales serían mayores comparado con DDAVP (Iannucci *et al.*, 2011; Garona *et al.*, 2016).

Resulta de interés mostrar, que en los experimentos *in vitro* de la presente tesis, tanto OT como DDAVP a baja densidad celular (4×10^3 cel/well), y en una concentración de 50 nM mostraron un efecto antiproliferativo similar al obtenido con 1000 nM (20% aproximadamente) (estudios 3.1 y 3.2). Este “efecto bifásico” de los péptidos fue demostrado algunas décadas atrás con OT sobre oviductos y úteros humanos (Nakanishi y Wood, 1968). Más tarde, este efecto fue descrito más detalladamente para otras moléculas (Szabadi, 1977). Esta respuesta bifásica de acuerdo a la dosis, parece ocurrir cuando un único agonista tiene diferentes afinidades por dos subtipos opuestos de un receptor, desencadenando diferentes vías de señalización. Asimismo, este efecto fue reportado recientemente sobre células de cáncer de próstata humano, en las que la DDAVP a baja densidad celular, ejerció un efecto antiproliferativo tanto en concentraciones bajas (1 nM) como altas (1 μ M) (Sasaki *et al.*, 2015). Al momento, se desconoce el mecanismo exacto por el cual tanto OT como DDAVP, ejercen efectos antiproliferativos a dosis bajas.

PRINCIPALES CONCLUSIONES SURGIDAS DE LA PRESENTE TESIS

La aparición de tumores mamarios fue más frecuente en perras enteras, dando sustento al rol fundamental que tienen las hormonas esteroides sexuales sobre la aparición de esta neoplasia en la especie canina.

El tumor mixto benigno y el carcinoma túbulo-papilar fueron los tipos histológicos más comúnmente diagnosticados entre los tumores benignos y malignos, respectivamente.

El TS para el RE α fue mayor en tumores benignos comparado con los malignos, confirmando una vez más que la expresión de receptores se pierde conforme avanza la malignidad tumoral.

En los tumores malignos, el TS para el RE α fue superior en los carcinomas túbulo-papilares, y en aquellos tumores de GHM I, dando soporte a la hipótesis de que la presencia de este receptor en el tejido tumoral se asocia con un mejor pronóstico para el animal.

El TS para el RE β fue similar en los tumores mamarios benignos y malignos, no pudiendo establecerse el rol que tiene este receptor en el desarrollo y/o progresión de los tumores mamarios caninos.

El RP se expresó de manera similar en tumores mamarios benignos y malignos caninos, siendo el TS promedio menor a 4 en ambos tipos tumorales.

En los tumores malignos, el TS para el RP fue mayor en aquellas perras que se encontraban en estadios clínicos IV o V, lo cual justifica la investigación de agentes antiprogestágenos con actividad adyuvante o neoadyuvante para las neoplasias mamarias malignas en etapa avanzada.

El receptor a OT se expresó en el 100% de los tumores mamarios caninos analizados, lo cual sugiere que la OT, por medio de la interacción con su receptor, podría estar implicada en la biología de los tumores mamarios caninos.

En los tumores malignos, el TS de ROT fue mayor en aquellos tumores de GHM I y II. Estos primeros hallazgos podrían indicar que, al igual que ocurre con los receptores a hormonas esteroideas, la expresión del ROT estaría asociado con factores de buen pronóstico.

El Receptor a Vasopresina V2 se expresó en el 100% de los tumores mamarios caninos analizados, siendo el TS elevado en todos los casos. Considerando que los tumores benignos pueden progresar hacia la malignidad, este hallazgo justifica el uso de análogos de la vasopresina con selectividad para este receptor, tanto para tumores benignos como malignos.

Las células tumorales de la línea CMT-U27 expresan el receptor a oxitocina y el receptor a vasopresina V2. Estos hallazgos indican que la línea CMT-U27 es un modelo apto para estudiar los posibles efectos antitumorales de drogas que utilicen como mecanismo de acción la unión al ROT o al RAVP V2.

La administración de oxitocina a dosis de 1000 nM en cultivos de la línea CMT-U27 inhibió la proliferación de las células tumorales, lo cual permite sugerir que esta hormona, al igual que en el cáncer mamario humano, tienen la capacidad de modular el crecimiento de las células tumorales.

La administración de desmopresina a cultivos de la línea CMT-U27 inhibió la proliferación de las células tumorales. Esta información resulta de utilidad para continuar investigando péptidos análogos a la desmopresina con mayor capacidad antiproliferativa.

En resumen, los estudios desarrollados en la presente Tesis Doctoral han aportado información acerca de la caracterización clínica y patológica de tumores mamarios de perras que acudieron a consulta en la ciudad de Tandil y alrededores. Los resultados en relación a la expresión de RE α , RE β y RP incrementaron el conocimiento sobre el rol que tienen estos receptores sobre el desarrollo y la progresión de las neoplasias mamarias en caninos. Asimismo, se ha reportado por primera vez la presencia del receptor a oxitocina y receptor vasopresina V2 en neoplasias mamarias caninas, lo cual permite comprender los aspectos hormonales implicados en el desarrollo y progresión de esta neoplasia. Por último, se ha aportado información sobre el efecto antineoplásico de los péptidos oxitocina y desmopresina.

La información científica generada en la presente Tesis resulta de interés dada la importancia que tiene la búsqueda de nuevas y más eficaces alternativas terapéuticas adaptadas a cada paciente con tumores mamarios.

PUBLICACIONES SURGIDAS DE LA TESIS

Artículos científicos

- **Benavente, MA;** Bianchi, CP; Aba, MA. (2016) *Canine mammary tumors: risk factors, prognosis and treatments*. Journal of Veterinary Advances, 6 (8), 1291-1300.
- **Benavente, MA;** Bianchi, CP; Imperiale, F; Aba, MA. (2016) *Antiproliferative effects of oxytocin and desmopressin on canine mammary cancer cells*. Frontiers in Veterinary Sciences, 3 (119), 1-6.
- **Benavente, MA;** Bianchi, CP; Aba MA. *Estrogen Receptors alpha and beta Expression in Canine Mammary Tumors: relationship with clinicopathological characteristics*. Manuscrito en preparación.
- **Benavente, MA;** Bianchi, CP; Aba MA. *Oxytocin and Vasopressin Receptors expression in canine mammary tumors*. Manuscrito en preparación.

Publicaciones en Congresos

- **Benavente, MA,** Bianchi, CP, Aba, MA. (2013) *Aspectos clínicos observados en perras con tumores mamarios de la provincia de Buenos Aires*. Octavas Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica. 9 y 10 de Agosto. Mar del Plata, Argentina.
- **Benavente, MA,** Bianchi, CP, Denzoin Vulcano, LA, Aba, MA. (2013) *Papiloma ductal mamario en un perro macho*. XIII Congreso Nacional de AVEACA. 19 y 20 de Septiembre. Buenos Aires, Argentina.
- **Benavente MA,** Denzoin Vulcano LA, Bianchi CP, Aba MA. (2014) *Hallazgos clínicos y patológicos en tumores mamarios caninos de la provincia de Buenos Aires*. Cuartas Jornadas

de Jóvenes Investigadores en Ciencias Veterinarias 2014. 5 y 6 de Junio. Buenos Aires, Argentina.

- **Benavente, MA;** Bianchi, CP; Denzoin Vulcano LA, Aba, MA. (2014) “*Carcinoma mamario anaplásico en un canino hembra*”. Caso presentado en el Taller de Histopatología, del 8vo Seminario de la Subdivisión Argentina de la Fundación Charles Louis Davis. 31 de Octubre. Tandil, Argentina. Presentación oral.

- **Benavente, MA;** Bianchi, CP; Aba, MA. (2014) *Expresión de receptores a Estrógenos β en tumores mamarios caninos*. I Congreso Internacional de Medicina Interna de Animales de Compañía. 18 y 19 de Septiembre. Tandil, Argentina.

- **Benavente, MA;** Bianchi, CP; Aba, MA. (2015) *Expresión de receptores a estrógenos β en tumores mamarios malignos caninos y su relación con factores pronóstico*. IX Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica. 28 y 29 de Agosto. Mar del Plata, Argentina.

- **Benavente, M;** Bianchi, CP; Denzoin Vulcano, LA; Aba, MA. (2016) *Receptor a estrógenos β en carcinomas mamarios caninos: su relación con el grado histológico de malignidad*. II Congreso Internacional de Medicina Interna de Animales de Compañía. 11 de Noviembre, Tandil. Argentina. Pág. 11.

- **Benavente, M;** Bianchi, CP; Imperiale, F; Aba, MA. (2016) *Antiproliferative effects of oxytocin and desmopressin on canine mammary cancer cells*. XLVIII Reunión Anual de la Asociación Argentina de Farmacología Experimental. 16 al 19 de Noviembre, Mar del Plata, Argentina. Publicado en Revista Medicina, Pág. 141.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allred, D.C, Harvey, J.M, Bernardo, M. y Clark, G.M. (1998) ‘Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis’. *Modern pathology*, 11, pp. 155-168.

Alonso, D. F., Skilton, G., Farina, H., De Lorenzo, M. y Gomez, D. (1997) ‘Modulation of growth and urokinase secretion by vasopressin and closely related nonapeptides in metastatic mouse mammary tumor cells’, *International journal of oncology*, 10, pp. 375–379.

Amico, J. A., Rauk, P. N. y Cai, H. M. (2002) ‘Estradiol and progesterone regulate oxytocin receptor binding and expression in human breast cancer cell lines’, *Endocrine*, 18, pp. 79–84.

Arenas, C., Peña, L., Granados-Soler, J. y Pérez-Alenza, M. D. (2016) ‘Adjuvant therapy for highly malignant canine mammary tumours: Cox-2 inhibitor versus chemotherapy: a case – control prospective study’, *Veterinary record*, 179, pp. 125–133.

Aupperlee, M. D., Smith, K. T., Kariagina, A. y Haslam, S. Z. (2005) ‘Progesterone Receptor Isoforms A and B : Temporal and Mammary Gland Development’, *Endocrinology*, 146, pp. 3577–3588.

Bakirel, T., Alkan, F. U., Üstüner, O., Cinar, S., Yildirim, F., Erten, G., y Bakirel, U. (2016) ‘Synergistic growth inhibitory effect of deracoxib with doxorubicin against a canine mammary tumor cell line, CMT-U27’, *Journal of veterinary medical science*, 78, pp. 657-668.

Bardou, B. V., Arpino, G., Elledge, R. M., Osborne, C. K. y Clark, G. M. (2003) ‘Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases’, *Journal of clinical oncology*, 21, pp. 1973–1979.

Benjamin, S., Lee, A. y Saunders, W. (1999) 'Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life span observations in beagles', *Veterinary Pathology*, 36, p. 423–436.

Bergman, I. (2012) *The Significance of Oxytocin in Canine Mammary Tumours*. Master Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, pp 25.

Bertheau, P., Lehmann-Che, J., Varna, M., Dumay, A., Poirot, B., Porcher, R., Turpin, E., Plassa, L.-F., Roquancourt, A. de, Bournstyn, E., Cremoux, P. de, Janin, A., Giacchetti, S., Espié, M. y Thé, H. de (2013) 'p53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy', *Breast*, 22, pp. 27–29.

Bianchi, C.P, Sahlin, L., Meikle, A., Masironi, B., Cavilla, MV, Aba, MA. (2010) 'Endometrial population of oestrogen receptors alpha and beta and progesterone receptors A and B during the different phases of the follicular wave of llamas (*Lama glama*)', *Reproduction in domestic animals*, 45, pp 872-880.

Birnbaumer, M. (2010) 'Vasopressin receptors', *Trends in endocrinology and metabolism*, 11, pp. 406–410.

Boccardo, F., Rubagotti, A., Guglielmini, P., Fini, A., Paladini, G., Mesiti, M., Rinaldini, M., Scali, S., Porpiglia, M., Benedetto, C., Restuccia, N., Buzzi, F., Franchi, R., Massidda, B., Distante, V., Amadori, D. y Sismondi, P. (2006) 'Switching to anastrozole versus continued tamoxifen treatment of early breast cancer. Updated results of the Italian tamoxifen anastrozole (ITA) trial', *Annals of oncology*, 17, pp. 10–14.

Bussolati, G., Cassoni, P., Ghisolfi, G., Negro, F. y Sapino, A (1996) 'Immunolocalization and gene expression of oxytocin receptors in carcinomas and non-neoplastic tissues of the breast', *The American journal of pathology*, 148, pp. 1895–1903.

Cassoni, P., Sapino, A., Negro, F. y Bussolati, G. (1994) 'Oxytocin inhibits proliferation of human breast cancer cell lines', *Virchows Archiv: an international journal of pathology*, 425, pp. 467–72.

Cassoni, P., Sapino, A., Papotti, M. y Bussolati, G. (1996) 'Oxytocin and Oxytocin analogue F314 inhibit cell proliferation and tumor growth of rat and mouse mammary carcinomas.', *International Journal of Cancer*, 66, pp. 817–820.

Cassoni, P., Sapino, A., Fortunati, N., Munaron, L., Chini, B. y Bussolati, G. (1997) 'Oxytocin inhibits the proliferation of MDA-MB231 human breast-cancer cells via cyclic adenosine monophosphate and protein kinase A', *International Journal of Cancer*, 72, pp. 340–344.

Cassoni, P., Sapino, A., Stella, A. y Fortunati, N. (1998) 'Bussolati, G. Presence and significance of oxytocin receptors in human neuroblastomas and glial tumors' *International journal of cancer*, 77, pp. 695-700.

Cassoni, P., Sapino, A., Munaron, L., Deaglio, S., Chini, B., Graziani, A., Ahmed, A. y Bussolati, G. (2001) 'Activation of functional oxytocin Receptors stimulates cell proliferation in human trophoblast and choriocarcinoma cell lines', *Endocrinology*, 142, pp. 1130–1136.

Cassoni, P., Sapino, A., Deaglio, S., Bussolati, B., Volante, M., Munaron, L., Albini, A., Torrisi, A. y Bussolati, G. (2002) 'Oxytocin is a growth factor for Kaposi's sarcoma cells: evidence of endocrine-immunological cross-talk.', *Cancer research*, 62, p. 2406–2413.

Cassoni, P., Sapino, A., Marrocco, T., Chini, B. y Bussolati, G. (2004) 'Oxytocin and oxytocin receptors in cancer cells and proliferation', *Journal of neuroendocrinology*, 16, pp. 362–4.

Cassoni, P., Marrocco, T., Sapino, A., Allia, E. y Bussolati, G. (2006) 'Oxytocin synthesis within the normal and neoplastic breast: first evidence of a local peptide source', *International journal of oncology*, 28, pp. 1263–1268.

Chang, S., Chang, C., Chang, T. y Wong, M. (2005) 'Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors : 79 cases (1998-2002)', *Journal of the American Veterinary Medical Association.*, 227, pp. 1625–1629.

Chang, C. C., Tsai, M. H., Liao, J. W., Chan, J. P. W., Wong, M. L. y Chang, S. C. (2009) 'Evaluation of hormone receptor expression for use in predicting survival of female dogs with malignant mammary gland tumors.', *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 235, pp. 391–396.

Cleary, M. P. y Grossmann, M. E. (2009) 'Minireview : Obesity and Breast Cancer : The Estrogen Connection', 150, pp. 2537–2542.

Clemente, M., De Andrés, P. J., Peña, L. y Pérez-Alenza, M. D. (2009) 'Survival time of dogs with inflammatory mammary cancer treated with palliative therapy alone or palliative therapy plus chemotherapy', *Veterinary record*, 165, pp. 78–81.

Conde, I., Alfaro, J. M., Fraile, B., Ruíz, A., Paniagua, R. y Arenas, M. I. (2004) 'DAX-1 expression in human breast cancer : comparison with estrogen receptors ER α , ER β and androgen receptor status', *Breast cancer research*, 6, pp. 140–148.

Curtis, H. (1965) 'Formal discussion of: Somatic mutations and carcinogenesis', *Cancer research*, 25, pp. 1305–1308.

De Andrés, P. J., Caceres, S., Clemente, M., Pérez-Alenza, M. D., Illera, J. C. y Peña, L. (2016) 'Profile of Steroid Receptors and Increased Aromatase Immunoexpression in Canine Inflammatory Mammary Cancer as a Potential Therapeutic Target', *Reproduction in Domestic Animals.*, 275, pp.

Dolka, I., Król, M. y Sapierszynski, R. (2016) 'Evaluation of apoptosis-associated protein (Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3 and p53) expression in canine mammary tumors : An immunohistochemical and prognostic study', *Research in veterinary science*, 105, pp. 124–133.

Donnay, I., Devleeschouwer, N., Wouters-Ballman, P., Leclercq, G. y Verstegen, J. (1996) 'Relationship between receptors for epidermal growth factor and steroid hormones in normal , dysplastic and neoplastic canine mammary tissues', *Research in veterinary science*, 60, pp. 251–254.

Egenvall, A., Bonnett, B. N. y Patrik, O. (2005) 'Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80.000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002', *Preventive veterinary medicine*, 69, pp. 109–127.

Elston, C. W. y Ellis, O. (1991) 'Pathological prognostic factors in breast cancer . I . The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up', *Histopathology*, 19, pp. 403–410.

Falette, N., Paperin, M., Treilleux, I., Palette, N., Paperin, M., Treilleux, I., Gratadour, A., Peloux, N., Bremond, A., Ozturk, M. y Puisieux, A. (1998) 'Prognostic Value of P53 Gene Mutations in a Large Series of Node-negative Breast Cancer Patients', *Cancer research*, 58, pp. 1451–1455.

Farina, H., Bublik, D., Alonso, D. F. and Gomez, D. E. (2002) 'Lovastatin alters cytoskeleton organization and inhibits experimental metastasis of mammary carcinoma cells', *Clinical and experimental metastasis*, 19, pp. 551–559.

Ferreira, E., Bertagnolli, A. C., Cavalcanti, M. F., Schmitt, F. C. y Cassali, G. D. (2009) 'The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours', *Veterinary and comparative oncology*, 7, pp. 230–235.

Fosslien, E. (2001) 'Review: Molecular Pathology of Cyclooxygenase-2 in Cancer-induced Angiogenesis', *Annals of clinical and laboratory science*, 31(4), pp. 325–348.

Garona, J., Pifano, M., Pastrian, M. B., Gomez, D. E., Ripoll, G. V y Alonso, D. F. (2016) ‘Addition of vasopressin synthetic analogue [V4Q5]dDAVP to standard chemotherapy enhances tumor growth inhibition and impairs metastatic spread in aggressive breast tumour models’, *Clinical and experimental metastasis*. Springer, 33, pp. 589–600.

Geneser, F. (2001) *Histología*. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España.

Geraldes, M., Gartner, F. y Schmitt, F. (2000) ‘Immunohistochemical study of hormonal receptor and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours’, *Veterinary record: journal of the British Veterinary Association*, 146, pp. 403–406.

Girón, S., Tejera, A. M., Ripoll, G. V, Gomez, D. E. y Alonso, D. F. (2002) ‘Desmopressin inhibits lung and lymph node metastasis in a mouse mammary carcinoma model of surgical manipulation’, *Journal of surgical oncology*, 81, pp. 38–44.

Goldschmidt, M., Peña, L., Rasotto, R. y Zappulli, V. (2011) ‘Classification and grading of canine mammary tumors’, *Veterinary Pathology*, 48, pp. 117–131.

Gracanin, A., Gier, J. De, Zegers, K., Bominaar, M., Rutteman, G. R., Schaefer-okkens, A. C., Kooistra, H. S. y Mol, J. A. (2012) ‘Progesterone Receptor Isoforms in the Mammary Gland of Cats and Dogs’, *Reproduction in domestic animals*, 47, pp. 313–317.

Graham, J. C. y Myers, R. K. (1999) ‘The Prognostic Significance of Angiogenesis in Canine Mammary Tumors’, *Journal of veterinary internal medicine*, 13, pp. 416–418.

Graham, J. D. y Clarke, C. L. (1997) ‘Physiological Action of Progesterone in Target Tissues ’, *Endocrine Reviews*, 18, pp. 502–519.

Greene, G.L, Gilna, P., Waterfield, M, Baker, A, Hort, Y, Shine, J. (1986) ‘Sequense and expression of human estrogen receptor complementary DNA’, *Science*, 7, pp. 1150–1154.

Guil-Luna, S., Hellmén, E., Sánchez-Céspedes, R., Millán, Y. y Martín de las Mulas, J. (2014) ‘The antiprogestins mifepristone and onapristone reduce cell proliferation in the canine mammary carcinoma cell line CMT-U27’, *Histology and histopathology*, 29, pp. 949–955.

Guil-Luna, S., Millán, Y., De Andrés, J., Rollón, E., Domingo, V., García-Macias, J., Sánchez-Céspedes, R. y Martín de las Mulas, J. (2016) ‘Prognostic impact of neoadjuvant aglepristone treatment in clinicopathological parameters of progesterone receptor-positive canine mammary carcinomas’, *Veterinary and comparative oncology*, 15, pp. 391–399.

Guo, L., Zhu, Q., Yilamu, D., Jakulin, A., Liu, S. y Liang, T. (2014) ‘Expression and prognostic value of estrogen receptor beta in breast cancer patients’, *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 7, pp. 3730–3736.

Gustafsson, J. y Warner, M. (2000) ‘Estrogen receptor β in the breast: role in estrogen responsiveness and development of breast cancer’, *Steroid biochemistry and molecular biology*, 74, pp. 245–248.

Guzzi, F., Zanchetta, D., Cassoni, P., Guzzi, V., Francolini, M., Parenti, M. y Chini, B. (2002) ‘Localization of the human oxytocin receptor in caveolin-1 enriched domains turns the receptor-mediated inhibition of cell growth into a proliferative response’, *Oncogene*, 21, p. 1658–1667.

Hammond, M. E. H., Hayes, D. F., Wolff, A. C., Mangu, P. B. y Temin, S. (2010) ‘American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer.’, *Journal of oncology practice*, 6, pp. 195–197.

Hartman, J., Ström, A. y Gustafsson, J. (2009) ‘Estrogen receptor beta in breast cancer — Diagnostic and therapeutic implications’, *Steroids*, 74, pp. 635–641.

Heller, D.A., Clifford, C. A., Goldschmidt, M. H., Holt, D. E., Shofer, F. S., Smith, A. y Sorenmo, K. U. (2005) 'Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma.', *Veterinary pathology*, 42, pp. 776–780.

Hellmén, E. (1992) 'Characterization of four in vitro established canine mammary carcinoma and one atypical benign mixed tumor cell lines.', *In vitro cellular and developmental biology*, 28, pp. 309-319.

Hellmén, E., Bergström, R., Holmberg, L., Spångberg, I. B., Hansson, K. y Lindgren, A. (1993) 'Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases', *Veterinary pathology*, 30, pp. 20–7.

Hermo, G. A., Torres, P., Ripoll, G. V., Scursoni, A. M., Gomez, D. E., Alonso, D. F. y Gobello, C. (2008) 'Perioperative desmopressin prolongs survival in surgically treated bitches with mammary gland tumours: A pilot study', *The Veterinary Journal*, 178(1), pp. 103–108.

Hermo, G., Soldati, R., Wargon, V., Scursoni, A. y Lanari, C. (2010) 'Inmunohistoquímica y expresión de receptores de estrógenos y progesterona en neoplasias mamarias', *Revista Científica*, XX, pp. 245–253.

Hoffmann, B. y Schuler, G. (2000) 'Receptor blockers - general aspects with respect to their use in domestic animal reproduction', *Animal reproduction science*, 60, pp. 295–312.

Iannucci, N. B., Ripoll, G. V, Garona, J., Cascone, O., Ciccia, G. N., Gomez, D. E. y Alonso, D. F. (2011) 'Antiproliferative effect of 1-deamino-8-D-arginine vasopressin analogs on human breast cancer cells.', *Future medicinal chemistry*, 3, pp. 1987–93.

Illera, J. C., Pérez-Alenza, M. D., Nieto, A., Jiménez, M. A., Silvan, G., Dunner, S. y Peña, L. (2006) 'Steroids and receptors in canine mammary cancer', *Steroids*, 71, pp. 541–548.

Im, K., Kim, I., Kim, N., Lim, H., Kim, J. y Sur, J. (2013) 'Breed-related differences in altered BRCA1 expression, phenotype and subtype in malignant canine mammary tumors', *The Veterinary Journal*, 195, pp. 366–372.

Imanieh, M. H., Bagheri, F., Alizadeh, A. M. y Ashkani-Esfahani, S. (2014) 'Oxytocin has therapeutic effects on cancer, a hypothesis', *European Journal of Pharmacology*, 741, pp. 112–123.

InfoStat software (Di Rienzo J.A., Casanoves F., M. G. Balzarini, L. Gonzalez, Tablada M., C. W. Robledo InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Isaksson, E., Wang, H., Sahlin, L., von Schoultz, B., Cline, J. M. y von Schoultz, E. (2003) 'Effects of long-term HRT and tamoxifen on the expression of progesterone receptors A and B in breast tissue from surgically postmenopausal cynomolgus macaques', *Breast cancer research and treatment*, 79, pp. 233–239.

Itoh, T., Uchida, K., Ishikawa, K., Kushima, K. y Kushima, E. (2004) 'Clinicopathological Survey of 101 Canine Mammary Gland Tumors: Differences between Small-Breed Dogs and Others', *The journal of veterinary medical science*, 67, pp. 10–12.

Järvinen, T. A. H., Pelto-Huikko, M., Holli, K. e Isola, J. (2000) 'Estrogen Receptor β is Coexpressed with ER α and PR and Associated with Nodal Status, Grade, and Proliferation Rate in Breast Cancer', *The American Journal of Pathology*, 156, pp. 29–35.

Karayannopoulou, M., Kaldrymidou, E., Constantinidis, T. C. and Dessiris, A. (2001) 'Adjuvant Post-operative Chemotherapy in Bitches with Mammary Cancer', *Journal of veterinary medicine*, 48, pp. 85–96.

Karayannopoulou, M., Kaldrymidou, E., Constantinidis, T. C. y Dessiris, A. (2005) 'Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method', *Journal of Comparative Pathology*, 133, pp. 246–252.

Kaufmann, J. E. y Vischer, U. M. (2003) 'Cellular mechanisms of the hemostatic effects of desmopressin (DDAVP)', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1, pp. 682–689.

Keegan, B. P., Akerman, B. L., Péqueux, C. and North, W. G. (2006) 'Provasopressin expression by breast cancer cells: Implications for growth and novel treatment strategies', *Breast Cancer Research and Treatment*, 95, pp. 265–277.

Kim, J. H., Im, K. S., Kim, N. H., Yhee, J. Y., Nho, W. G. y Sur, J. H. (2011) 'Expression of HER-2 and nuclear localization of HER-3 protein in canine mammary tumors: Histopathological and immunohistochemical study', *The veterinary journal*, 189, pp. 318–322.

Kim, T.-J., Lee, A., Choi, Y.-J., Song, B. J., Yim, H. W. y Kang, C. S. (2012) 'Prognostic significance of high expression of ER-beta in surgically treated ER-positive breast cancer following endocrine therapy', *Journal of Breast Cancer*, 15, pp. 79–86.

Kimura, T., Ito, Y., Einspanier, A., Tohya, K., Nobunaga, T., Tokugawa, Y., Takemura, M., Kubota, Y., Ivell, R., Matsuura, N., Saji, F. y Murata, Y. (1998) 'Expression and immunolocalization of the oxytocin receptor in human lactating and non-lactating mammary glands', *Human Reproduction*, 13, pp. 2645–2653.

Kristiansen, V. M., Peña, L., Díez Cordova, L., Illera, J. C., Skjerve, E., Breen, A. M., Cofone, M. A., Langeland, M., Teige, J., Goldschmidt, M. y Sorenmo, K. U. (2015) 'Effect of ovariectomy at the time of tumor removal in dogs with mammary carcinomas: a randomized controlled trial', *Journal of veterinary internal medicine*, 30, pp. 230–241.

Krol, M., Pawlowsky, K.M., Skierski, J., Rao, N.A.S., Hellmén, E., Mol, J.A. y Motyl, T. (2009) 'Transcriptomic profile of two canine mammary cancer cell lines with different proliferative and anti-apoptotic potential', *Journal of physiology and pharmacology*, 60, pp. 95-106.

- Kuiper, G. G. y Gustafsson, J. (1997) 'The novel estrogen receptor- β subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens', *Federation of European Biochemical Societies*, 410, pp. 87–90.
- Kumaraguruparan, R., Prathiba, D. y Nagini, S. (2006) 'Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours', *Research in Veterinary Science*, 81, pp. 218–224.
- Lana, S., Rutteman, G. y Withrow, S. (2007) 'Tumors of the mammary gland', en: WB Saunders, P. (ed.) *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, pp. 620–637.
- Lantinga-van Leeuwen, I. S., Garderen, E. Van, Rutteman, G. R. y Mol, J. A. (2000) 'Cloning and cellular localization of the canine progesterone receptor: co-localization with growth hormone in the mammary gland', *Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 75, pp. 219–228.
- Lavalle, G. E., Campos, C. B. D. E., Bertagnolli, A. C. and Cassali, G. (2012) 'Canine Malignant Mammary Gland Neoplasms with Advanced Clinical Staging Treated with Carboplatin and Cyclooxygenase Inhibitors', *In vivo*, 26, pp. 375–380.
- Lee, C., Kim, W., Lim, J., Kang, M., Kim, D. y Kweon, O. (2004) 'Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors', *Journal of veterinary science*, 5, pp. 63–69.
- Lofgren, L., Sahlin, L., Von Schoultz, B., Fernstad, R., Skoog, L. y Von Schoultz, E. (2006) 'Expression of sex steroid receptor subtypes in normal and malignant breast tissue a pilot study in postmenopausal women', *Acta Oncológica*, 45, pp. 54–60.
- Lombardi, P., Florio, S., Pagnini, U., Crispino, A. y Avallone, L. (1999) 'Ovarian function suppression with a GnRH analogue: D-ser (But [t])[6] - Arzgly [10]-LHRH (Goserelin) in hormone dependent canine mammary cancer', *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 22, pp. 56–61.

Macewen, E. G., Patnaik, A. K. and Harvey, H. J. (1982) 'Estrogen Receptors in Canine Mammary Tumors', *Cancer research*, 42, pp. 2255–2259.

Mannucci, P. (1997) 'Desmopressin (DDAVP) in the treatment of bleeding disorders: the first 20 years', *Blood*, 90(4), pp. 2515–2521.

Martín De Las Mulas, J., Ordás, J., Millán, M. Y., Chacón, F., De Lara, M., Espinosa De Los Monteros, A., Reymundo, C. y Jover, A. (2004) 'Immunohistochemical Expression of Estrogen Receptor β in Normal and Tumoral Canine Mammary Glands', *Veterinary Pathology*, 41, pp. 269–272.

Martín de las Mulas, J. M., Millán, Y. y Dios, R. (2005) 'A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor α and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog', *Veterinary Pathology*, 42, pp. 200–212.

De M Souza, C. H., Toledo-Piza, E., Amorin, R., Barboza, A. y Tobias, K. M. (2009) 'Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: Clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment', *Canadian Veterinary Journal*, 50, pp. 506–510.

Merlo, W. A., Vargas, V. E., Insfrán, R. M., Benítez, J. S. y Rosciani, A. S. (2013) 'Determinación de receptores de estrógeno beta en carcinomas mamarios caninos', *Revista veterinaria*, 24, pp. 10–13.

Millanta, F., Calandrella, M., Bari, G., Niccolini, M., Vannozzi, I. y Poli, A. (2005) 'Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues', *Research in Veterinary Science*, 79, pp. 225–232.

Millanta, F., Citi, S., Della Santa, D., Porciani, M. y Poli, A. (2006) 'COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: Correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers', *Breast Cancer Research and Treatment*, 98, pp. 115–120.

Misdorp, W., Else, R., Hellmen, E. y Lipscomb, T. P. (1999) 'Histologic classification of mammary tumors of the dog and cat', en: *World Health Organization international histological classification of tumors of domestic animals*. Washington D.C. Armed Forces Institute of Pathology.

Misdorp, W. (2002) 'Tumors of the mammary gland', en: Meuten, D. J. (ed.) *Tumors in domestic animals*. Cuarta Edi. Blackwell Publishing Company. Iowa, USA., pp. 575–606.

Mishra, A. K., Abrahamsson, A. y Dabrosin, C. (2016) 'Fulvestrant inhibits growth of triple negative breast cancer and synergizes with tamoxifen in ER a positive breast cancer by up-regulation of ER β ', *Oncotarget*, 7, pp. 56876–56888.

Mol, J., Selman, P., Sprang, E., van Neck, J. y Oosterlaken-Dijksterhuis, M. (1997) 'The role of progestins, insulin- like growth factor (IGF) and IGF binding proteins in the normal and neoplastic mammary gland of the bitch: a review', *Journal of reproduction and fertility*, 51, pp. 339–344.

Morris, J. S., Nixon, C., King, O. J. A., Morgan, I. M. y Philbey, A. W. (2009) 'Expression of TopBP1 in canine mammary neoplasia in relation to histological type, Ki67, ER α and p53.', *The Veterinary Journal*, 179, pp. 422–429.

Muñoz de Toro, M., Maffini, M. V., Kass, L. y Luque, E. (1998) 'Proliferative Activity and Steroid Hormone Receptor Status in Male Breast Carcinoma', *Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 67, pp. 333–339.

Muto, T., Wakui, S., Takahashi, H., Maekawa, S., Masaoka, T., Ushigome, S. y Furusato, M. (2000) 'p53 Gene Mutations Occurring in Spontaneous Benign and Malignant Mammary Tumors of the Dog', *Veterinary Pathology*, 37, pp. 248–253.

Nakanishi, H. y Wood, C. (1968) 'Biphasic effects of oxytocin on human uterine and tube motility', *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 8, pp. 181–188.

Nakopoulou, L., Lazaris, A. C., Panayotopoulou, E. G., Giannopoulou, I., Givalos, N., Markaki, S. y Keramopoulos, A. (2004) 'The favourable prognostic value of oestrogen receptor β immunohistochemical expression in breast cancer', *Journal of Clinical Pathology*, 57, pp. 523–528.

Nieto, A., Peña, L., Pérez-Alenza, M. D., Sánchez, M. A., Flores, J. M. y Castaño, M. (2000) 'Immunohistologic Detection of Estrogen Receptor Alpha in Canine Mammary Tumors : Clinical and Pathologic Associations and Prognostic Significance', *Veterinary Pathology*, 247, pp. 239–247.

Nieto, A., Pérez-Alenza, M. D., Del Castillo, N., Tabanera, E., Castaño, M. y Peña, L. (2003) 'BRCA1 Expression in Canine Mammary Dysplasias and Tumours : Relationship with Prognostic Variables', *Journal of Comparative Pathology*, 128, pp. 260–268.

North, W. G., Fay, M. J. y Du, J. (1999) 'MCF-7 breast cancer cells express normal forms of all vasopressin receptors plus an abnormal V2R', *Peptides*, 20, pp. 837–42.

Novosad, C. A. (2003) 'Principles of Treatment for Mammary Gland Tumors', *Clinical techniques in small animal practice*, 18, pp. 107–109.

Owen, L. (1980) 'TNM Classification of tumours in domestic animals', in *World Health Organization*, 1er ed, Geneva, Switzerland, pp. 1–52.

Palmieri, C., Cheng, G. J., Saji, S., Zelada-Hedman, A., Warri, A., Weihua, Z., Noorden, S.V., Wahlstrom, T., Coombes, RC., Warner, M. y Gustafsson, J (2002) 'Estrogen receptor beta in breast cancer', *Endocrine-related cancer* , 9, pp. 1–13.

Peña, L., Nieto, A. I., Pérez-Alenza, D., Cuesta, P. y Castaño, M. (1998) 'Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables', *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 246, pp. 237–246.

Peña, L., Silván, G., Pérez-Alenza, M. D., Nieto, A. y Illera, J. C. (2003) ‘Steroid hormone profile of canine inflammatory mammary carcinoma: a preliminary study’, *Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 84, pp. 211–216.

Peña, L., De Andrés, P. J., Clemente, M., Cuesta, P. y Pérez-Alenza, M. D. (2012) ‘Prognostic Value of Histological Grading in Noninflammatory Canine Mammary Carcinomas in a Prospective Study With Two-Year Follow-Up: Relationship With Clinical and Histological Characteristics’, *Veterinary Pathology*, 50, pp. 94–105.

Peña, L., Gama, A., Goldschmidt, M. H., Abadie, J., Benazzi, C., Castagnaro, M., Diez, L., Gartner, F., Hellmen, E., Kiupel, M., Millan, Y., Miller, M. A., Nguyen, F., Poli, A., Sarli, G., Zappulli, V. y Martín de las Mulas, J. (2014) ‘Canine Mammary Tumors: A Review and Consensus of Standard Guidelines on Epithelial and Myoepithelial Phenotype Markers, HER2, and Hormone Receptor Assessment Using Immunohistochemistry’, *Veterinary Pathology*, 51, pp. 127–145.

Pérez-Alenza, D., Rutteman, G. R., Peña, L., Beynen, A. C. y Cuesta, P. (1998) ‘Relation between Habitual Diet and Canine Mammary Tumors in a Case-Control Study’, *Journal of veterinary internal medicine*, 12, pp. 132–139.

Pérez-Alenza, M. D., Peña, L., del Castillo, N. y Nieto, A. I. (2000) ‘Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumors’, *Journal of Small Animal Practice*, 41, pp. 287–291.

Philibert, J. C., Snyder, P. W., Glickman, N., Glickman, L. T., Knapp, D. W. y Waters, D. J. (2003) ‘Influence of Host Factors on Survival in Dogs with Malignant Mammary Gland Tumors’, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17, pp. 102–106.

Platet, N., Cathiard, A. M., Gleizes, M. y Garcia, M. (2004) ‘Estrogens and their receptors in breast cancer progression: A dual role in cancer proliferation and invasion’, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 51, pp. 55–67.

Port Louis, L. R., Varshney, K. C. y Nair, M. G. (2012) 'An Immunohistochemical Study on the Expression of Sex Steroid Receptors in Canine Mammary Tumors', *ISRN Veterinary Science*, pp. 1–7.

Prieto Ocejo, D. (1995) 'Fisiología de la lactación', en: *Fisiología Veterinaria*. García Sacristán, A. Interamericana-McGraw-Hill. Madrid, España, pp. 893–914.

Qiu, J., Bosch, M. A., Tobias, S. C., Grandy, D. K., Scanlan, T. S., Rønnekleiv, O. K. y Kelly, M. J. (2003) 'Rapid Signaling of Estrogen in Hypothalamic Neurons Involves a Novel G-Protein-Coupled Estrogen Receptor that Activates Protein Kinase C', *The journal of neuroscience*, 23, pp. 9529–9540.

Queiroga, F., Pérez-Alenza, M.D., Silvan, G., Peña, L., Lopes, C. e Illera, J. (2005) 'Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer', *The journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 94, pp. 181–187.

Queiroga, F. L., Pérez-Alenza, D., Silvan, G., Peña, L., Lopes, C. S. e Illera, J. C. (2010a) 'Serum and intratumoural GH and IGF-I concentrations: Prognostic factors in the outcome of canine mammary cancer', *Research in Veterinary Science*, 89, pp. 396–403.

Queiroga, F. L., Pires, I., Lobo, L. y Lopes, C. S. (2010b) 'The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours', *Research in Veterinary Science*, 88, pp. 441–445.

Rasotto, R., Zappulli, V., Castagnaro, M. y Goldschmidt, M. H. (2012) 'A retrospective study of those histopathologic parameters predictive of invasion of the lymphatic system by canine mammary carcinomas', *Veterinary pathology*, 49, pp. 330–340.

Rasotto, R., Berlato, D., Goldschmidt, M. H. y Zappulli, V. (2017) 'Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes: An Observational Cohort Study of 229 Cases', *Veterinary Pathology*, 54, pp. 571–578.

Restucci, B., Papparella, S., Maiolino, P. y De Vico, G. (2002) 'Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors', *Veterinary Pathology*, 39, pp. 488–493.

Ripoll, G. V., Iannucci, N., Giron, S., Cascone, O., Gomez, D. E. y Alonso, D. F. (2008) 'Angiostatic activity of 1-deamino-8-D-arginine vasopressin and novel peptide analogs in breast cancer cells', *Proceedings american association of cancer research*, 49, p. 225.

Ross, J. y Fletcher, J. (1998) 'The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy', *Stem cells*, 2, pp. 413–428.

Rungsipipat, A., Tateyama, S., Yamaguchi, R., Uchida, K. and Miyoshi, N. (1999) 'Immunohistochemical Analysis of c-yes and c-erb B-2 Oncogene Products and p53 Tumor Suppressor Protein in Canine Mammary Tumors', *The journal of veterinary medical science*, 61, pp. 27–32.

Rutteman, G. R., Misdorp, W., Blankenstein, M. A. y van den Brom, W. E. (1988) 'Oestrogen (ER) and progestin receptors (PR) in mammary tissue of the female dog: Different receptor profile in non-malignant and malignant states', *British Journal Cancer*, 58, pp. 594–599.

Rutteman, G.R. (1990) 'Hormones and mammary tumor disease in the female dog: an update', *In vivo*, 4, pp. 33-40.

Rutteman, G. (1992) 'Contraceptive steroids and the mammary gland: Is there a hazard?', *Breast Cancer Research and Treatment*, 23, pp. 29–41.

Salas, Y., Márquez, A., Diaz, D. y Romero, L. (2015) 'Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem', *PLOS ONE*, 10, pp. 1–15.

Sapino, A., Macri, L., Tonda, L. y Bussolati, G. (1993) 'Oxytocin enhances myoepithelial cell differentiation and proliferation in the mouse mammary gland', *Endocrinology*, 133, pp. 838–842.

Sasaki, H., Klotz, L. H., Sugar, L. M., Kiss, A. y Venkateswaran, V. (2015) 'A combination of desmopressin and docetaxel inhibit cell proliferation and invasion mediated by urokinase-type plasminogen activator (uPA) in human prostate cancer cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 464, pp. 848–854.

Schneider, R., Dorn, C. R. y Taylor, D. O. N. (1969) 'Factors Influencing Canine Mammary Cancer Development and Postsurgical Survival2', *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 43, pp. 1249–1261.

Siiteri, K. (1987) 'Adipose tissue as a source of hormones', *The american journal of clinical nutrition*, 45, pp. 277–282.

Simon, D., Schoenrock, D., Baumgärtner, W. y Nolte, I. (2006) 'Postoperative adjuvant treatment of invasive malignant mammary gland tumors in dogs with doxorubicin and docetaxel', *Journal of veterinary internal medicine*, 20, pp. 1184–1190.

Sleeckx, N., Rooster, H. De, Kroeze, E. J. B. V., Ginneken, C. Van y Brantegem, L. Van (2011) 'Canine Mammary Tumours, an Overview', *Reproduction in domestic animals*, 46, pp. 1112–1131.

Sonnenschein, E. G., Glickman, L. T., Goldschmidt, M. H. y Mckee, L. J. (1991) 'Body Conformation, Diet, and Risk of Breast Cancer in Pet Dogs: A Case-Control Study', *American journal of epidemiology*, 133, pp. 694–703.

Sonnenschein, C. y Soto, A. M. (2000) 'Somatic Mutation Theory of Carcinogenesis: Why It Should Be Dropped and Replaced', *Molecular carcinogenesis*, 29, pp. 205–211.

Sorenmo, K. U., Shofer, F. S. y Goldschmidt, M. H. (2000) 'Effect of Spaying and Timing of Spaying on Survival of Dogs with Mammary Carcinoma', *Journal of veterinary internal medicine*, 14, pp. 266–270.

Sorenmo, K. U., Kristiansen, V. M., Cofone, M. A., Shofer, F. S., Breen, A., Langeland, M., Mongil, C. M., Grondahl, A. M., Teige, J. y Goldschmidt, M. H. (2009) 'Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence', *Veterinary and comparative oncology*, 7, pp. 162–172.

Sorenmo, K. U., Rasotto, R., Zappulli, V. y Goldshmidt, M. H. (2011) 'Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms', *Veterinary pathology*, 48, pp. 85–97.

Stovring, M., Moe, L. y Glattre, E. (1997) 'A population-based case-control study of canine mammary tumours and clinical use of medroxyprogesterone acetate', *Acta pathologica, microbiologica et immunologica scandinavica*, 105, pp. 590–596.

Szabadi, E. (1977) 'A model of two functionally antagonistic receptor populations activated by the same agonist', *Journal of theoretical biology*, 69, pp. 101–112.

Tavares, W. L. F., Lavalle, G. E., Figueiredo, M. S., Souza, A. G., Bertagnolli, A. C., Viana, F.A. B., Paes, P. R. O., Carneiro, R.A, Cavalcanti, G.A.O., Melo, M. M. y Cassali, G. D. (2010) 'Evaluation of adverse effects in tamoxifen exposed healthy female dogs.', *Acta veterinaria scandinavica*, 52, pp. 52–67.

Taylor, A. H., Ang, V. T. Y., Jenkins, J. S., Silverlight, J. J., Coombes, R. C. y Luqmani, Y. A. (1990) 'Interaction of vasopressin and oxytocin with human breast carcinoma cells', *Cancer research*, 50, pp. 7882–7886.

Thuroczy, J., Reisvaag, G. J. K., Perge, E., Tibold, A., Szilagi, J. y Balogh, L. (2007) 'Immunohistochemical Detection of Progesterone and Cellular Proliferation in Canine Mammary Tumours', *Journal of comparative pathology*, 137, pp. 122–129.

Toniti, W., Buranasinsup, S., Kongcharoen, A., Puchadapirom, P. y Kasorndorkbua, C. (2009) 'Immunohistochemical Determination of Estrogen and Progesterone Receptors in Canine Mammary Tumors', *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 10, pp. 907–912.

Torres Vidales, G. y Botero Espinosa, L. (2008) 'Estudio Histopatológico Retrospectivo de Neoplasias de Glándula Mamaria en Caninos (1975-2000)', *Orinoquia*, 12, pp. 80–88.

van Garderen, E., Mol, J. A. y Nederbragt, H. (1997) 'Expression of Growth Hormone in Canine Mammary Tissue and Mammary Tumors Evidence for a Potential Autocrine/Paracrine Stimulatory', *American journal of pathology*, 150, pp. 1037–1047.

van Garderen, E., van der Poel, H. J. A., Swennenhuis, J. F., Wissink, E.H.J., Rutteman, G.R., Hellmen, E., Mol, J. A., Schalken, J. A. (1999) 'Expression and Molecular Characterization of the Growth Hormone Receptor in Canine Mammary Tissue and Mammary Tumors', *Endocrinology*, 140, pp. 5907–5914.

Vegeto, E., Shahbaz, M., Wen, D. X., Goldman, M. E., O'Malley, B. W. y McDonnell, D. P. (1993) 'Human Progesterone Receptor A Form Is a Cell- and Promoter- Specific Repressor of Human Progesterone Receptor B Function', *Molecular Endocrinology*, 7, pp. 1244–1255.

Weinberg, R. S., Grecco, M. O., Ferro, G. S., Seigelshifer, D. J., Perroni, N. V, Terrier, F. J., Sánchez-Luceros, A., Maronna, E., Sánchez-Marull, R., Frahm, I., Guthmann, M. D., Di Leo, D., Spitzer, E., Ciccia, G. N., Garona, J., Pifano, M., Torbidoni, A. V, Gomez, D. E., Ripoll, G. V, Gomez, R. E., Demarco, I.A y Alonso, D. F. (2015) 'A phase II dose-escalation trial of perioperative desmopressin (1-desamino-8-d-arginine vasopressin) in breast cancer patients.', *SpringerPlus*, 4, pp. 1-8.

Wennbo, H., Gebre-medhin, M., Gritli-linde, A., Ohlsson, C., Isaksson, O. G. P. y Törnell, J. (1997) 'Activation of the Prolactin Receptor but Not the Growth Hormone Receptor is Important for Induction of Mammary Tumors in Transgenic Mice', *The journal of clinical investigation*, 100, pp. 2744–2751.

Yamagami, T., Kobayashi, T., Takahashi, K. y Sugiyama, M. (1996) 'Influence of ovariectomy at the time of mastectomy on the prognosis for canine malignant mammary tumours', *Journal of small animal practice*, 37, pp. 462–464.

Yamashita, H., Yando, Y., Nishio, M., Zhang, Z., Hamaguchi, M., Mita, K., Kobayashi, S., Fujii, Y. y Iwase, H. (2006) 'Immunohistochemical evaluation of hormone receptor status for predicting response to endocrine therapy in metastatic breast cancer', *Breast cancer*, 13, pp. 74–83.

Yang, W., Liu, C., Chang, C., Lee, C., Chang, K. y Lin, C. (2006) 'Proliferative Activity, Apoptosis and Expression of Oestrogen Receptor and Bcl-2 Oncoprotein in Canine Mammary Gland Tumours', *Journal of comparative pathology*, 134, pp. 70–79.

Zatloukal, J., Lorenzova, J., Tichy, F., Necas, A., Kecova, H. y Kohout, P. (2005) 'Breed and Age as Risk Factors for Canine Mammary Tumours', *ACTA VET. BRNO*, 74, pp. 103–109.