

## **Tumores de Mama en la Perra**

<sup>1</sup>Hermo, G.; <sup>2</sup>García, M.; <sup>3</sup>Torres, P.; <sup>4</sup>Gobello, C.

<sup>1</sup>Laboratorio de Oncología Molecular, Departamento de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires, Argentina. <sup>2</sup>Profesional independiente. <sup>3</sup>Cátedra de Técnica y Patología Quirúrgica y Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam. <sup>4</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

### **RESUMEN**

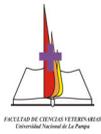
Los tumores mamarios caninos (TMC) representan casi la mitad de las neoplasias en la perra. La etiopatogenia de los TMC es multifactorial. En perras el efecto protector de la ovariectomía temprana y la presencia de receptores para hormonas esteroideas en los tejidos tumorales indican que el factor hormonal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

*Palabras claves:* Tumores mamarios, caninos, etiopatogenia, terapia, oncología molecular

### **SUMMARY**

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

*Key words:* Canine, mammary tumors, etiopathology, treatment, molecular oncology.



## **INTRODUCCIÓN**

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

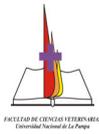
Los tumores mamarios caninos (TMC) representan casi la mitad de los tumores en la perra. La edad promedio de aparición es de 10 años, son raros en los machos y animales jóvenes de ambos sexos (Van Garderbiblio, 1997). La etiopatogenia de los TMC es multifactorial. El desarrollo de cáncer mamario canino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

## **PREVALENCIA**

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

## **ETIOPATOGENIA**

La etiopatogenia de los TMC es multifactorial, en perras el efecto protector de la ovariectomía temprana y la presencia de receptores para hormonas esteroideas en los tejidos tumorales indicarían que el factor hormonal podría estar involucrado en el desarrollo de tumores mamarios (Battistacci, 1974; Hellmén, 1993). Se han encontrado receptores para estrógenos y progesterona (ERs y PRs), en el 50% de los tumores de glándula mamaria malignos y en el 70% de los tumores de glándula mamaria benignos, como así también en el tejido glandular mamario normal (Corrada y Gobello, 2001). Este hallazgo concuerda con la idea de que una desviación del mecanismo normal de expresión de dichos receptores produciría un progresivo desarrollo de tumores malignos. Los tumores que no presentan receptores son los más agresivos, así como



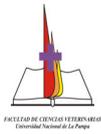
también son más indiferenciados que aquellos que sí expresan. Además la presencia de receptores es muy poco frecuente en las metástasis, lo que podría indicar un patrón de crecimiento autónomo. En humanos, los tumores ricos en Ers o Ers y PRs (Mc Guire, 1980; Nerurkar, 1987; Rooney y Henry, 1993) responden a la terapia de ablación endocrina, pero los tumores que carecen de tales receptores no lo hacen y se consideran de peor pronóstico (Donnay et al., 1996).

Otros factores de crecimiento que podrían participar en el desarrollo de tejidos mamarios normales y neoplásicos son el factor de crecimiento epidérmico (EGF), los factores de crecimiento transformante (TGFs) (Blood y Zetter, 1990; Donnay, et al., 1994; Ettinger y Felman, 1997), factor tipo insulínico I (IGF-I) y la proteína relacionada a la hormona paratiroidea (PTHrP) (Gilbertson et al., 1983; Okada et al., 1997; Weir, et al., 1998). Dichos factores están asociados con la presencia de Ers y PRs en tumores de glándula mamaria (Gobello y Corrada, 2001; Rutteman et al., 1989). Además, existen otros mecanismos muy importantes para el avance del proceso neoplásico que se manifiestan especialmente en los tumores Ers negativos (Ers-), en los que la progresión de la enfermedad es más independiente de las hormonas esteroideas. Los productos de oncogenes, entre los que se encuentran los factores de crecimiento y sus receptores, cumplen un papel fundamental en los procesos de malignidad celular.

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

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

En ciertos tumores de glándula mamaria también se encontraron receptores para glucocorticoides (Parodi et al., 1984) y dihidrotestosterona (D'Arville y Pierpoint, 1979). Existen diversas enzimas involucradas en la etiopatogenia tumoral, este es el caso de las metaloproteinasas de matriz (MMPs), las cuales juegan un rol fundamental en los mecanismos de degradación durante los procesos de invasión y metástasis. Estas enzimas forman parte de una familia de más de 10 endopeptidasas que son expresadas en niveles bajos en los tejidos adultos normales, pero cuya expresión se eleva rápidamente en procesos de remodelación tisular normales y patológicos tales como el

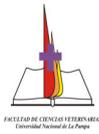


desarrollo embrionario, la reparación tisular, la inflamación y durante la diseminación tumoral. Varios trabajos reportan la elevada expresión de dichas enzimas en tumores mamarios caninos y la directa correlación con el grado de malignidad (Hirayama et al., 2002; Papparella et al., 2002; Yokota et al., 2001). Todas estas enzimas son secretadas como proenzimas y requieren calcio y zinc para desempeñar su función. Los factores de crecimiento que promueven el crecimiento tumoral también inducen la producción de diversas MMPs. Dada la importancia de las MMPs, es lógico que se haya observado con atención los avances en el conocimiento sobre los inhibidores tisulares naturales de MMPs, los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs), el TIMPs-1 es el inhibidor mas conocido y ha sido aislado de una amplia variedad de tejidos y fluidos corporales. Dentro de un modelo estocástico, la disminución de los niveles de TIMP-1 no solo iniciaría la oncogenesis, sino también predispondría a la célula a cambios posteriores conducentes a la progresión tumoral (Gomez y Alonso, 1998).

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

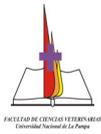
La vinculación entre el colesterol y la biología tumoral se estableció hace tiempo, cuando se observó que ciertas células neoplásicas sintetizaban grandes cantidades de colesterol. Más tarde, se comprobó que la principal enzima reguladora de la síntesis de colesterol, la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa), se encontraba significativamente aumentada en los tejidos tumorales (Gomez y Alonso, 1998; Alonso y Gomez, 1999). Las células tumorales tendrían una demanda mucho mayor de colesterol y sus moléculas precursoras, que las células normales. La enzima HMG-CoA reductasa intervendría en la duplicación celular proporcionando cantidades suficientes de colesterol para la conservación de la integridad de las membranas celulares, y activando la DNA polimerasa, enzima de la cual depende la síntesis del ácido desoxirribonucleico (DNA). La observación de que en animales de experimentación el descenso del colesterol en sangre -inducido sea por la dieta o por tratamiento con fármacos- disminuye el crecimiento de la masa tumoral, corrobora que la inhibición de la biosíntesis del colesterol representa una estrategia atractiva para bloquear procesos relacionados con la transformación neoplásica (Gomez y Alonso, 1998). La lovastatina es un antibiótico fúngico que inhibe en forma competitiva la actividad de la HMG-CoA reductasa, porque su estructura es semejante al sustrato, el HMG-CoA. Las propiedades de la lovastatina no se limitan a sus efectos sobre la proliferación de las células tumorales, puesto que también se comporta como un potente inhibidor de los procesos de adhesión, migración e invasión, de los cuales depende la capacidad de establecer metástasis de un tumor.

¿Que acontece para que la célula se libere de los frenos normales sobre el crecimiento celular? En los últimos años comenzaron a surgir algunas respuestas. Se descubrieron genes de cáncer en los cromosomas de las células tumorales. Estos genes, llamados oncogenes, representan la fuerza impulsora en el crecimiento descontrolado de muchas



células cancerosas. Presentes en la célula normal como proto-oncogenes, estos genes reguladores del crecimiento se activan de manera inapropiada y redundan en la conversión de la célula fundadora normal en otra cancerosa. Una vez activados, los genes actúan en forma continua dirigiendo las células hacia la división incontrolada, un comportamiento que se conoce como cáncer.

Resumiendo, se llama proto-oncogenes a los distintos genes que normalmente se encargan, a través de las correspondientes proteínas que codifican, de gobernar la replicación y la diferenciación celular. Esta denominación surge de la idea que el desarrollo de determinadas alteraciones en un protooncogen, por más pequeñas que estas pudieran ser, lo transforman en su contrapartida patológica, u oncogen. El oncogen c-erbB2 se encuentra en cánceres mamarios y ováricos. Su amplificación se asocia a un elevado índice mitótico y se correlaciona con una pobre respuesta clínica a la quimioterapia. El oncogen c-erbB2 codifica una forma alterada y truncada de un receptor de membrana de factores de crecimiento, con actividad intrínseca de tirosina kinasa que puede llevar a cabo autofosforilaciones que encienden señales intracelulares de proliferación (Gomez y Alonso, 1998). El c-erbB2 fue mapeado en caninos mediante FISH (Fluorescence In Situ Hybridization), técnica genética utilizada en el mapeo de genes, ubicado en el cromosoma 1q13.1. Su expresión fue correlacionada con una mas rápida progresión y mal pronostico en cáncer de mama en perras (Murua Escobar et al., 2001). Un estudio realizado por Matsuyama et al. (2001) ha demostrado que c-erbB juega un importante papel en la carcinogénesis de la glándula mamaria canina, este estudio revela que c-erbB no se expresa en glándulas mamarias normales mientras que si es expresado en tumores mamarios benignos y malignos, no habiendo correlación entre el tipo de receptor expresado (c-erbB1, c-erbB2, c-erbB3, c-erbB4) y tipo histopatológico de tumor (Matsuyama et al., 2001). También reportan que el protooncogen c-kit es frecuentemente expresado en tumores mamarios de perras y en otros tipos de tumores caninos (Kubo et al., 1998). Es sabido que el producto de c-kit, como de c-erbB pertenecen a la superfamilia de receptores tirosina quinasa (Chui et al., 1996) se relacionan con la proliferación y diferenciación celular (Natali et al., 1992). De esta manera, es muy interesante notar que una variedad de receptores tirosina quinasa es expresado en tumores mamarios caninos. Otro grupo de genes normales que codifican proteínas que modulan el ciclo celular a través de un efecto inhibitorio sobre la progresión del mismo, son los denominados genes supresores de tumor. Las evidencias sobre la existencia de los genes supresores de tumor – también llamados antioncogenes – provinieron de distintas líneas de trabajo. Este es el caso del gen p53, que codifica una fosfoproteína que regula la replicación del ADN, la proliferación celular y la muerte celular. Este gen actuaría como un “policía molecular” que impide la propagación de células dañadas genéticamente. También se encontraron mutaciones de dichos genes, p53 en un número de cánceres mamarios caninos espontáneos los que podrían contribuir a incrementar alteraciones citogenéticas y formación de tumor (Veldhoen et al., 1999). Los pacientes caninos con alteraciones de p53 son considerados como los de peor pronostico (Wakui et al., 2001). Se detectaron mutaciones puntuales en el gen de la p53 en diversos tipos de tumores, entre ellos carcinoma de glándula tiroideas, papilomas orales, adenoma de glándulas anales, osteosarcoma y linfoma mamario en caninos (Lee et al., 2002; Koenig et al., 2002). La proteína p53 se comporta como un freno para la división de las células, aunque de manera indirecta. Se secuenció un gen llamado WAF1, que se expresa por efecto de la p53. El producto proteico del WAF1 (la proteína p21) se une a las kinasas dependientes de ciclinas y detiene la progresión del ciclo celular.



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

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

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

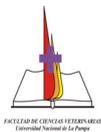
La función inmune alterada puede jugar un rol importante en la patogénesis de las neoplasias mamaras en la perra. Se han identificado antígenos tumorales no específicos que causan una inefectiva respuesta inmune humoral y celular. Los complejos inmunes identificados en perras con tumores mamaros generalmente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

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

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

Los tumores se malignizan debido a que las células tumorales invaden tejidos vecinos y sobreviven en un sitio ectópico. El término invasión indica la penetración en un territorio adyacente y su ocupación. Esta invasión permite a las células tumorales entrar a la circulación sanguínea, a partir de donde pueden colonizar órganos distantes y eventualmente formar un tumor secundario, llamado metástasis.

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



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

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

## CICLO CELULAR Y CÁNCER

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

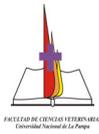
El rol crítico de la familia de las ciclinas en la regulación del ciclo celular esta bien establecido. Las ciclinas son proteínas especializadas que activan las distintas fases del ciclo celular. La mayoría de las células son capaces de proliferar en base a estímulos externos tales como factores de crecimiento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

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

Tabla 1: Ciclinas y CDK en el ciclo celular.

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

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



## ANGIOGENESIS TUMORAL

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

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

Induce receptores para sí mismo en células endoteliales de vasos sanguíneos maduros, no proliferantes. Estas células endoteliales normales, que están en reposo, no tienen el receptor hasta que no son expuestas al VEGF.

Puede ser inducido por el oncogen c-ras, por otros oncogenes y factores de crecimiento, que a su vez inducen mayor producción de VEGF. Por lo tanto, drogas que modulen la acción de c-ras pueden inhibir la angiogénesis.

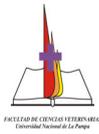
Induce la producción y activación de muchos otros factores de crecimiento que contribuyen a la formación de vasos sanguíneos. Entonces, al bloquear la actividad de VEGF también se bloquea la acción de otros factores de crecimiento involucrados en la progresión tumoral.

A diferencia de los vasos sanguíneos normales que requieren otros factores para su desarrollo normal, los vasos sanguíneos inducidos por VEGF “tienen goteras”, o sea, aumento de la permeabilidad vascular. Las proteínas plasmáticas inducidas por el VEGF, como el fibrinógeno, pueden salirse de los nuevos vasos, formando un gel esponjoso alrededor del tumor. Este gel contiene VEGF, que induce mayor angiogénesis.

El VEGF parece evitar la apoptosis en las células endoteliales inducidas. Por lo tanto al inhibir la acción de VEGF se está inhibiendo una de las vías de escape tumoral.

Los tumores también elaboran inhibidores de la angiogénesis, que pueden disminuir el crecimiento del tumor en lugares distantes (Casciato et al., 2001). En muchas circunstancias, la remoción quirúrgica del tumor primario es seguida por un rápido desarrollo de metástasis. Se ha demostrado que ciertos tumores experimentales elaboran un inhibidor endógeno de la angiogénesis, denominado angiostatina. Este factor es liberado al torrente sanguíneo e inhibe a distancia la vascularización de focos metastásicos y por ende su crecimiento. La extirpación del tumor primario produce una caída brusca en los niveles circulantes de angiostatina, que facilita el crecimiento rápido de las metástasis (Gomez y Alonso, 1998).

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



poderoso factor angiogénico en tumores mamarios caninos (Restucci et al., 2002; Restucci et al., 2004; Graham et al., 1999).

## ASPECTOS CLÍNICOS

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

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

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

## DIAGNOSTICO

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

## MANEJO CLÍNICO

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

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

Tabla 2: Resumen modificado de la Organización Mundial de la salud (WHO) del sistema de estadios clínicos para TMC (Corrada y Gobello, 2001)

Estadios de los tumores de glandula mamaria en caninos			
Estadio	Tumor Primario (T)	Estado del linfonódulo regional (N)	Metastasis a distancia (M)
1	Diámetro – 3cm.	No afectado	No metástasis a distancia detectada
2	Diámetro e/ 3-5 cm.	No afectado	No metástasis a distancia detectada
3	Diámetro + 5 cm.	No afectado	No metástasis a distancia detectada
4	Cualquier T	Metástasis diagnosticada por histopatológica	No metástasis a distancia detectada
5	Cualquier T	Cualquier N	Metástasis a distancia detectada

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

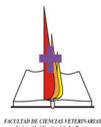
## HISTOPATOLGÍA

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

El reporte de histopatología debe incluir siempre el grado de infiltración y el grado histológico de malignidad (por ejemplo el grado de diferenciación, grado nuclear, índice mitótico, invasión linfática o vascular). Estos valores pueden ser usados para indicar malignidad y el alto riesgo de recurrencia y metástasis pulmonar. El grado de malignidad histológica usualmente se expresa en una escala de 1 a 3 grados, donde el grado 3 tiene los peores pronósticos. A continuación se presenta una clasificación actual, los tipos más frecuentes aparecen marcados con un asterisco. (Tabla 3).

Tabla 3: Tipos tumorales. Características.

Tipos de tumores	Denominacion	Características
Tumores Malignos	Carcinoma in situ (no infiltrante).	Las células neoplásicas no atraviesan la membrana basal.
	Carcinoma complejo.	Proliferación de células epiteliales y mioteliales.
	Carcinoma simple: Túbulopapilar* Sólido* Anaplásico*	Integrado por un solo tipo celular.
	Carcinomas especiales: De células fusiformes, escamosas*	CCE: integrado por cordones y sábanas de células epiteliales con áreas de diferenciación escamosa.
	Mucinoso Rico en lípidos	Mucinoso: producen mucina Rico en lípido: citoplasma vacuolado



**Facultad de Ciencias Veterinarias**  
General Pico - La Pampa, República Argentina

	Sarcomas: Fibrosarcoma  Osteosarcoma.	De fibroblastos con cantidad variable de colágeno. Con formación de hueso y/o tejido osteoide
	Carcinosarcoma.	Se pueden reconocer mezclas de tipos carcinomatosos y sarcomatosos.
	Carcinoma o sarcoma en un tumor benigno*.	Aparecen focos de células malignas o nódulos de estas en adenomas complejos o tumores mixtos benignos.
Tumores benignos	Adenoma: Simple Complejo* Basaloide	Células epiteliales o mioepiteliales diferenciadas. Ambos tipos celulares. Cordones uniformes de células monomórficas basaloideas epiteliales.
	Fibroadenoma(baja celularidad, alta celularidad)	Crecimiento de células luminales y del estroma o mioepiteliales.
	Tumor mixto benigno*	Compuesto de células que morfológicamente recuerdan componentes epiteliales (luminales y/o mioepiteliales) y mesenquimatosos que producen cartilago y/o hueso y/o grasa, ocasionalmente, junto con tejido fibroso.
Hiperpasias/displasias mamarias	Ductal/lobular*	Proliferaciones epiteliales benignas con cambios hiperplásicos y cambios extra/intralobulares
	Ectasia ductal*	Dilatación del sistema ductal de la mama.
	Fibroesclerosis	Fibrosis focal
	Ginecomastia	Condición de las glándulas mamarias del macho canino con hiperplasia de los ductos y el estroma, incluso puede haber algún acino. Suele formar parte de algún síndrome de feminización asociado a tumor de las células de Sertoli del testículo.

En general, en todos lo TMC el índice mitótico de las células neoplásicas es bajo, por lo que la presencia de varias mitosis por campo es un indicador de gran malignidad histológica (Dhame y Weiss, 1989; Hampe y Misdorp, 1974; Jubb y Kennedy, 1970; Misdorp, 1988; Misdorp et al., 1999).

## TRATAMIENTO

### *QUIRÚRGICO*

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

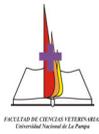
Un estudio indicó que la ovariectomía desarrollada conjuntamente con la remoción del tumor mamario, prolongaría el tiempo de supervivencia no solamente en perras con tumores benignos sino también en malignos (Sorenmo et al., 2000). Este estudio mostró que en perras castradas con un periodo inferior de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

### *QUIMIOTERAPIA*

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

### *HORMONALES*

El tamoxifeno, es un anti-estrógeno administrado como terapia de sostén, está actualmente atrayendo el interés de los especialistas, dado sus potenciales beneficios en el control del cáncer. Es un anti-estrógeno sintético no esteroide análogo al clomifeno y mixto, con efectos agonistas y antagonistas. La manifestación de estas diferentes acciones depende de la especie y del tejido considerado (Gottardis et al., 1988; Misdorp, 1988; Mol et al., 1997; Jordan, 1998). Por ejemplo, en humanos existen efectos antagonistas en la glándula mamaria mientras que en el útero se observan efectos



agonistas (Morris et al., 1993). El preciso mecanismo de acción de tamoxifeno es todavía incierto, se piensa que podría deberse a un bloqueo competitivo de ERs pero posiblemente tenga otros mecanismos de acción desconocidos (Kitchell, 1995). Puesto que no todas sus acciones farmacológicas pueden ser explicadas en base a su actividad antagonista del receptor de estrógeno, se ha sugerido que parte del efecto antitumoral podría estar relacionado con la actividad inhibitoria de la proteína quinasa C (PKC). El tamoxifeno tiene la capacidad de unirse al dominio catalítico de la PKC. Es importante remarcar que la actividad de la PKC puede estar alterada en ciertos tumores. Los tumores de mama tienden a presentar mayores niveles de PKC que el tejido normal. En muchos casos el potencial metastático de células cancerosas se correlaciona con la actividad de la PKC. Las células más agresivas tienen la actividad de la PKC más alta en comparación con las células menos agresivas (Kazanietz, 2000; Kitchell, 1995). El tamoxifeno es utilizado en mujeres para el tratamiento de tumores positivos al ERs. Por el momento la información disponible acerca de la eficacia del tamoxifeno en el tratamiento de tumores de glándula mamaria caninos es insuficiente. En un estudio, de respuestas a corto plazo se observaron diferencias significativas en 16 perras con carcinomas mamarios que recibieron tamoxifeno a una dosis de 0,4 a 0,8 mg/kg/día vía oral durante 4 a 8 semanas (Kitchell, 1995). No obstante, son necesarios más estudios para ajustar el régimen de administración; efectos colaterales como piometra, hiperplasia vaginal, incontinencia urinaria, fiebre y alopecia pueden limitar el uso de tamoxifeno en perras (Ettinger y Felman, 1997; Misdorp, 1988; Morris et al., 1993).

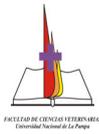
La disponibilidad de antiprogesteronos como agliprestone en el mercado europeo (Misdorp, 1988) plantea su potencial beneficio en el tratamiento de tumores de glándula mamaria caninos positivos a los receptores de progesterona.

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

### *RADIOTERAPIA*

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

La falla en el tratamiento quirúrgico se debe entre otras cosas a una ablación incompleta, debido a restos tumorales que pueden quedar en el margen operatorio. La radiación a menudo fracasa en el centro del tumor, donde existen grandes volúmenes de células, muchas en condiciones hipóxicas pero rara vez falla en la periferia, donde las células están en cantidades reducidas y bien vascularizadas. En contraste, el alcance de la cirugía está limitado por la necesidad de preservar tejidos normales vitales adyacentes al tumor. Si la cirugía fracasa en estas circunstancias, en general se debe a la presencia de células cancerosas residuales en la periferia del campo quirúrgico (Mc Leod y Thrall Da 1999). La radioterapia puede practicarse antes o después de la resección quirúrgica de un tumor. Si la demora entre cirugía y radioterapia es prolongada, las células tumorales residuales pueden tener el tiempo suficiente para repoblar el campo quirúrgico perdiéndose las ventajas de la misma. Si la radioterapia es demasiado precoz en el periodo postoperatorio, puede afectarse el periodo cicatrizal. En líneas generales, un retraso de 1,5 a 3 semanas antes de iniciar la radioterapia parece ser lo más conveniente. La radioterapia preoperatoria también posee ciertas ventajas, reduciendo el



tamaño tumoral previo a la cirugía, puede facilitar la ablación. La radiación ionizante también puede influir sobre la viabilidad de las células tumorales y reducir la probabilidad de implantación o diseminación neoplásica que podría acontecer como secuela de la manipulación operatoria (Perez y Brady, 1987).

#### *INHIBIDORES PROTEASICOS*

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

#### *INHIBIDORES EN LA RUTA BIOSINTÉTICA DEL COLESTEROL*

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

#### *INMUNOTERAPIA*

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

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

#### **ALIMENTACIÓN**

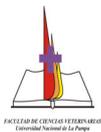
Una teoría publicada en 1989, (Shofer et al 1989) y citada en varios textos (Alenza et al., 1998) sugiere que el consumo de una dieta hiperproteica e hipograsa en perras con cáncer mamario puede prolongar su tiempo de sobrevida.

## CONTROL DEL CICLO CELULAR

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

Tabla 4: Compuestos terapéuticos que controlan el ciclo celular.

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



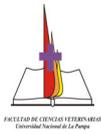
	natural	CDK2 >> CDK4	marina
SU 9516	Indolinona	CDK2	Disminuye la fosforilación de RB y la activación de Caspasa 3. Provoca el bloqueo de G0/G1 y G2/M.
CINK4	Triamino-pirimidina	CDK4/6-ciclina D1	Provoca desfosforilación de RB e interrumpe en cultivos y tumores pequeños en un modelo de xenoinjerto
PD 0183812	Pirido-pirimidina	CDK4, CDK6 > CDK2	Interrupción de G1 en células RB positivas en correlación con hipofosforilación RB
Fascapicina	Producto natural	CDK4	Interrumpe G1 y desfosforilación RB en sitios que son específicos para Kinasa CDK4

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

## **CRONO FARMACOLOGÍA Y CRNOTERAPIA EN CÁNCER**

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

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



## **PRONÓSTICO**

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

### *1. FACTORES CLÍNICOS*

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

### *2. FACTORES HISTOLÓGICOS*

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

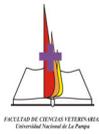
Aquellas neoplasias con presencia de células mioepiteliales (complejas) tienen mejor pronóstico que las simples. Los sarcomas son los tumores de peor pronóstico ya que presentan una alta probabilidad de metástasis y bajos TLE y ST. Dentro de los carcinomas simples, existe un orden creciente de malignidad: no infiltrativo, túbulopapilar, sólido, anaplásico. Los carcinomas tubulares metastatizan con más frecuencia y con más frecuentemente causan la muerte del animal. El pronóstico empeora en función de la mayor anaplasia de la neoplasia (Castillo Magan, 2001).

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

La sobrevida total es de 4 a 17 meses para animales con tumores malignos. Estos suelen dar metástasis durante los 2 años de realizada la cirugía (mas comúnmente 1 a 9 meses).

Además, las perras que desarrollaron tanto tumores benignos como malignos están en mayor riesgo de desarrollar tumores malignos en un futuro cercano; por lo tanto debe realizarse un seguimiento periódico en todos los casos (con una frecuencia de 3 o 6 meses para tumores benignos o malignos respectivamente) (Clark, 1994).

Los tumores que son menos invasivos y mejor diferenciados tienen bajas recurrencias, como aquellos que existe baja reactividad linfoide. Un diagnóstico histopatológico de



tumor mamario maligno no siempre indica una neoplasia clínicamente maligna. Cerca de la mitad de los tumores mamarios “malignos” no recurren ni se diseminan después de la ablación quirúrgica. Aun cuando el pronóstico no puede fundamentarse en el examen histopatológico, existen generalidades (Loar, 1986).

### *3. NUEVOS FACTORES PRONÓSTICO*

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

### **PREVENCIÓN**

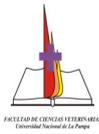
La ovariectomía u ovariectomía temprana en las perras que no serán destinadas a reproducción es un elemento clave para disminuir fuertemente el riesgo de contraer tumores de glándula mamaria. Los propietarios deberían ser advertidos acerca de llevar acabo la rutina de examinar ellos mismos la mamas de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

### **CONCLUSIONES**

Los tumores de glándula mamaria son uno de los principales problema del aparato reproductivo que nos llega actualmente a la consulta clínica. Debido a su complejo desarrollo, que tiende a la progresión y malignización del tejido mamario a lo largo del tiempo, no quedan dudas que cuanto más rápido se proceda a su extracción quirúrgica, mayores son las posibilidades de sobrevivida del paciente. En general los tumores responden de manera dudosa a la irradiación aunque en ocasiones se utiliza para intentar retrasar el crecimiento. De igual manera tienen variable respuesta a la quimioterapia, por lo que tampoco existe un protocolo quimioterápico eficaz que pueda ser utilizado en esta afección. Mucho se ha avanzado últimamente en los mecanismos moleculares de transducción de señales y desarrollo tumoral y parecen promisorias las terapias dirigidas contra estos mecanismos.

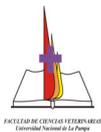
### **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo es subsidiado por la Morris Foundation, Grant Nro. D05CA-059, Directora C. Gobello. G. Hermo es Becario Nivel Inicial de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Subsidio PICT 14255/03, Investigador Responsable D.F. Alonso.



## **BIBLIOGRAFÍA**

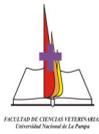
- Alenza, D. P.; Rutterman, G. R.; Pena, L.; Beynen, A. C.; Cuesta, P. 1998.** Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 12: 132-139.
- Allen, S. W.; Mahaffey, E. A. 1989.** Canine mammary neoplasia: Prognostic indicators and response to surgery. *Journal of American Animal Hospital Association*, 25: 540-547.
- Allen, S. W.; Prasse, K. W.; Mahaffey, E. A. 1986.** Cytologic differentiation of benign from malignant canine mammary tumor. *Veterinary Pathology*, 23: 649-655.
- Alonso, D.; Gomez, D. 1999.** Cancer mamario y colesterol. *Ciencia Hoy*, 54: 42-46.
- Baselga, J; Gianni, L; Geyer, C; Perez, E. A; Riva, A; Jackisch, C. 2004.** Future options with trastuzumab for primary systemic and adjuvant therapy. *Seminars of Oncology*, 31 (Suppl 10): 51-57.
- Battistacci, M; Calandra, M. L. 1974.** Quantitative measurement of metabolites of the tryptophane-niacin pathway in healthy bitches and those affected with mammary dysplasia and neoplasia. *Nuova Veterinaria*, 50: 246-252.
- Bird, C.; DeInnocentes, P.; Lynn, K. 2002.** Focused Expression Profiling of Cyclin and Cyclin-Dependent Kinase Integration Complex Components and Regulators in a Spontaneous Model of Canine Mammary Cancer. In: Modiano J. F. (Ed.) *International Veterinary Information Service*, Ithaca NY ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)) P0410.0902.
- Blood, C. H.; Zetter, B. R. 1990.** Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Acta Biochemistry Biophysics*, 1032: 89-93
- Bojrab, M. J.; Birchard, S. J.; Tomlinson, (h) J. L. 1993.** Técnicas actuales en cirugía de pequeños animales. 3ra ed. Intermedica. Buenos Aires, Argentina. 447-452.
- Brodey, R. S.; Fidler, I. J.; Howson, A. E. 1966.** The relationship of estrous irregularity, pseudopregnancy and pregnancy to the development of canine mammary neoplasms. *Journal American Veterinary Medical Association*, 149: 1047-1049.
- Brodey, R. S.; Goldschmidt, M. A.; Roszel, J. R. 1983.** Canine mammary gland neoplasms. *Journal of America Animal Hospital Association*, 19: 61-90.
- Brunetti, B, Sarli, G, Preziosi, R, Leprotti, S, Benazzi, C. 2003.** E-cadherin expression in canine mammary carcinomas with regional lymph node metastases. *Journal Veterinary Medical Association Physiology Pathology Clinical Medical*, 50(10): 496-500.
- Busch, U.; Rudolph, R. 1995.** Mammary carcinoma of the female dog: clinical relevance of the immunohistochemical demonstration of micrometastases in the regional lymph nodes. *Tierarztl Prax*, 23(3): 280-286.
- Casciato, D.; Lowitz, B. 2001.** *Oncología clínica*. 4ta ed. Marban (Ed). Madrid. España. 3-28.
- Chui, X.; Egami, H.; Yamashita, J.; Kurizaki, T.; Ohmachi, H.; Yamamoto, S.; Ogawa, M. 1996.** Immunohistochemical expression of c-kit proto-oncogen product in human malignant and non-malignant breast tissues. *British Journal of Cancer*, 73: 1233-1236.
- Clark, J. H. 1994.** Mechanism of action of steroid hormones and antagonists. En: Goldzierher, JW Fotherby, K (ed). *Pharmacology of the contraceptive steroids*. Raven Press, NY. 27-40.
- Claver J. A.; Sanchez, A.; Sicardi, A. J.; Lawzewitsch, I. 1985.** *Lecciones de histología veterinaria*. Vol. 7. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. 59-76.
- Corrada, Y.; Gobello, C. 2001.** Acromegalia del diestro en la perra. *Analecta Veterinaria*. Vol 21 N° 1: 57-62.



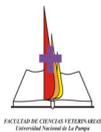
- Corrada, Y.; Castex, G.; de la Sota, L.; Goya, R.; Gobello, C. 2002.** Growth hormone serum concentrations in bitches with spontaneous mammary tumors before and after mastectomy. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 19: 37-42.
- D'Arville, C. N.; Pierrepont, C. G. 1979.** The demonstration of oestrogen, androgen and progesterone receptors in the cytosol fraction of canine mammary tumors. *European Journal of Cancer*, 875-883.
- Dahme, E.; Weiss E., 1989.** Anatomía Patológica Especial Veterinaria. Acribia. Zaragoza. España, 289-291.
- Donnay, I.; Devleeschower, N.; Wouters-Ballman, P.; Leclero, G.; Verstegen, J. 1996.** Relationship between receptors for epidermal growth factor and steroid hormones in normal, dysplastic and neoplastic canine mammary tissues. *Research in Veterinary Science*, 60: 251-254.
- Donnay, I.; Rauis, J.; Verstegen, J. 1994.** Influence des antécédents hormonaux sur l'apparition clinique des tumeurs mammaires chez la chienne. Étude épidémiologique. *Annal Medicine Veterinaire*, 138: 109-117.
- Ettinger, S. J.; Feldman, E. C. 1997.** Tratado de medicina interna veterinaria. 4ta ed. Intermedica, 2053-2056.
- Gama, A, Paredes, J, Albergaria, A, Gartner, F, Schmitt, F. 2004.** P-cadherin expression in canine mammary tissues. *Journal Comparative Pathology*, 130(1): 13-20.
- Gilbertson, S. R.; Kurzman, I. D.; Zachrau, R. E; Hurvitz, A. I; Black, M. M. 1983.** Canine mammary epithelial neoplasm: Biologic implications of morphologic characteristics assess in 232 dogs. *Veterinary Pathology*, 20: 127.
- Gobello, C.; Corrada, Y. 2001.** Canine mammary tumors: An endocrine clinical approach. *Comp Cont Educ Pract* 23: 705-710.
- Gobello, C.; de la Sota, R. L.; Goya, R. G. 2001.** A review on canine pseudocyesis. *Reproduction in Domestic Animals*, 36: 283-288.
- Golombek, D. 2002.** Cronobiología Humana. Ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad. Universidad Nacional de Quilmes. Buenos Aires. Argentina.
- Gomez, D.; Alonso, D. 1998.** Introducción a la Oncología Molecular. Universidad Nacional de Quilmes. Buenos Aires. Argentina. 113-134.
- Gottardis, M. M.; Robison, S. P.; Satyaaswaroop, P. G.; Jordan, V. C. 1988.** Contrasting actions of tamoxifen on endometrial breast tumor growth in athymic mouse. *Cancer Research*, 48: 218-815.
- Graham, J.; Myers, R. 1999.** The prognostic significance of angiogenesis in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 13(5): 416-418.
- Griffiths, G. L.; Lumsden, J. H.; Valli, V. E. O. 1984.** Fine needle aspiration cytologic and histologic correlation in canine tumors. *Veterinary Clinical Pathology*, 13: 13-17.
- Hahn, K. A. 2001.** Practical indications and contraindications for tamoxifen. *Proceeding: The North American Conference. Small Animal and Exotics. Orlando, Florida.* 665-666.
- Hampe, J. F.; Misdorp, W. 1974.** Tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bull WHO*, 50: 111-133.
- Harvey, H. J.; Gilbertson, S. R. 1977.** Canine mammary gland tumors. *Veterinary Clinic of North America*, 7: 213-219.
- Hellmén, E. 1993.** Canine mammary tumour cell lines established in vitro. *Journal Reproduction Fertility*, 47: 489-499.
- Hirayama, K.; Yokota, H.; Onai, R.; Kobayashi, T.; Kumata, T.; Kihara, K.; Okamoto, M.; Sako, T.; Nakade, T.; Izumisawa, Y.; Taniyama, H. 2002.** Detection of matrix metalloproteinases in canine mammary tumours: analysis by



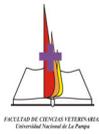
- immunohistochemistry and zymography. *Journal Comparative Pathology*, 127(4): 249-256.
- Johnston, S. D. 1980.** False pregnancy in the bitch. En: Morrow DA, ed. *Current Veterinary Theriogenology*. Philadelphia: W.B. Saunders. 623-624.
- Jordan, V. C. 1998.** Estrogenos de diseño. *Investigación y ciencia*. 16-24.
- Jubb, K. W.; Kennedy, P. C. 1970.** *Pathology of Domestic Animals*. 2nd Ed. Academic Press. Inc New York. USA. 344-348.
- Kazanietz, M. 2000.** Farmacología Molecular Receptores, transducción de señales y activación de genes. 45-66: 211-230.
- Kitchell, G. N. 1995.** Mammary Tumors. In: Kirk's *Current Veterinary Therapy XII*. Small Animal Practice. Saunders, WB. Philadelphia. 1098- 1103.
- Koenig, A.; Bianco, S.; Fosmire, S.; Wojcieszyn, J.; Modiano, J. 2002.** Expression and significance of p53, rb, p21/waf-1, p16/ink-4a, and PTEN tumor suppressors in canine melanoma: *Veterinary Pathology*, 39(4): 458-72.
- Kubo, K.; Matsuyama, S.; Katayama, K.; Tsutsumi, C.; Yonezawa, K.; Shimada, T.; Kotani, T.; Sakuma, S.; Ohashi, F.; Takamori, Y. 1998.** Frequent expression of the c-kit proto-oncogene in canine malignant mammary tumor. *Journal Veterinary Medical Science*, 60: 1335-1340.
- Kurzman, I. D.; Gilbertson, S. R. 1986.** Prognostic factors in canine mammary tumors. *Seminars Veterinary Medical Surgery*, 1: 25-31.
- Loar, A. S. 1989.** Tumors of the genital tract and mammary gland. En Ettinger SJ (ed): *Text Book of Veterinary Internal Medicine*. Vol. II 3<sup>rd</sup> ed. WB Saunders. Philadelphia. 1814-1925
- Lodish, H., Berck, A., Zipursky, S L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. 2002.** *Biología celular y molecular*. Ed. Panamericana. Buenos Aires. Argentina. 968-1002.
- Matsuyama, S.; Nakamura, M.; Yonezawa, K.; Shimada, T.; Oashi, F.; Takamori, Y.; Kubo, K. 2001.** Expresión Patterns of the erbB Subfamily mRNA in Canine Benign and Malign Mammary Tumors. *Journal Veterinary Medical Science*, 63(9): 949-954.
- Mc Ewen E. G. Withrow S. J. 1996.** Tumors of the mammary glands. En: Withrow S. J, Mc Ewen E. G. Eds, *Small Animal Clinical Oncology* 2<sup>nd</sup> Ed, WB Saunders, Philadelphia. 356-372.
- Mac Ewen, E. G; Rosenthal, R. C. 1992.** Aproximación de los pacientes cancerosos. En: Ettinger S. J. *Tratado de medicina interna veterinaria*. Intermédica Buenos Aires, Vol 1: 566-568.
- Mareel, M, Leroy, A. 2003.** Clinical, Cellular, and Molecular Aspects of Cancer Invasion. *Physiological Reviews*, Vol. 83, No. 2: 337-376.
- Mc Guire, W. L. 1980.** An update on oestrogen and progesterone receptors for primary and advanced breast cancer. In: Iacobelli (eds). *Hormones and Cancer*, Raven press, New York. 337-344.
- Mc Leod, D. A.; Thrall, D. A. 1989.** The combination of surgery and radiation in the treatment of cancer. *Veterinary Surgery*, 18 (1): 1-6.
- Misdorp, W, Else, R. W., Hellmén, E, Lipscomb, T. P. 1990.** Histological classification of mammary tumor of the dog and the cat. Vol VII. Armed Forces Institute of Pathology & American Registry of Pathology & the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology, Washington DC, USA. 58-59.
- Misdorp, W. 1988.** Canine Mammary Tumours: protective effect of late ovariectomy and stimulating effect of progestins. *Veterinary Quarterly*, 10: 26-33.



- Mol, J. A.; Selman, P. J.; Sprang, E. P. M. 1997.** The role of progestins, insuline-like growth factor (IGF) and IGF-binding proteins in the normal and neoplastic mammary gland of the bitch: a review. *Journal Reproduction Fertility*, 51: 339-344.
- Morris, J. S.; Dabson, J. M.; Bostock, D. E. 1993.** Use of tamoxifen in control of canine mammary neoplasia. *Veterinary Record*, 133: 539-542.
- Murakami Y.; Tateyama S.; Rungsipipat A.; Uchida K.; Yamaguchi R. 2000.** Immunohistochemical analysis of cyclin A, cyclin D1 and P53 in mammary tumors, squamous cell carcinomas and basal cell tumors of dogs and cats. *Journal Veterinary Medical Science*, 62(7): 743-50.
- Murrel, T. G. C. 1991.** Epidemiological and biochemical support for a theory on the cause and prevention of breast cancer. *Medical Hypotheses* 36: 389-396.
- Murua Escobar, H.; Becker, K.; Bullerdiek, J.; Nolte, I. 2001.** The canine ERBB2 gene maps to a chromosome region frequently affected by aberrations in tumors of the dog (*Canis familiaris*). *Cytogenet Cell Genetics*, 94(3-4): 194-195.
- Natali, P.; Nicotra, M.; Sures, L.; Santero, E.; Bigotti, A.; Ullrich, A. 1992.** Expression of c-kit receptor in normal and transformed human non-lymphoid tissues. *Cancer Research*, 52: 6139-6143.
- Lee, C. H.; Kweon, K. 2002.** Mutations of p53 tumor suppressor gene in spontaneous canine mammary tumors. *Journal Veterinary Science*, 3(4): 321-325.
- Nelson, R. W.; Couto, C. G. 1995.** *Pilares de Medicina Interna en Animales Pequeños*. Intermedica. Buenos Aires. Argentina. 622-624.
- Nerurkar, V. R.; Sehadri, R.; Mulherkar, R.; Ishward, C. S.; Lalitha, V. S.; Naik, S. N. 1987.** Receptors for epidermal growth factor and estradiol in canine mammary tumors. *International Journal Cancer*, 40: 230-232.
- Nieto, A.; Perez-Alenza, M. D.; Del Castillo, N.; Tabanera, E.; Castano, M.; Pena, L. 2003.** BRCA1 expression in canine mammary dysplasias and tumours: relationship with prognostic variables. *Journal Comparative Pathology*, 128(4): 260-268.
- Oka, H, Shiozaki, H, Kobayashi, K, Inoue, M, Tahara, H, Kobayashi, T, Takatsuka, Y, Matsuyoshi, N, Hirano, S, Takeichi, M, and Mori T. 1993.** Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Research*, 53: 1696-1701.
- Okada, H.; Nishuma, Y.; Yoshino, T.; Grone, A.; Capen, C. C.; Rosol, T. J. 1997.** Immunohistochemical localization of parathyroid hormone related protein in canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 34: 356-359.
- Owen, L. N. 1966.** Mammary neoplasia in the dog and cat. III. Prognosis and treatment of mammary tumours in the bitch. *Journal Small Animal Practice*, 7: 703-710.
- Papparella, S.; Restucci, B.; Paciello, O.; Maiolino, P. 2002.** Expression of matrix metalloprotease-2 (MMP-2) and the activator membrane type 1 (MT1-MMP) in canine mammary carcinomas. *Journal Comparative Pathology*; 126(4): 271-276.
- Parodi, A. L.; Mialot, J. P.; Martin, P. M. 1984.** Canine and feline mammary cancers as animal models for hormone-dependent human breast tumors: relationships between steroid receptor profiles and survival rates. *Progress in Cancer Research and Therapy*, 31: 357-365.
- Perez Alenza, M. D.; Peña, L.; Del Castillo, N.; Nieto, A. I. 2000.** Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *Journal Small Animal Practice*, 41: 287-291.
- Perez, C. A.; Brady, L. W. 1987.** Introduction. Perez, C. A and Brady L. W. (Eds): *Principles and Practice of Radiation Oncology*. Philadelphia, JB Lippincott. 148-155.



- Restucci, B.; Borzacchiello, G; Maiolino, P; Martano, M; Paciello, O; Papparella, S. 2004.** Expression of vascular endothelial growth factor receptor Flk-1 in canine mammary tumours. *Journal Comparative Pathology*, 130(2-3): 99-104.
- Restucci B, Papparella S, De Vico G, Maiolino P. 1997.** E cadherin expression in normal and neoplastic canine mammary gland. *Journal Comparative Pathology*, 116(2): 191-202.
- Restucci, B.; Papparella, S.; Maiolino, P.; De Vico, G. 2002.** Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 39(4): 488-93.
- Rocheford, H. 1992.** Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer. *Acta Oncológica* 31, 125-132.
- Rooney, M. T.; Henry, J. B. 1993.** Marcadores moleculares de las neoplasias malignas. *Diagnostico y tratamiento clínicos*. 9 ed. Masson-salva. Medicina. Barcelona. 293-315.
- Rosenberg, S. A. 2001.** Principles of cancer management: Biological therapy. En DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (Eds): *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (6Ed). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 307-333.
- Rutteman, G. R. 1990.** Hormones and mammary tumour disease in the female dog. An update. *In Vivo*. 4: 33-40.
- Rutteman, G. R. 1995.** Mammary Tumors in the Dog. En: *Kirk's Current Veterinary Therapy XII. Small Animal Practice*. Saunders, WB. Philadelphia. 518- 522.
- Rutteman, G. R; Bevers, M. M.; Misdorp, W.; Van den Brom, W. E. 1989.** Anterior pituitary function in female dogs with mammary tumors II: Prolactin. *Anticancer Research*. 9: 241-246.
- Rutteman, G. R; Misdorp, W.; Blankenstein, N. M. A; Van Den Brom, W. E. 1988.** Oestrogen and progestin receptors in mammary tissue of the female dog: different receptor profile in non-malignant and malignant states. *Breast Cancer Research*, 58: 594-599.
- Rutteman, G. R.; Misdorp, W.; Van den Brom, W. E.; Rijnberk, A. 1989.** Anterior pituitary function in female dogs with mammary tumors I: Growth hormone. *Anticancer Research*, 9: 235-240.
- Sarli, G; Preziosi, R; De Tolla, L; Brunetti, B; Benazzi, C. 2004.** E-cadherin immunoreactivity in canine mammary tumors. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, 16(6): 542-547.
- Selman, P; Mol, J; Rutteman, G; Rijnberk, A. 1994.** Progestin treatment in the dog. I. Effects on growth hormone, insulin-like growth factor I and glucose homeostasis. *European Journal Endocrinology*, 131: 413-421.
- Selman, P.; Mol, J.; Rutteman, G.; Rijnberk, A. 1994.** Progestin treatment in the dog. II. Effects on the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *European Journal Endocrinology*, 131(4): 422-430. Department of Clinical Sciences of Companion Animals, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, The Netherlands.
- Selman, P.; Mol, J.; Rutteman, G.; van Garderen, E.; Rijnberk, A. 1994.** Progestin-induced growth hormone excess in the dog originates in the mammary gland. *Endocrinology*, 134(1): 287-292.
- Sfacteria, A.; Bertani, C.; Costantino, G.; Del Bue, M.; Paiardini, M.; Cervasi, B.; Piedimonte, A.; De Vico, G. 2003.** Cyclin D1 expression in pre-cancerous and cancerous lesions of the canine mammary gland. *Journal Comparative Pathology*, 128(4): 245-251.
- Shofer, E. S. 1989.** Histopathologic and dietary prognosis factors for canine mammary carcinoma. *Breast Cancer Research Treatment*, 13(1): 49-60.



- Sonnenschein, E. G.; Glickman, L. T.; Goldschmidt, M. H.; McKee, L. J. 1991.** Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study. *Journal American Epidemiology*, 133: 694-703.
- Sorenmo, K. U.; Shofer, F. S.; Goldschmidt, M. H. 2000.** Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. *Journal Veterinary Internal Medicine*, 14: 266-270.
- Theilen, G. H., Madewell B. R. 1987.** *Veterinary Cancer Medicine*. 2nd. Ed. Gordon Theilen y Bruce Madewell. Philadelphia USA 392-407.
- Tsuchida, S.; Ikemoto, S.; Tagawa, M. 2001.** Microsatellite polymorphism in inton 14 of the canine BRCA1 gene. *Journal Veterinary Medical Science*, 63(4): 479-481.
- Van Garderbiblioen, E., De Wit, M.; Voorhout, W. F.; Rutteman, G. R.; Mol, J. A.; Nederbragt, H.; Misdorp, W. 1997.** Expression of growth hormone in canine mammary tissue and mammary tumors: evidence for a potential autocrine/paracrine stimulatory loop. *Journal American Pathology*, 150: 1037-1047.
- Veldhoen, N.; Watterson, J.; Brash, M.; Milner, J. 1999.** Identification of tumour-associated and germ line p53 mutations in canine mammary cancer. *British Journal Cancer*, 81(3): 409-15.
- Wakui, S.; Muto, T.; Yokoo, K.; Yokoo, R.; Takahashi, H.; Masaoka, T.; Hano, H.; Furusato, M. 2001.** Prognostic status of p53 gene mutation in canine mammary carcinoma. *Anticancer Research*, 21(1B): 611-6.
- Weir, E. C.; Burtis, W. J.; Morris, C. A. Insogna, K. L. 1998.** Isolation of a 16.000-dalton parathyroid hormone-like protein from two animal tumors causing hormonal hypercalcemia of malignancy. *Endocrinology*, 123(6): 2744-2751.
- Weiss, L. 1990.** Metastatic inefficiency. *Advance Cancer Research*, 54: 159-211.
- Wilkinson, G. T. 1971.** The treatment of mammary tumors in the bitch and a comparison with the cat. *Veterinary Record*, 29: 13-19.
- Withrow, S. J. 1975.** Surgical management of canine mammary tumors. *Veterinary Clinic North America*, 5(3): 495-506.
- Yokota, H.; Kumata, T.; Taketaba S.; Kobayashi, T.; Moue, H.; Taniyama, H.; Hirayama, K.; Kagawa, Y.; Itoh, N.; Fujita, O.; Nakade, T.; Yuasa, A. 2001.** High expression of 92 kDa type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) in canine mammary adenocarcinoma. *Biochemistry Biophysics Acta* 7, 1568(1): 7-12.