

INMUNOHISTOQUÍMICA Y EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y PROGESTERONA EN NEOPLASIAS MAMARIAS MALIGNAS CANINAS EN DISTINTOS ESTADIOS CLÍNICOS

Immunohistochemistry and Expression of Estrogen and Progesterone Receptors in Canine Malignant Mammary Tumors in Different Clinical Stages

Guillermo Hermo^{1,2,*}, Rocio Soldati³, Victoria Wargon³, Alejandra Scursioni⁴, Claudia Lanari³ y Cristina Gobello¹

¹Laboratorio de Fisiología Reproductiva, Cátedra de Fisiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. *ghermo@unq.edu.ar.

²Laboratorio de Oncología Molecular, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes.

³Laboratorio de Carcinogénesis Hormonal, Instituto de Biología y Medicina Experimental, Universidad Nacional de Buenos Aires.

⁴Laboratorio de Patología. Profesional independiente.

RESUMEN

La técnica de inmunohistoquímica descrita por Walker y col. (1998) y Mote y col. (2001) es de utilidad para la determinación de receptores de estrógenos y de progesterona en tumores mamarios de la hembra canina. Existe bastante controversia respecto al porcentaje de receptores de estrógenos y de progesterona, con valor pronóstico o predictivo en tumores malignos caninos debido, muy probablemente, a la falta de uniformidad en criterios de inclusión de los casos en los estudios realizados. El presente trabajo se realizó en una población de 51 perras. Los tumores fueron escindidos quirúrgicamente mediante mastectomía de las glándulas afectadas. Para la determinación de receptores hormonales, se analizó la muestra con mayores características histológicas de malignidad de cada animal. Se contabilizó el porcentaje de células tumorales positivas para cada uno de los receptores (receptor de estrógeno alfa, receptor de estrógeno beta y receptores de progesterona) en los distintos estadios clínicos (I, II, III, IV). Se consideró positivo todo corte $\geq 20\%$ de células tumorales positivas para cada uno de los receptores. Se realizó una estadística descriptiva (media y error estándar) con los animales positivos para cada uno de los receptores en los distintos estadios clínicos. En línea con reportes de otros autores, más de la mitad de caninos portadores de tumores mamarios malignos expresaron receptores de estrógenos y de progesterona. Conociendo que el comportamiento biológico de una neoplasia

varía con el estadio clínico del paciente, resulta interesante estudiar la expresión de los receptores en cada uno de éstos, en animales con neoplasias mamarias malignas. Adicionalmente, a este objetivo incluye la puesta a punto de técnica de inmunohistoquímica para la determinación de receptores hormonales en la especie.

Palabras clave: Inmunohistoquímica, receptores de estrógenos, receptores de progesterona, tumores mamarios, caninos.

ABSTRACT

Immunohistochemical technique described by Walker et al. 1998 and Mote et al. 2001 is useful for the determination of estrogen and progesterone receptors in canine mammary tumors. There is considerable controversy regarding the percentage of estrogen and progesterone receptors that having prognostic or predictive value in malignant tumors in dogs because, most likely, the lack of uniform criteria for inclusion of cases. This study was conducted in a population of 51 female dogs. The tumors were surgically treated by mastectomy of the affected glands. For the determination of hormone receptors, the sample analyzed was showed higher histological malignancy features of each animal. It was counted the percentage of tumor cells positive for each of the receptors (estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta and progesterone receptor) in animals in various clinical stages (I, II, III, IV). It was considered positive cut-off $\geq 20\%$ tumor cells positive for each of the recipients. It was conducted a descriptive statistics (mean and

standard error) which positive animals for each of the receptors in different clinical stages. In line with reports of other authors, more than half of canine carriers of malignant mammary tumors expressed estrogen and progesterone receptors. Knowing that the biological behavior of cancer varies with the clinical stage of the animal, objective was to study the expression of receptors in each of the clinical stages in animals with malignant mammary tumors. Additionally, this includes the preparation of the immunohistochemical technique for the determination of hormone receptors in this species.

Key words: Immunohistochemical, estrogen receptors, progesterone receptors, mammary tumors, canine

INTRODUCCIÓN

Las coloraciones especiales, y en particular las técnicas inmunohistoquímicas (IHQ), introducen datos auxiliares que complementan y enriquecen las observaciones morfohistológicas. La técnica de inmunohistoquímica descrita por Walker y col. [29] y Mote y col. [17], son de utilidad para la determinación de receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RP) en tumores mamaros de la hembra canina [5-7, 11].

Existe bastante controversia con respecto al porcentaje de RE y RP que tengan valor pronóstico y/o predictivo en tumores malignos caninos, muy probablemente, por la falta de uniformidad en criterios de inclusión de los casos. Así, para el caso del receptor de estrógeno alfa (RE- α), algunos estudios demuestran que el porcentaje de tumores que los expresan es alto [15, 18, 27], medio [5, 9] o bajo [8, 11]. Para el receptor de estrógeno beta (RE- β), también se encuentran datos dispares [6, 11]. Particularmente para los RP, algunos autores también hallaron una elevada expresión [28], y otros lo contrario [5, 15].

Existen trabajos sobre la aplicación de técnicas IHQ para la identificación de receptores en tumores mamaros caninos malignos y benignos en forma conjunta [5, 18]; malignos y benignos en forma separada [5, 6, 15, 18, 28] y otros que abordan únicamente los malignos [11]. No obstante, se desconoce la existencia de algún reporte en el que se describa la presencia de receptores en cada uno de los estadios clínicos del paciente. El conocimiento de la expresión de receptores en los distintos estadios clínicos del cáncer mamario canino, aportará indudablemente, un verdadero avance en la búsqueda del punto de corte con valor pronóstico y predictivo en IHQ de RH en neoplasias mamarias caninas.

Conociendo que el comportamiento biológico de una neoplasia varía con el estadio clínico del paciente, resulta interesante estudiar la expresión de los receptores en cada uno de los estadios clínicos de los animales con cáncer mamario. Adicionalmente, a este objetivo, se incluye la actualización de la técnica de IHQ para la determinación de receptores hormonales en la especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

El estudio se realizó en una población de 51 perras (*Canis familiaris*) mestizas y de raza, de 8 y 15 años y de 5 a 40 kilos, enteras, que fueron atendidas durante los años 2005 y 2006 (FIGS. 1-3) con neoplasias mamarias malignas (adenocarcinomas mamaros-biopsia diferida) en estadios I, II, III o IV [24].

Mastectomía

Las perras se premedicaron con sulfato de atropina (0,045 mg/kg, SC), maleato de acepromazina (0,03 mg/kg, SC) y butorfanol 0,2 mg/kg, IM). La anestesia se indujo con tio-



FIGURA 1. TUMOR DE MAMA ÚNICO DE 16 cm DE DIÁMETRO, ESTADIO CLÍNICO III, ANTES DE LA MASTECTOMÍA / SINGLE, 16 cm MAMMARY TUMOR, CLINICAL STAGE III, BEFORE MASTECTOMY.



FIGURA 2. TUMOR DE MAMA ÚNICO DE 13 cm DE DIÁMETRO, ESTADIO CLÍNICO IV, ANTES DE LA MASTECTOMÍA / SINGLE, 13 cm MAMMARY TUMOR, CLINICAL STAGE IV, BEFORE MASTECTOMY.



FIGURA 3. TUMORES DE MAMA MÚLTIPLES EN ESTADIO CLÍNICO III, ANTES DE LA MASTECTOMÍA. EL TUMOR DE MAYOR TAMAÑO PRESENTABA DE 7 cm DE DIÁMETRO / MULTIPLE, STAGE III MAMMARY TUMORS, BEFORE MASTECTOMY. THE LARGER TUMOR DIAMETER WAS 7 cm.

pental sódico (8 mg/kg, IV) en todos los animales. Luego de la intubación endotraqueal, la anestesia se mantuvo con halotano y oxígeno, por medio de un circuito cerrado (DRE Integra SP VSO 2, Dremed, Louisville KY, EUA). Los tumores fueron escindidos quirúrgicamente mediante mastectomía de las glándulas afectadas. También se eliminaron las mamas ipsilaterales craneal y caudal respecto a la mama afectada. Los ganglios linfáticos fueron escindidos cuando a la palpación denotaban adenomegalia [21, 30].

Estudio histopatológico

En cada hembra se eligió un fragmento representativo del tumor mamario que macroscópicamente evidenciaba mayor malignidad y se fijó en formol al 10% en buffer fosfato salino (PBS), luego se impregnó en parafina, seccionó cada 5 μ m y tiñó con hematoxilina y eosina utilizando los procedimientos de rutina. El diagnóstico histopatológico se realizó de acuerdo a la clasificación histopatológica de Misdorp y col. [16].

Determinación de receptores hormonales

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

realizó mediante la incubación con suero fetal bovino al 10% en PBS durante 60 minutos.

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

El contraste de los preparados se realizó con hematoxilina al 50%. Para la coloración se utilizó un tiempo estándar de 20 segundos aproximadamente, y luego la hematoxilina fue virada en agua corriente. La deshidratación de los tejidos, para su posterior montaje, se realizó con pasajes por alcoholes crecientes y xilol. Para el montaje de las secciones se utilizó bálsamo de Canadá. Se contaron de 8 a 10 campos representativos a 100X. Se calculó el porcentaje contando los núcleos positivos (marrones) y negativos de aproximadamente mil células neoplásicas [18, 29]. La valoración de la marcación nuclear de ER y PR fue solamente restringida a las células tumorales epiteliales, pero no a las mioepiteliales o mesenquimáticas (FIGS. 4-11).

Análisis estadístico

Se contabilizó el porcentaje de células tumorales positivas para cada uno de los receptores (RE- α , RE- β y de RP) en los distintos estadios clínicos (I, II, III, IV). Se consideró positivo todo corte \geq 20% de células tumorales positivas para cada uno de los receptores [2, 3]. Se realizó una estadística descriptiva (media y error estándar) con los animales positivos para cada uno de los receptores en los distintos estadios clínicos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El conteo del porcentaje de células tumorales positivas para RE- α , RE- β y RP fue de 37,25% (19/51); 62, 75% (32/51) y 23, 53% (12/51), respectivamente (FIG. 12). La presencia simultánea de RE (α y β) y RP ocurrió solamente en una perra (en estadio III). La presencia de RE- α y RP ocurrió en 3 hem-

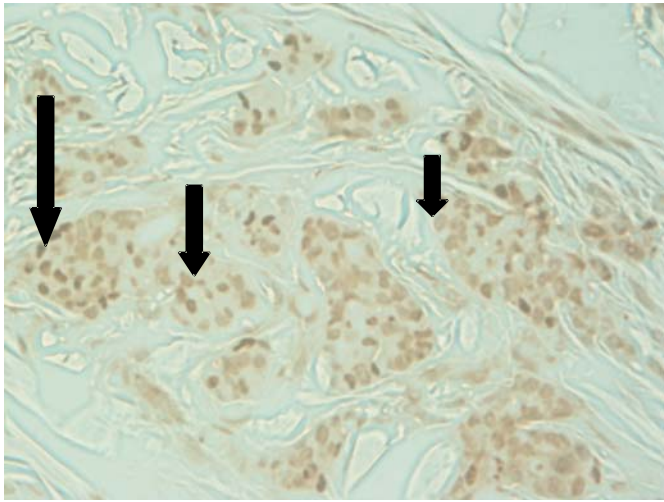


FIGURA 4. TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE UNA MUESTRA DE UN TUMOR MAMARIO MALIGNO CON ANTICUERPO MC-20 (RE- α), MUESTRA POSITIVA. FLECHA PEQUEÑA: TINCIÓN NUCLEAR DÉBIL (+), FLECHA MEDIANA: TINCIÓN NUCLEAR MODERADA (+), FLECHA GRANDE: MUESTRA UN GRUPO DE 5-6 CÉLULAS CON TINCIÓN NUCLEAR FUERTE (+) (20 X) / IMMUNOHISTOCHEMICAL STAINING OF A SAMPLE OF A MALIGNANT MAMMARY TUMOR WITH ANTIBODY MC-20 (RE- α) - POSITIVE SAMPLES. SMALL ARROWS: WEAK NUCLEAR STAIN (+), MEDIUM ARROW: MODERATE NUCLEAR STAIN (+), LARGE ARROW: SAMPLE OF A GROUP OF 5-6 CELL WITH STRONG NUCLEAR STAIN (+) (20 X).

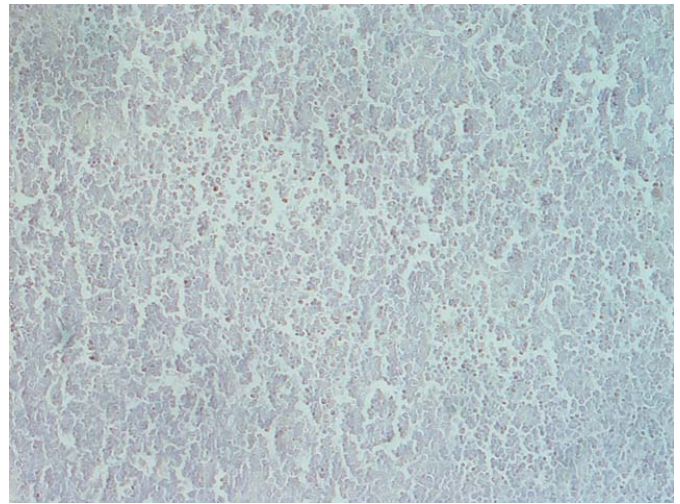


FIGURA 5. TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE UNA MUESTRA DE UN TUMOR MAMARIO MALIGNO CON ANTICUERPO MC-20 (RE- α) - CONTROL NEGATIVO (20 X) / IMMUNOHISTOCHEMICAL STAINING OF A SAMPLE OF A MALIGNANT MAMMARY TUMOR WITH ANTIBODY MC-20 (RE- α) - NEGATIVE CONTROL (20 X).

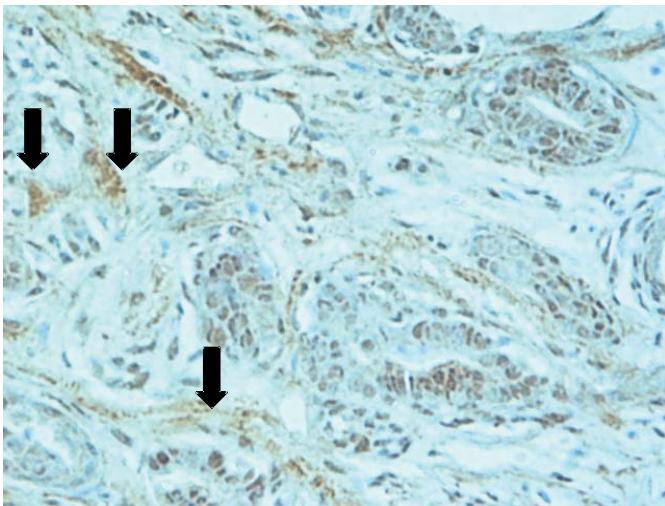


FIGURA 6. TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE UNA MUESTRA DE UN TUMOR MAMARIO MALIGNO CON ANTICUERPO Y-19 (RE- β) - MUESTRA POSITIVA. LAS FLECHAS PEQUEÑAS INDICAN COMO ADEMÁS DE LA TINCIÓN NUCLEAR TAMBIÉN SE OBSERVA TINCIÓN DEL ESTROMA (20 X) / IMMUNOHISTOCHEMICAL STAINING OF A SAMPLE OF A MALIGNANT MAMMARY TUMOR WITH ANTIBODY Y-19 (RE- β) - POSITIVE SAMPLES. THE ARROWS INDICATE HOW SMALL ADDITION OF NUCLEAR STAINING WAS ALSO OBSERVED STROMAL TISSUE (20 X).

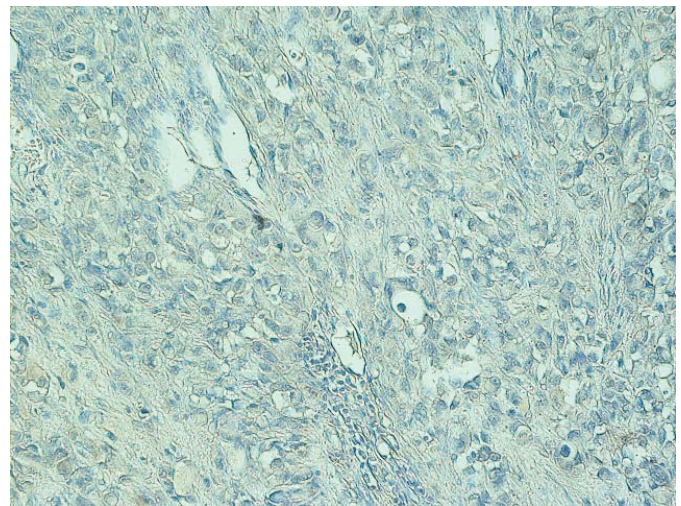


FIGURA 7. TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE UNA MUESTRA DE UN TUMOR MAMARIO MALIGNO CON ANTICUERPO Y-19 (RE- β) - CONTROL NEGATIVO (20 X) / IMMUNOHISTOCHEMICAL STAINING OF A SAMPLE OF A MALIGNANT MAMMARY TUMOR WITH ANTIBODY Y-19 (RE- β) - NEGATIVE CONTROL (20 X).

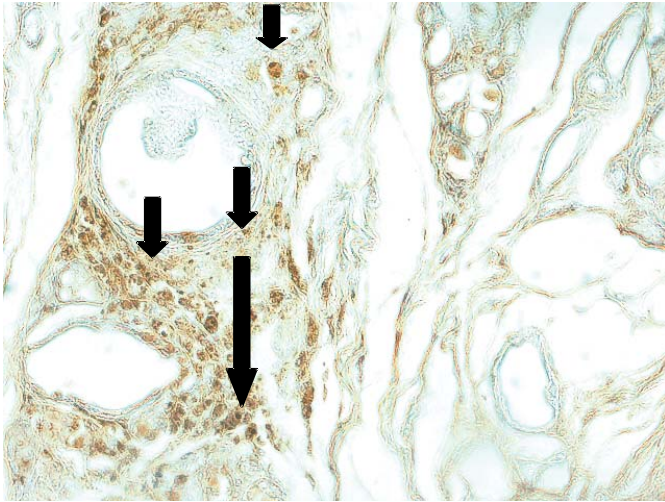


FIGURA 8. TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE UNA MUESTRA DE UN TUMOR MAMARIO MALIGNO CON ANTICUERPO Y-19 (RE-β) - MUESTRA POSITIVA. FLECHAS PEQUEÑAS: MUESTRAN TINCIÓN DEL ESTROMA A MAYOR AUMENTO (RESPECTO A LA FIGURA 6), FLECHA MEDIANA: TINCIÓN NUCLEAR MODERADA (+), FLECHA GRANDE: MUESTRA 2 CELULAS CON TINCIÓN NUCLEAR FUERTE (+) (20 X) / IMMUNOHISTOCHEMICAL STAINING OF A SAMPLE OF A MALIGNANT MAMMARY TUMOR WITH ANTIBODY Y-19 (RE-β) - POSITIVE SAMPLES. SMALL ARROWS: STROMAL STAINING SHOW TO MAYOR INCREASE (WITH RESPECT TO FIGURE 6), MEDIUM ARROW: MODERATE NUCLEAR STAIN (+), LARGE ARROW: SAMPLE 2 CELL WITH STRONG NUCLEAR STAIN (+) (20 X).

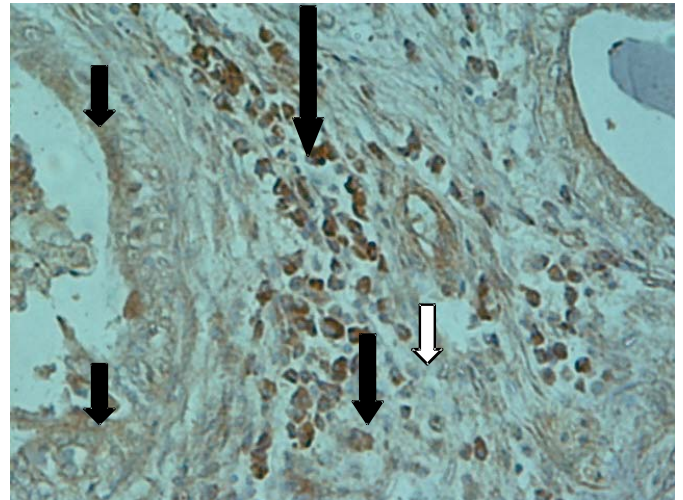


FIGURA 9. TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE UNA MUESTRA DE UN TUMOR MAMARIO MALIGNO CON ANTICUERPO Y-19 (RE-β) - MUESTRA POSITIVA. FLECHA BLANCA: NO SE OBSERVA TINCIÓN NUCLEAR (-), FLECHAS PEQUEÑAS: MUESTRAN TINCIÓN DEL ESTROMA A MAYOR AUMENTO (RESPECTO A LA FIGURA 8), FLECHA MEDIANA: TINCIÓN NUCLEAR MODERADA (+), FLECHA GRANDE: TINCIÓN NUCLEAR FUERTE (+) (40 X) / IMMUNOHISTOCHEMICAL STAINING OF A SAMPLE OF A MALIGNANT MAMMARY TUMOR WITH ANTIBODY Y-19 (RE-β) - POSITIVE SAMPLES. WHITE ARROW: THERE WAS NO NUCLEAR STAINING (-), SMALL ARROWS: STROMAL STAINING SHOW TO MAYOR INCREASE (WITH RESPECT TO FIGURE 8) MEDIUM ARROW: MODERATE NUCLEAR STAIN (+) LARGE ARROW: STRONG NUCLEAR STAIN (+) (40 X).

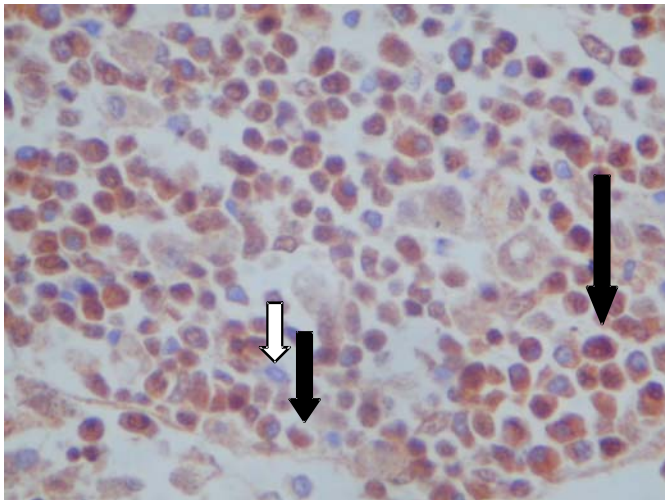


FIGURA 10. TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE UNA MUESTRA DE UN TUMOR MAMARIO MALIGNO CON ANTICUERPO C-20 (RP), MUESTRA POSITIVA. FLECHA BLANCA: NO SE OBSERVA TINCIÓN NUCLEAR (-), FLECHA MEDIANA: TINCIÓN NUCLEAR MODERADA (+), FLECHA GRANDE: TINCIÓN NUCLEAR FUERTE (+) (40 X) / IMMUNOHISTOCHEMICAL STAINING OF A SAMPLE OF A MALIGNANT MAMMARY TUMOR WITH ANTIBODY C-20 (PR) - POSITIVE SAMPLES. WHITE ARROW: THERE WAS NO NUCLEAR STAINING (-), MEDIUM ARROW: MODERATE NUCLEAR STAIN (+) LARGE ARROW: STRONG NUCLEAR STAIN (+) (40 X).

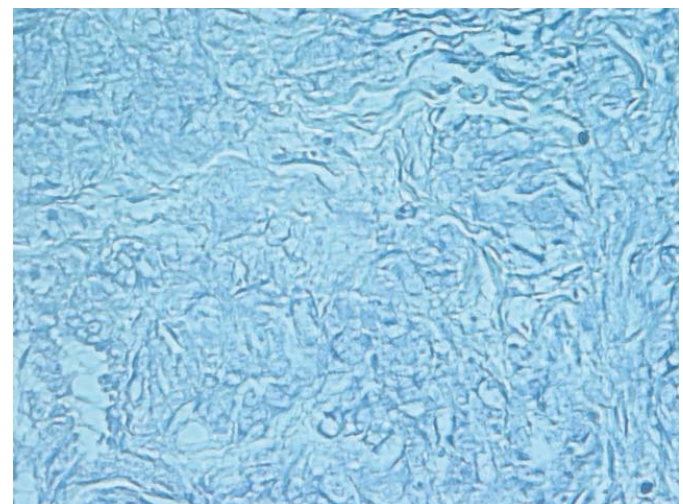


FIGURA 11. TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE UNA MUESTRA DE UN TUMOR MAMARIO MALIGNO CON ANTICUERPO C-20 (RP) - CONTROL NEGATIVO (40 X) / IMMUNOHISTOCHEMICAL STAINING OF A SAMPLE OF A MALIGNANT MAMMARY TUMOR WITH ANTIBODY C-20 (RP) - NEGATIVE CONTROL (40 X).

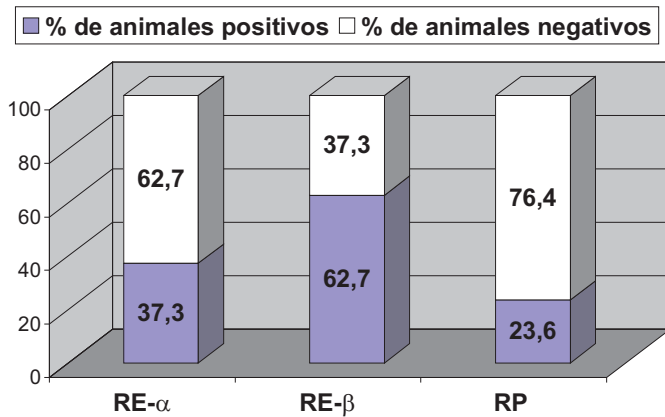


FIGURA 12. PORCENTAJE DE ANIMALES CON TUMORES MALIGNOS QUE RESULTARON POSITIVOS A LA PRESENCIA DE LOS DISTINTOS RECEPTORES HORMONALES / PERCENTAGE OF DOGS WITH MALIGNANT TUMOR POSITIVE THE PRESENCE OF DIFFERENT HORMONE RECEPTORS.

bras (en estadio III). La presencia de RE- β y RP ocurrió en 7 perras (1 en estadio I; 2 en II y 4 en estadio III). Ambos RE aparecieron en 11 hembras (1 en estadio I; 8 en III y 2 en IV), mientras que 19 y 32 de los 51 animales presentaron únicamente RE- α , RE- β , respectivamente.

De los 51 casos estudiados, los identificados como 7, 6, 28, y 10 fueron clasificados como en estadio clínico I, II, III y IV, respectivamente (FIG. 13).

Cuando se estudiaron los casos en estadio clínico I, exclusivamente 1/7; 3/7 y 1/7 resultaron positivos a RE- α ; RE- β y RP, respectivamente (FIG. 14). La media \pm error estándar del porcentaje de receptores que presentaron estos tumores fue de 60 ± 0 ; $75 \pm 6,6$ y 75 ± 0 para RE- α ; RE- β y RP, respectivamente.

En los casos en estadio clínico II, exclusivamente 0/6; 4/6 y 2/6 resultaron positivos a RE- α ; RE- β y RP, respectivamente (FIG. 15). La media \pm SEM del porcentaje de receptores que presentaron estos tumores fue de 0 ± 0 ; $53,8 \pm 12,5$ y $48,5 \pm 26,5$ para RE- α ; RE- β y RP, respectivamente.

Cuando se describieron las hembras en estadio clínico III, exclusivamente 13/28; 19/28 y 7/28 resultaron positivos a los receptores para RE- α ; RE- β y RP, respectivamente (FIG. 16). La media \pm SEM del porcentaje de receptores que presentaron estos tumores fue de $48,3 \pm 5,6$; $57,1 \pm 6,3$ y $43,6 \pm 8,6$ para RE- α ; RE- β y RP, respectivamente.

Tres de 10, 5/10 y 1/10 de las perras en estadio clínico IV resultaron positivas a RE- α ; RE- β y RP, respectivamente (FIG. 17). La media \pm SEM del porcentaje de receptores que presentaron estos tumores fue de $37,4 \pm 9,2$; $57,4 \pm 13,2$ y 60 ± 0 para RE- α ; RE- β y RP, respectivamente.

En línea con reportes previos, más de la mitad de caninos portadores de tumores mamarios malignos expresaron RE y/o RP [5, 15, 18, 28]. Este hallazgo justificaría la investigación

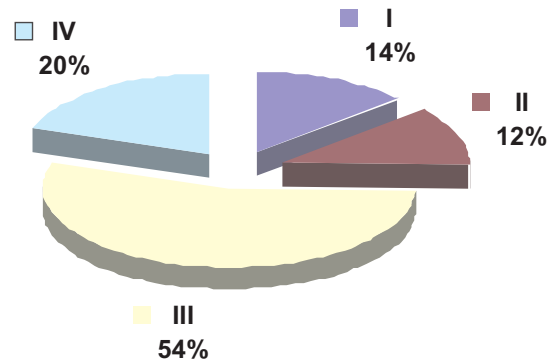


FIGURA 13. PORCENTAJE DE LOS DISTINTOS ESTADIOS CLÍNICOS (I, II, III Y IV) EN 51 CANINOS HEMBRAS CON TUMORES MAMARIOS MALIGNOS / PERCENTAGE OF DIFFERENT CLINICAL STAGE (I, II, III AND IV) IN 51 FEMALES WITH MALIGNANT MAMMARY TUMORS.

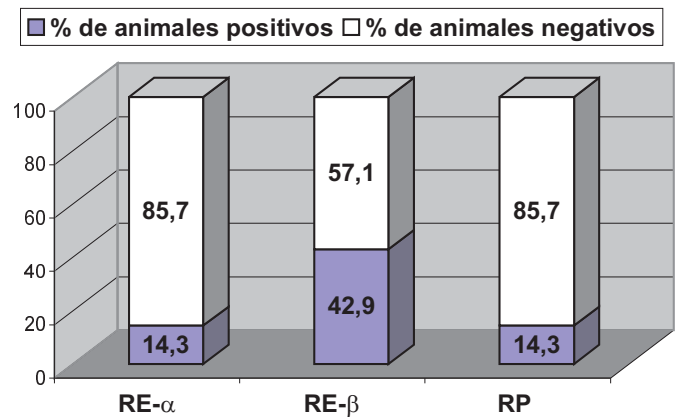


FIGURA 14. PORCENTAJE DE PERRAS CON TUMORES MALIGNOS EN ESTADIO CLÍNICO I QUE RESULTARON POSITIVOS A LA PRESENCIA DE LOS DISTINTOS RECEPTORES HORMONALES / PERCENTAGE OF DOGS WITH MALIGNANT TUMORS IN CLINICAL STAGE I WHO TESTED POSITIVE TO THE PRESENCE OF ALTERNATIVE HORMONE RECEPTORS.

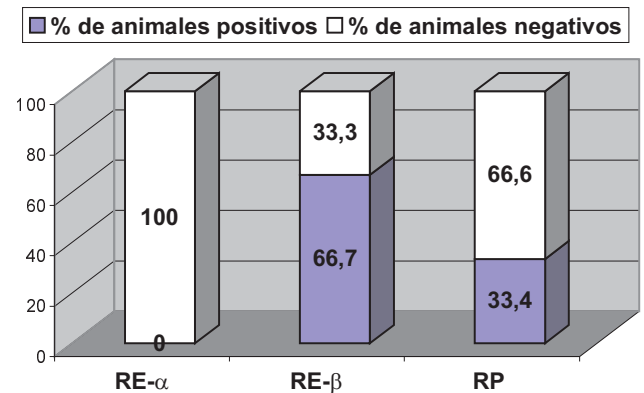


FIGURA 15. PORCENTAJE DE HEMBRAS CANINAS CON TUMORES MALIGNOS EN ESTADIO CLÍNICO II QUE RESULTARON POSITIVOS A LA PRESENCIA DE LOS DISTINTOS RECEPTORES HORMONALES / PERCENTAGE OF DOGS WITH MALIGNANT MAMMARY TUMORS IN CLINICAL STAGE II WHO TESTED POSITIVE TO THE PRESENCE OF ALTERNATIVE HORMONE RECEPTORS.

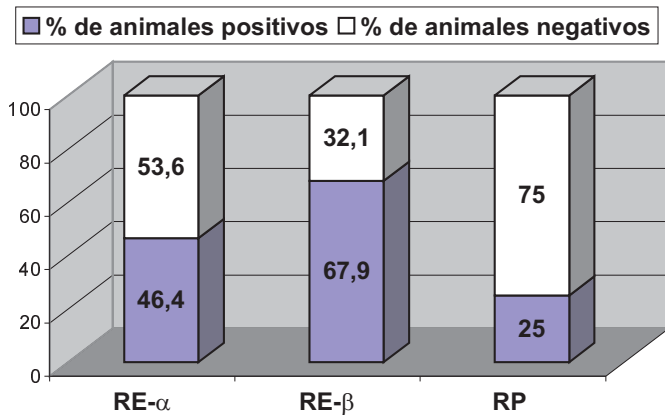


FIGURA 16. PORCENTAJE DE PERRAS CON TUMORES MALIGNOS EN ESTADIO CLÍNICO III QUE RESULTARON POSITIVOS A LA PRESENCIA DE LOS DISTINTOS RECEPTORES HORMONALES / PERCENTAGE OF DOGS WITH MALIGNANT MAMMARY TUMORS IN CLINICAL STAGE III, WHO TESTED POSITIVE TO THE PRESENCE OF ALTERNATIVE HORMONE RECEPTORS.

de antagonistas con actividad adyuvante o neoadyuvante para esta enfermedad.

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

Llama particularmente la atención la elevada expresión de RE- β en todos los estadios. Si bien no hay unanimidad respecto a la funcionalidad de RE- β en el cáncer mamario humano ni canino, prevalecen los trabajos que demuestran que RE- β tendría un papel positivo con respecto al pronóstico de la enfermedad [6, 10, 22, 23, 26]. Actualmente, drogas con actividad agonista están siendo estudiadas para este blanco molecular con expectativas de modular su proliferación en la glándula mamaria, especialmente en estrategias de quimiopreención (genisteína, TAS-108) [1, 12-14, 19, 20, 25].

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

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

La oncología clínica veterinaria y la oncología comparada, es un campo de estudio que ha realizado un rápido creci-

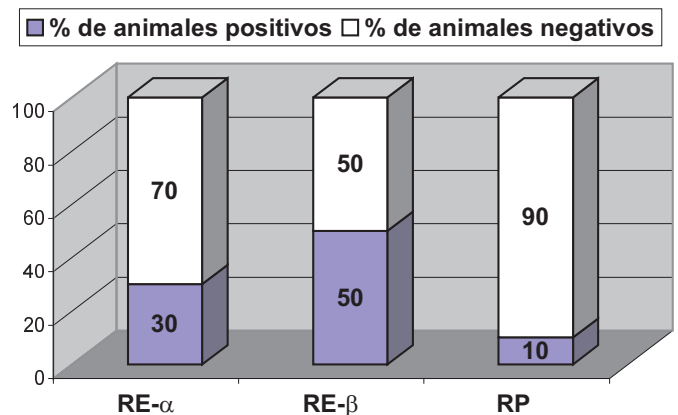


FIGURA 17. PORCENTAJE DE HEMBRAS CANINAS CON TUMORES MALIGNOS EN ESTADIO CLÍNICO IV QUE RESULTARON POSITIVOS A LA PRESENCIA DE LOS DISTINTOS RECEPTORES HORMONALES / PERCENTAGE OF DOGS WITH MALIGNANT MAMMARY TUMORS IN CLINICAL STAGE IV WHO TESTED POSITIVE TO THE PRESENCE OF ALTERNATIVE HORMONE RECEPTORS.

miento en los últimos tiempos. Una gran cantidad de proyectos y programas se han desarrollado en este tiempo, permitiendo distribuir y difundir la experiencia a la clínica veterinaria, a la investigación, a la industria farmacéutica y al ambiente académico. A través del estudio y tratamiento de los animales domésticos (o mascotas) con cáncer, los veterinarios pueden esperanzadamente ayudar, tanto a mascotas afligidas con esta enfermedad como a la investigación y desarrollo de fármacos para tratamientos del cáncer humano.

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo fue parcialmente subsidiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ADLERCREUTZ, H. Phyto-oestrogens and cancer. **Lancet Oncol.** 3:364-373. 2002.
- [2] ALLRED, D.C.; HARVEY, J.M.; BERARDO, M.; CLARK, G.M. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. **Mod. Pathol.** 11: 155-168. 1998.
- [3] BARNES, D.M.; MILLIS, R.R.; BEECH, L.V.A.M.; THORPE, S.M.; LEAKE, R.E. Increased use of immunohistochemistry for oestrogen receptor measurement in mammary carcinoma: the need for quality assurance. **Eur. J. Cancer.** 34:1677-1682. 1998.
- [4] BOGEN, SA.; VANI, K.; MCGRAW, B.; FEDERICO, V.; HABIB, I.; ZEHEB, R.; LUTHER, E.; TRISTRAM, C.; SOMPURAM, SR. Experimental validation of peptide im-

- munohistochemistry controls. **Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.** 17(3):239-246. 2009.
- [5] DE LAS MULAS, J.M.; MILLÁN, Y.; DIOS, R.A. Prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. **Vet. Pathol.** 42(2):200-212. 2005.
- [6] DE LAS MULAS, J.M.; ORDÁS, J.; MILLÁN, M.; CHACÓN, F.; DE LARA, M.; ESPINOSA, A.; REYMUENDO, C.; JOVER, A. Immunohistochemical Expression of Estrogen Receptor β in Normal and Tumoral Canine Mammary Glands. **Vet. Pathol.** 41:269-272. 2004.
- [7] DE LAS MULAS, J.M.; VAN NIEL, M.; MILLÁN, Y.; ORDÁS, J.; BLANKENSTEIN, M.A.; VAN MIL, F.; MISDORP, W. Progesterone receptors in normal, dysplastic and tumorous feline mammary glands. Comparison with oestrogen receptors status. **Res. Vet. Sci.** 72:153-156. 2002.
- [8] GERALDES, M.; GÄRTNER, F.; SCHMITT, F. Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. **Vet. Rec.** 1(146):403-406. 2000.
- [9] GRAHAM, J.C.; O'KEEFE, D.A.; GELBERG, H.B. Immunohistochemical assay for detecting estrogen receptors in canine mammary tumors. **Am. J. Vet. Res.** 60:627-630. 1999.
- [10] GUSTAFSSON, J.A. Estrogen receptor beta: a new dimension in estrogen mechanism of action. **J. Endocrinol.** 163:379-383. 1999.
- [11] ILLERA, J.C.; PÉREZ-ALENZA, M.D.; NIETO, A.; JIMÉNEZ, M.A.; SILVAN, G.; DUNNER, S.; PEÑA, L. Steroids and receptors in canine mammary cancer. **Steroids.** 71:541-548. 2006.
- [12] IMAMOV, O.; SHIM, G.J.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J.A. Estrogen receptor beta in health and disease. **Biol. Reprod.** 73(5):866-871. 2005.
- [13] KHANNA, C.; GORDON, I. Catching cancer by the tail: new perspectives on the use of kinase inhibitors. **Clin. Cancer Res.** 1(11):3645-3647. 2009.
- [14] MACEWEN, E.C. Highlights and horizons in veterinary oncology. **Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.** 21: 902-904, 1999.
- [15] MILLANTA, F.; CALANDRELLA, M.; BARI, G.; NICCOLINI, M.; VANNOZZI, I.; POLI, A. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. **Res. Vet. Sci.** 79: 225-232. 2005.
- [16] MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMEN, E.; LIPSCOMB, T.P. **Histological classification of mammary tumor of the dog and the cat.** Vol VII. Armed Forces Institute of Pathology & American Registry of Pathology & the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology, Washington DC, USA. 58-59 pp. 1999.
- [17] MOTE, P.A.; JOHNSTON, J.F.; MANNINEN, T.; TUOHIMAA, P.; CLARKE, C.L. Detection of progesterone receptor forms A and B by immunohistochemical analysis. **J. Clin. Pathol.** 54: 624-630. 2001..
- [18] NIETO, A.; PENA, L.; PÉREZ-ALENZA, M.D.; SÁNCHEZ, M.A.; FLORES, J.M.; CASTANO, M. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. **Vet. Pathol.** 37(3): 239-247. 2000.
- [19] PAOLONI, MC.; KHANNA, C. Comparative oncology today. **Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.** 37(6): 1023-1032. 2007.
- [20] PAOLONI, M.; KHANNA, C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. **Nat. Rev. Cancer.** 8(2):147-156. 2008.
- [21] PATSIKAS, M.N.; DESSIRIS, A.K. The lymph drainage of the mammary glands in the bitch: a lymphographic study. **Anat. Histol. Embryol.** 25:131-143. 1996.
- [22] PEARSE, L.; JORDAN, C. The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.** 50(1):3-22. 2004.
- [23] ROGER, P.; SAHLA, M.E.; MAKELA, S.; GUSTAFSSON, J.A.; BALDET, P.; ROCHEFORT, H. Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. **Cancer Res.** 61:2537-2541. 2001.
- [24] RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J.; MCEWEN, E.G. Tumors of the Mammary Gland. Withrow SJ, Mc Ewen EG (Eds) **Small Animal Clinical Oncology.** 3rd Ed, WB Saunders, Philadelphia. 455-477pp 2001.
- [25] SAJI, S; HIROSE, M.; TOI, M. Clinical significance of estrogen receptor β in breast cancer. **Cancer Chemoth. Pharm.** 56: 21-26. 2005.
- [26] SHAABAN, A.M; O'NEILL, P.A.; DAVIES, M.P.; SIBSON, R.; WEST, C.R.; SMITH, P.H.; FOSTER, C.S. Declining estrogen receptor-beta expression defines malignant progression of human breast neoplasia. **Am. J. Surg. Pathol.** 27:1502-1512. 2003.
- [27] SOBCZAK-FILIPIAK, M; MALICKA, E. Estrogen receptors in canine mammary gland tumours. **Pol. J. Vet. Sci.** 5:1-5. 2002.
- [28] THURÓCZY, J.; REISVAAG, G.J.; PERGE, E.; TIBOLD, A.; SZILÁGYI, J.; BALOGH, L. Immunohistochemical detection of progesterone and cellular proliferation in ca-

- nine mammary tumours. **J. Comp. Pathol.** 137:122-129. 2007.
- [29] WALKER, K.J.; BOUZUBAR, N.; ROBERTSON, J.; ELLIS, I.O.; ELSTON, C.W.; BLAMEY, R.W.; WILSON, D.W.; GRIFFITHS, K.; NICHOLSON, R.I. Immunocytochemical localization of estrogen receptor in human breast tissue. **Cancer Res.** 15:6517-6522. 1998.
- [30] WITHROW, S. Surgical management of canine mammary tumors. **Vet. Clin. N. Am. Small. Anim. Pract.** 5:495-501. 1975.