



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título

**DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS**

---

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE UN ANTIPROGESTÁGENO EN  
LA GLÁNDULA MAMARIA Y EN LA SOBREVIDA DE PACIENTES  
CANINOS CON NEOPLASIAS MAMARIAS**

---

**AUTOR: Esp. M.V. VAQUERO, Pablo Guillermo**

**DIRECTORA: Dra. CORRADA, Yanina Alejandra**

**DIRECTORA: Dra. TORRES, Perla Araceli**

**LUGAR DE TRABAJO: Facultad De Ciencias Veterinarias, Universidad  
Nacional De La Pampa**

**MIEMBROS DEL JURADO: Dra. DIESSLER, Mónica**

Dr. MARTÍN, Carlos

Dr. HERMO, Guillermo

**AÑO: 2023**

*Dedico este trabajo*

*A Raquel*

*A Máximo y María Eugenia*

*A la Memoria de mi padre Padre*

*A la memoria de mi madre*

*Gracias:*

*A mis directoras, las Dras. Perla Torres y Yanina Corrada por su guía, ánimo, disposición y respaldo. Por la pertinencia de sus consejos, aportes y sugerencias.*

*A la Universidad Nacional de Río Negro, Facultad de Ciencias Veterinarias, por financiar parte del trabajo.*

*A todo el personal de la Cátedra de Histología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa, que hizo posible gran parte de este trabajo, especialmente a los Médicos Veterinarios Daniel Lacolla, Mónica García y la Dra. Carolina Vélez que colaboraron con la realización del procesamiento de las muestras histológicas.*

*Al Servicio de Patología de la Universidad Nacional de La Plata y en especial a la Dra. Adriana Massone y su equipo que en tiempos muy difíciles de pandemia hizo posible la realización de tareas de laboratorio y la toma de imágenes que forman parte de esta tesis.*

*A la Dra. Laura Moiragui por la clasificación y protocolización de las muestras proveniente de tumores.*

*A los integrantes de la Catedra de Técnica y Patología Quirúrgica en especial al Dr. Santiago Andrés Audisio por mostrarme y compartir el camino a la investigación.*

*A los integrantes de la Cátedra de Clínica de Pequeños Animales y Hospital*

*Escuela de la UNLPam por acompañarme en este proceso.*

*Al Dr Jorge Blando por los consejos y ayuda en este trabajo.*

*Agradezco especialmente a mi familia, que es mi sostén, por su colaboración y tolerancia ya que la mayor parte de este trabajo fue realizado con recursos y tiempo que debió ser de ellos.*

### Citas bibliográficas de publicaciones parciales

- Torres P, **Vaquero P**, Audisio S, Lacolla D, Sagara, D, García M, Brizotto C, Fernandez A. *Efectos de un antiprogestágeno en la sobrevivida de hembras caninas con neoplasias mamarias*. I Jornada de Investigación Conectando Investigadores de la Sede Alto Valle y Valle Medio, 16 de septiembre de 2016.
- **Vaquero P**, Torres P, Audisio S, Lacolla D, García M, Moiragui L, Verna E, Meder A, Lattanzi D, Miguel C, Mengelle, P. *Avances del estudio de tratamiento de neoplasias mamarias malignas en perras ovariectomizadas en estadios iniciales con aglepristone*. X Jornadas de Ciencia y Técnica: III Jornada Interinstitucional. Facultad de Ciencias Veterinarias- Facultad de Ingeniería; - 1ª ed. - Santa Rosa: Universidad Nacional de La Pampa, 2017. Resumen. Pág. 92. ISBN 978-950-863-314-9.
- **Vaquero P**, García M, Lacolla D, Velez C, Audisio S, Brizotto B, Corrada Y, Torres P. *Estudio inmunohistoquímico del efecto del antagonista de progesterona en glándulas mamarias en caninos*. XII Jornadas y Reunión Anual de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria, 7 y 8 de noviembre de 2019. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. 2020. eISSN 1852-771X.

**ÍNDICE DE CONTENIDOS**

<b>RESUMEN</b>	1
<b>SUMMARY</b>	3
<b>INTRODUCCIÓN</b>	5
<b>OBJETIVOS</b>	15
<b>HIPÓTESIS MÁS RELEVANTES</b>	16
<b>ESTUDIO EXPERIMENTAL I</b>	
<i>Estudio del efecto del antagonista de progesterona, el aglepristone, en tejidos mamarios de caninos</i>	
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	17
<b>RESULTADOS</b>	21
<b>ESTUDIO EXPERIMENTAL II</b>	
<i>Efectos de un antiprogéstágeno en la sobrevida de hembras caninas con neoplasias mamarias</i>	
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	28
<b>RESULTADOS</b>	34
<b>DISCUSIÓN</b>	40
<b>CONCLUSIONES</b>	50

<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	51
---------------------	----

## **ANEXO I**

<i>Protocolo anestésico</i>	67
-----------------------------	----

## **ANEXO II**

<i>Determinación por inmunohistoquímica de receptores de progesterona y Antígeno Ki-67</i>	68
--	----

**Abreviaturas**

AGLE: aglepristone

ARN: ácido ribonucleico

ARNr: ácido ribonucleico ribosomal

$\beta$ 3HSD:  $\beta$ 3-hidroxiesteroide isomerasa.

C-erbB-2: protooncogen del erbB-2

COX-2: ciclooxigenasa 2DAB: diaminobenzidina

DE: desvío estándar

Ev: endovenoso

EE.UU.: Estados Unidos De América

17-E: 17 estradiol

GH: hormona de crecimiento

IGF-1: factor de crecimiento semejante a la insulina 1

IHQ: inmunohistoquímica

IM: intramuscular

IP: índice de proliferación

Ki67: proteína Ki 67

MISS: mecanismo de acción no genómico

$\mu$ m: micrómetro

$\mu$ g: microgramos

nmol: nanomol

OMS: Organización Mundial de la Salud

p: probabilidad

Pág: página.



PBS: buffer fosfato salino.

PGFM: 13,14-dihidro-15-keto prostaglandina F<sub>2α</sub>

pH: potencial de hidrógeno

PLA: placebo

PO: por vía oral

RA: receptor de andrógenos

RE: receptor de estrógenos

Re<sub>α</sub>: receptor de estrógenos alfa

Re<sub>β</sub>: receptor de estrógenos beta

RFCE: receptor de factor de crecimiento epitelial

RG: receptor de glucocorticoides

RP: receptor de progesterona

RS: receptores de hormonas esteroideas

RPA: receptor de progesterona A.

RPB: receptor de progesterona B

RPRL: receptor de prolactina

SC: subcutáneo

SG: sobrevida general

SLE: sobrevida libre de enfermedad

StAR: proteína reguladora esteroideogénica

TGM: tumor de glándula mamaria

TNM: tumor, nódulo, metástasis

Vs: versus

VEGFR-2: factor de crecimiento endotelial vascular 2

vol: volumen

## **RESUMEN**

### **EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE UN ANTIPROGESTÁGENO EN LA GLÁNDULA MAMARIA Y EN LA SOBREVIVENCIA DE PACIENTES CANINOS CON NEOPLASIAS MAMARIAS**

La progesterona desempeña un papel importante en el desarrollo de las glándulas mamarias del canino; los efectos son mediados por receptores específicos, y la exposición prolongada de altas concentraciones durante el ciclo sexual en la hembra canina produce alta proliferación celular. En este estudio se evaluó el efecto del antagonista del receptor de progesterona aglepristone (AGLE) sobre el tejido mamario de 20 hembras caninas, sin signos clínicos de enfermedad, en fase luteal. Los animales fueron separados en grupos AGLE (n=10) y PLA (n= 10). Utilizando inmunohistoquímica (IHQ) se cuantificó la expresión de receptores de progesterona (RP) y las células en proliferación utilizando el biomarcador Ki67. Se evaluó también el efecto del tratamiento del antagonista del receptor de progesterona AGLE en el período libre de enfermedad (SLE) y la supervivencia general (SG) de 20 perras con carcinomas mamarios en estadio I, II y III que fueron distribuidas aleatoriamente en dos grupos, AGLE y PLA. Las pacientes recibieron una dosis de 10 mg/kg vía subcutánea de AGLE o PLA inmediatamente después de la cirugía citorreductiva, repitiendo la misma dosis a los 15, 30, 45 y 60 días y posteriormente 1 dosis de 10 mg/kg vía subcutánea luego de cada celo durante 12 meses. Las muestras neoplásicas fueron clasificadas y se realizó el seguimiento clínico durante 900 días. En el tejido mamario normal se observó una disminución significativa en la expresión de los RP y del Ki67 del grupo tratado comparado con

el grupo control. El tratamiento con aglepristone aumentó la SLEy SG de animales con tumores. Aunque se necesitan más estudios, la evidencia actual señala que el tratamiento con aglepristone es útil como coadyuvante para el tratamiento de los tumores mamarios caninos grado I, II y III.

**Palabras claves:** tumor mamario, receptor de progesterona, aglepristone, Ki 67.

## **SUMMARY**

### **EVALUATION OF THE EFFECTS OF AGLEPRISTONE ON MAMMARY GLAND AND ON SURVIVAL OF CANINE PATIENTS WITH MAMMARY TUMORS**

Progesterone plays an important role in the development of the mammary glands in the canine. The effects of the progesterone are mediated by specific receptors, and prolonged exposure of high concentrations during the sexual cycle in the canine female can increase cell proliferation. In this study, we evaluated the effect of the aglepristone, a progesterone receptor antagonist, in the mammary tissue of 20 canine females without clinical signs of tumors of the mammary gland (TMG), in luteal phase. Animals were separated into two groups either receiving aglepristone (AGLE; n = 10) or placebo (control group, PLA; n = 10). Using immunohistochemistry (IHC), we quantified the expression of the progesterone receptor (PR) and cell proliferation using Ki67 biomarker. In addition, we measured the effect of the treatment in correlation with disease-free survival (DSF) and overall survival (OS) of 20 canine females. Tumors were sub-classified into stage I, II and III mammary carcinomas, and then animals were distributed randomly between the two groups, AGLE and PLA. The patients received a dose of 10 mg/kg subcutaneously of either aglepristone or placebo immediately after cytoreductive surgery was performed. The same dose was repeated at 15, 30, 45 and 60 days, and then 1 dose after each heat during 12 months. Neoplasms were classified and clinical follow-up was performed for 900 days. In normal mammary tissue, a significant decrease in the expression of the PR and Ki67 was observed in the

AGLE treated group compared to the placebo control. Overall, aglepristone treatment increased the DFS and OS of the animals after surgery. Although additional studies are needed, current evidence indicates that aglepristone adjunct treatment shows measurable benefits in canine patients diagnosed with mammary tumors grade I, II and III.

**Key words:** mammary tumor, progesterone receptor, aglepristone, Ki 67.

## INTRODUCCIÓN

### *Glándula mamaria*

La glándula mamaria es un órgano que se desarrolla a partir de dos hojas embrionarias. El ectodermo, que origina las porciones secretoras, conductos y el mesodermo somático que se diferencia en tejido conectivo y adiposo (Camargo y Olivera, 2007).

La unidad ducto-alveolar de la glándula mamaria está constituida por células mioepiteliales que forman la capa basal de conductos y alveolos, células epiteliales ductales forman los conductos y células epiteliales alveolares. Es probable que este conjunto celular se genere a través de células madres que tienen la capacidad de autorenovación para estos tres linajes celulares (Liu, 2005 y col.).

Los alvéolos, conductos y estroma forman el lobulillo y estos se agrupan en lóbulos. El sistema de conductos comienza con un conducto intralobulillar que drena en el conducto lobular, este conducto drena en el conducto galactóforo lobular, el cual es el conducto excretor primario para cada lóbulo (Delman; 1993). Cada mama tiene entre 7 y 16 aberturas de conductos, cada conducto eventualmente forma un lóbulo en la glándula adulta y actúa como una unidad funcional independiente dentro de la glándula (Sorenmo y col., 2011).

Las hormonas esteroideas desempeñan un papel importante en el desarrollo de los 5 pares de glándulas mamarias que posee la especie canina, dispuestos en cadenas paralelas (ocasionalmente 4 o 6 pares), siendo esenciales durante la etapa embrionaria, la pubertad y durante la actividad ovárica cíclica. Los niveles séricos de la progesterona se elevan durante el diestro, en fase lútea del ciclo estral y

durante toda la gestación canina (Hennighausen y Robinson, 2005).

La fase lútea de las perras dura de 60 a 90 días cuando los valores séricos de progesterona pueden alcanzar hasta 80 µg/ml (Concannon, 1983); en este periodo hay un crecimiento complementario de los conductos y un notable desarrollo lóbulo-alveolar por acción de la progesterona del mismo modo que se produce durante la gestación (Prieto Ocejo, 1995).

En estudios realizados en humanos observaron que después de cada lactancia la glándula mamaria involuciona. Como parte de este cambio, la mayor parte de las células alveolares mueren, para ser sustituidas, mediante la estimulación de factores de crecimiento sobre las poblaciones de células madre y progenitoras de las glándulas mamarias normales en la siguiente lactancia (Hennighausen y Robinson, 2005; Schramek, 2010).

La progesterona actúa en el epitelio mamario sobre receptores de alta afinidad, específica y saturable (Clark y Mani, 1994) su síntesis depende de los estrógenos (Jacobsen y Horwitz, 2012). Se ha identificado el papel de la progesterona en el control de la cantidad y la función de las poblaciones de células madre y progenitoras en las glándulas mamarias normales y neoplásicas (Axlund y Sartorius, 2012).

Los receptores de estrógenos (RE) y receptores de progesterona (RP) pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares, los subtipos de RE (RE $\alpha$ , RE $\beta$ ) provienen de diferentes genes, no así los de progesterona (RPA, RPB) que lo hacen de un solo gen (Aupperlee y col., 2005).

En la mama normal, la proporción de RE $\alpha$ /RE $\beta$  y RPA/RPB varía según el estado hormonal y el periodo del desarrollo. En estudios realizado en ratones la isoforma



A se expresó en la glándula mamaria de hembras vírgenes inmaduras adultas, mientras que, en la preñez, se incrementó la expresión de la isoforma B y la A disminuyó (Aupperlee y col., 2005).

La ubicación de RE $\alpha$  y RP fue evidenciada por inmunohistoquímica en tejido conectivo, epitelio alveolar y de conductos en la glándula mamaria normal de perra (Millanta y col., 2005) y se observó una variación en la localización e intensidad de la inmunomarcación de los receptores en los compartimentos en distintos estadios del ciclo reproductivo en la perra. Esto sugiere que los tejidos epiteliales y conectivo son blanco de acción de las hormonas esteroideas ováricas (Della Cella Pérez, 2014). Otros autores evidenciaron la inmunomarcación en el núcleo de las células epiteliales y mioepiteliales, excepto en las del estroma, con intensidad homogénea en las células de un mismo lóbulo, pero no así de un lóbulo a otro de la misma muestra (Illera y col., 2006).

Se ha demostrado que Ki 67 es una proteína nuclear no histónica heterodimérica, que contribuye a la condensación de cromosomas, y está involucrada en la fragmentación de la envoltura nuclear. La proteína Ki 67 no se expresa en células inactivas o en reposo en la fase celular G0 (Colozza y col., 2005) se expresa exclusivamente en células en proliferación (Gerdes y col., 1983) desde la fase celular G1 tardío, con acción en los primeros procesos de la síntesis de ARNr y con un pico de concentración en la mitosis que cesa inmediatamente después por su corta vida media (Bullwinkel, 2006). Los anticuerpos que marcan la expresión de esta proteína son utilizados con valor pronóstico en el cáncer humano (Khan, 2013).

El aglepristone (RU534) es un antiprogéstágeno aprobado para uso veterinario

(Galac y col., 2004) que se une al RP con una alta afinidad al receptor específico y con menor afinidad al receptor de glucocorticoide (RG) (Polisca y col., 2010). Se ha estudiado el efecto del aglepristone en la glándula mamaria normal de hembras caninas en fase lútea (progesterona sérica mayor a 2 µg/ml) en un número pequeño de animales y se observó que disminuyó tanto la expresión de los RP como la tasa de proliferación expresada por el marcador nuclear Ki-67 (Torres , 2009).

### ***Neoplasias mamarias***

La incidencia de tumores de glándulas mamarias (TGM) en las hembras caninas es del 1,5 % al 3,4 % (Moe y col., 2001; Richards y col., 2001). Se presentan, con mayor frecuencia, en perras de edad media a avanzada con una media de  $9,6 \pm 2,8$  años, (Chang y col., 2005; Sorenmo y col., 2009; 2011; Im y col., 2014). Dado que el curso es crónico, al aumentar la longevidad t a m b i é n aumenta el riesgo de padecer cáncer (Cooley y col., 2003; Withrow, 2007; O'neill y col., 2013; Waters y col., 2014).

Sorenmo y col. (2009) reportan que aproximadamente el 70 % de las perras con TGM presentan más de una masa tumoral, si bien pueden afectar a cualquier mama, la mayoría ocurre en las glándulas abdominales caudales e inguinales (Lana y col., 2007; Diessler y col., 2017).

La frecuencia en la presentación de los TGM malignos es discordante, están comprendidos entre un 30 y un 93 % (Dobson y col., 2002; Misdorp, 2002; Sorenmo, 2003; Egenvall. y col., 2005; Merlo y col., 2008).

Cuando las pacientes portadoras de TGM son llevadas a la consulta veterinaria se las estadifica clínicamente tomando en cuenta el tamaño tumoral, el estado de los

linfonódulos regionales y la presencia de metástasis a distancia, denominando a este sistema TNM (tumor, nódulo linfático y metástasis). Existen cinco estadios clínicos, siendo el I el de mejor pronóstico (Owen, 1980).

Los TGM malignos más frecuentes son los carcinomas, de origen epitelial, con menor incidencia los sarcomas, de origen mesenquimático, seguidos por los tumores mixtos malignos (Lana y col., 2007). Los carcinosarcomas y los carcinomas simples anaplásicos tienen mayor riesgo de metástasis que los carcinomas simples tubulares complejos y de células escamosas (Misdorp y col., 2002; Philibert y col., 2003; Diessler, 2009).

A menor diferenciación histológica corresponde mayor actividad angiogénica, proliferativa e invasión vascular, favorecida por la densidad de microvasos y en correspondencia la angiogénesis que se relaciona con el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis a distancia (Sharma y col., 2005).

Existe una fuerte asociación entre las características histológicas como invasión vascular, grado histológico y estado del linfonódulo con el tiempo de supervivencia (Diessler y col., 2017). Se ha postulado que los tumores malignos pueden desarrollarse a partir de tumores benignos preexistentes, como ocurre en el cáncer mamario humano (Sorenmo y col., 2009).

El sitio de metástasis distante más común de tumores mamarios son los pulmones (Misdorp, 2002; Sorenmo y col., 2011); también pueden desarrollarse en los linfonódulos inguinales, sublumbares, esternales, preescapulares, en el hígado y en los huesos (Ginel y col., 2000; Sorenmo, 2003; Muller y Guaguère, 2006; Lana y col., 2007). En un estudio realizado por Egenvall y col. (2005) estimó que el índice

de mortalidad es de un 6 % y la proporción de hembras con recidivas en edades de 6, 8 y 10 años es de 1 %, 6 % y 13 %, respectivamente.

Las metástasis regionales y distantes son frecuentemente RE negativas (Rutteman, y col 1988) mientras que las metástasis óseas se asocian con un porcentaje significativo de tumores con RE positivos/RP negativos (Wei y col., 2008). También es baja la presencia de los receptores RE $\alpha$  en los linfonódulos afectados (Nieto y col. 2000), lo que lleva a la hipótesis de una desviación del mecanismo normal de control celular con patrón autónomo de crecimiento (McEwen, 1996; Rutteman y Misdorp, 1993).

La bibliografía existente sugiere que las perras ovariectomizadas menores de 2,5 años tienen menos riesgos de contraer la TGM (Schneider y col., 1969; Alenza y col., 2000, Richards y col., 2001).

Un reporte, realizado por Beauvai y col. (2012), sugiere que la edad de castración no debería basarse únicamente en la reducción del riesgo de contraer neoplasias mamarias, sino también valorar las consecuencias sistémicas causadas por la disminución de hormonas gonadales como la incontinencia urinaria que presentan algunos pacientes.

Los TGM caninos que expresan RE y RP son más diferenciados y de conducta menos agresiva que aquellos no lo expresan (Geraldés y col., 2000; Nieto, 2000; de Las Mulas y col., 2005; Yang y col., 2006; Chang y col., 2009). Se observó que la inmunoexpresión de RE y RP decrece cuando el tumor incrementa su tamaño (Donnay y col., 1995; Nieto y col., 2000) y algunos trabajos describen son más diferenciados y de conducta menos agresiva que aquellos no lo expresan

(Geraldés y col., 2000; Nieto, 2000; de Las Mulas y col., 2005; Yang y col., 2006; Chang y col., 2009). Se observó que la inmunoexpresión de RE y RP decrece cuando el tumor incrementa su tamaño (Donnay y col., 1995; Nieto y col., 2000) y algunos trabajos describen que la presencia del RE $\alpha$  y RP en el tumor se relaciona con características clínico-patológicas indicadoras de baja malignidad tumoral y de mejor pronóstico (de Las Mulas y col., 2005; Chang y col., 2009).

Algunos estudios indican que existen eventos no genómicos de iniciación en membrana (MISS) (Nemere y col., 2003). Un ejemplo se evidencia en la variante del RE- $\alpha$  36 de señalización iniciada por membrana dependiente de la acción de estrógenos y de antiestrógenos, proporcionando una explicación de la causa en la resistencia y agravamiento de tumores tratados con antiestrógenos (Wang y col., 2006)

Una vez diagnosticada la neoplasia, en caninos, el tratamiento de elección en TGM es la escisión quirúrgica, aunque por sí sola no proporciona cura en los casos de malignidad. No existen evidencias aún de una mayor supervivencia estadísticamente significativa entre grupos de pacientes intervenidos y el grupo de pacientes no intervenidos quirúrgicamente (Chang y col., 2005, Kirsan, 2005; Stratmann y col., 2008; Torres, 2009).

La cirugía escisional como único tratamiento para tumores benignos otorga el doble de supervivencia media frente a carcinomas, sin embargo, solo el 43 % de los pacientes portadores de carcinomas murieron como resultado del tumor (Bostock, 1975). El tratamiento quirúrgico no se recomienda para los estadios clínicos avanzados IV, V y carcinomas inflamatorios, está indicado en las hembras caninas con tumores en estadio I, II o III donde resulta ser un factor mejor pronóstico y

significativo con supervivencia hasta los 2 años posteriores de la cirugía (Peña y col., 2003).

Los recientes desarrollos en el campo de la oncología veterinaria han estimulado a encontrar tratamientos que acompañen las acciones terapéuticas quirúrgicas. El efecto de los medicamentos citostáticos como adyuvantes de la cirugía no ha sido claramente documentado (Karayannopoulou y col., 2001; Simon y col., 2006; Lima, 2014), excepto por el reporte de Lavalle y col. (2012) que expresa resultados positivos sobre el tratamiento con carboplatino e inhibidores de COX-2 y también en tratamientos con mitoxantrona, vincristina y ciclofosfamida en carcinomas inflamatorios (Clemente y col., 2009).

Estudios realizados por Lanari y col., 2009, han asociado los subtipos moleculares predominantes en las neoplasias de mama con la sensibilidad o resistencias a terapias hormonales. Knutson y col. (2017) investigaron las especies fosforiladas de RP que se asociaron al carcinoma luminal invasivo de mama; esta relación clínica podría permitir la indicación para esos pacientes que responderían a los moduladores de PR selectivos que bloquean la fosforilación de PR Ser294, como la onapristona.

También se estudiaron con éxito terapias con mifepristona (RU-486), lonaprisan, aglepristone (Ru-534), Org31710, Org31806, CDB-2914 o telapristona (CDB-4124) en modelos de ratón con tumores mamarios, que expresan RE y RP que se combinan con terapia endocrina de estrógenos, 17- $\beta$ - estradiol, que inducen regresión completa de metástasis pulmonares (Vanzulli y col., 2005).

En medicina humana, fue importante el uso de antiestrógenos en tumores positivos

a RE como tamoxifeno, pero en la perra se desestimó por su efecto estrogénico sobre el aparato genital lo cual limita su aplicación (Morris, 1993; Hoffmann, 2000). Tavaes y col., (2010) propusieron administrar dosis altas de antiestrógenos en perras ovariectomizadas, arrojando escasos cambios atribuibles a la acción del tamoxifeno, con tratamiento de corta duración y aplicado a pacientes con estadios avanzados de la enfermedad (Merlo y col., 2010).

Los antiprogéstágenos son esteroides sintéticos que se unen con gran afinidad a los RP impidiendo que ésta ejerza sus efectos biológicos (Hoffmann y col., 2000; Hagan, 2012). Clínicamente, el aglepristone (RU534) está indicado para el tratamiento conservador de la piómetra (Gobello y col., 2003; Träsch y col., 2003) y el control de la preñez en las perras (Galac y col., 2000), pues actúa como un verdadero antagonista de progesterona en el útero sin decrecer inicialmente las concentraciones séricas de progesterona y aumentando la prolactina sérica, observándose una disminución del intervalo interestral de cinco a tres meses (Concannon, 1990; Linde, 1992).

El aglepristone en dosis de 10 mg/kg posee excreción lenta, el 60 % de la dosis administrada se excreta durante los 10 primeros días, llegando al 80 % durante 24 días posteriores. La excreción es en un 90 % por vía fecal y urinaria en un 7 %, similar a las hormonas esteroides, lo que se explica por la lipofilia y la casi segura existencia de un ciclo enterohepático (Mora Montero, 2010).

La administración de aglepristone en un número reducido en hembras caninas en fase luteal disminuyó en forma significativa la expresión de RP y KI 67 en la mama normal (Torres, 2009). Estos resultados y los avances sobre el papel de los RE y RP

en el desarrollo, proliferación y progresión de las neoplasias mamarias, tanto en humanos como en hembras caninas, indican que la terapia endocrina debería estar orientada hacia las antiprogestinas o alguna combinación con hormonas esteroides (Lanari y col., 2009).

El método estadístico de Kaplan-Meier es especialmente útil en estudios con número pequeño de pacientes porque asume que el evento terminal es independiente para cada paciente y las probabilidades de sobrevivir en un tiempo determinado se calculan por una ley multiplicativa de probabilidades. La característica distintiva que lo hace potente en estos estudios reside en el hecho que la proporción acumulada que sobrevive se calcula para el tiempo de supervivencia individual de cada paciente y no se agrupan los tiempos de supervivencia en intervalos (Ghali y Quan 2001).

A partir de los antecedentes expuestos, postulamos que la terapia adyuvante con aglepristone podría contribuir a disminuir la recidiva de tumores mamarios en hembras caninas. El presente trabajo analiza mediante estudios experimentales los efectos del aglepristone como antiprogestágeno en glándulas mamarias de pacientes sin signos clínicos de enfermedad en relación con la variación en la inmunoexpresión de los RP y Ki67. En el segundo ensayo clínico se analizó la sobrevida libre de enfermedad y general de hembras caninas portadoras de tumores mamarios siendo un aspecto de mayor importancia para el tratamiento de tumores hormono dependiente evaluando al AGLE como potencial adyuvante antitumoral.



**OBJETIVOS GENERALES**

- Evaluar los efectos del antiprogéstágeno aglepristone en la glándula mamaria y en la sobrevida de pacientes caninos con neoplasias mamarias.

**OBJETIVOS PARTICULARES**

- Describir el efecto del aglepristone en tejido mamario de perra sin signos clínicos aparentes de enfermedad, en relación con la expresión de los receptores de progesterona y al marcador de proliferación celular Ki 67.
- Evaluar los efectos del aglepristone en la sobrevida libre de enfermedad y sobrevida general en perras con tumor de glándula mamaria en estadios I, II o III, tratadas quirúrgicamente.

### **HIPÓTESIS MÁS RELEVANTES**

- El aglepristone disminuye la expresión de los receptores de progesterona y del marcador de proliferación celular Ki 67 en tejido mamario de perras en fase lútea y sin signos clínicos aparentes de enfermedad.
- El aglepristone aumenta la sobrevida libre de enfermedad y sobrevida general en perras con tumor de glándula mamaria en estadio I, II o III tratadas quirúrgicamente.

## **ESTUDIO EXPERIMENTAL 1**

### **Estudio del efecto del antagonista de progesterona, el aglepristone, en tejidos mamarios caninos**

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Animales**

El estudio se realizó en una población de 20 perras sin signos de enfermedad neoplásicas, de entre 1 y 6 años de edad y de 8 a 20 kg de peso, en fase lútea (progesterona sérica: mayor a 2ng/ml; n=20).

### **Evaluación del momento del ciclo estral**

#### ***Determinación de progesterona***

Se determinó la progesterona sérica para evaluar el momento del ciclo estral en que se encontraban las pacientes en dos momentos: antes de las cirugías (día 0) y a los 14 días posteriores, en el momento de la toma de la muestra. La extracción de sangre se realizó en todos los animales (AGLE y PLA) antes del tratamiento por punción venosa periférica y se usó para la determinación de progesterona la técnica de inmunoensayo enzimático quimioluminiscente en fase sólida (IMMULITE, Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, California).

#### ***Frotis vaginal***

Se tomaron muestras de material celular con hisopo por la comisura dorsal de los

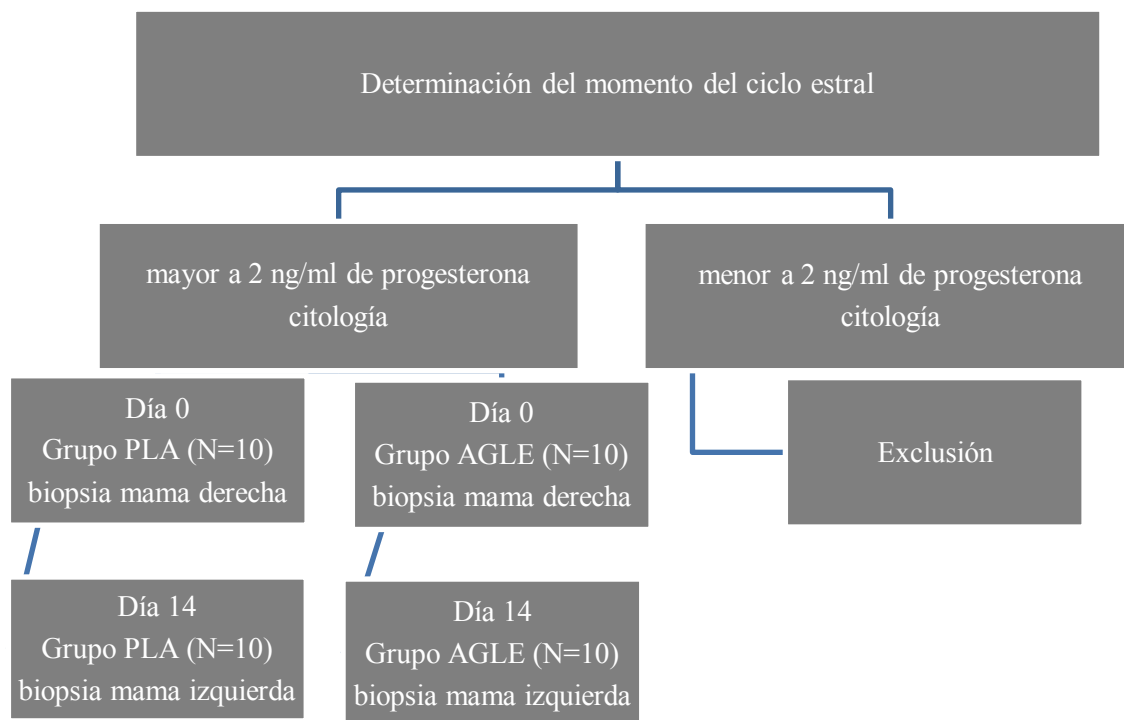
labios vulvares hasta la porción caudal de la vagina a todas las perras antes de las intervenciones quirúrgicas.

Con el material extraído se hicieron frotis por rodamiento en un portaobjeto, posteriormente se tiñeron para observar al microscopio (Tinción 15 Biopur®).

### **Diseño experimental y biopsias**

Las perras fueron distribuidas en dos grupos al azar (Fig. 1). Al grupo tratado (AGLE) se le aplicó el siguiente protocolo terapéutico: aglepristone (Alizine, Virbac, Brasil), 10 mg/kg/, vía subcutánea (AGLE; n=10); y al grupo Placebo (PLA) se le aplicó igual volumen (0,33 cc/kg) de solución fisiológica, vía subcutánea (PLA, n=10).

Inmediatamente posterior al tratamiento se procedió a la aplicación del protocolo anestésico (ver anexo I), se realizó la toma de biopsias incisionales resecaando un fragmento de tejido mamario con bisturí en forma de cuña hasta la fascia muscular, previa asepsia y con posterior sutura de la piel de la mama inguinal derecha (día 0; n=20). Posteriormente a los 14 días se procedió a realizar la biopsia de la mama inguinal izquierda con la misma técnica (AGLE, n=10 y PLA, n=10) (Fig. 1). Todas las muestras tuvieron como destino el procesamiento para su análisis histológico y luego se realizó la marcación por medio de IHQ de RP y el marcador Ki 67.



**Figura 1:** Organigrama de las biopsias de mamas.

### Estudio histológico

Las muestras se colocaron en casetes histológicos y se fijaron en solución de formol tamponado con fosfato al 10 % pH 7,2; luego fueron sumergidos en una serie de alcoholes de graduación creciente, después en xileno y finalmente fueron incluidos en parafina fundida a 60 °C. A partir de los bloques de parafina, se obtuvieron secciones de 5 µm de grosor mediante micrótopo (HM 315, Microm®). Para su tinción con hematoxilina y eosina, las secciones se desparafinaron en xileno, luego se hidrataron pasando por una serie de alcoholes de graduación decreciente y por último se tiñeron con Hematoxilina de Harris (Biopack®, Argentina) y Eosina (Biopack®, Argentina). Luego de la tinción, las muestras fueron deshidratadas,

sumergidas en xileno, y montadas con Bálsamo de Canadá sintético (Biopack®, Argentina). El resto de los cortes se destinaron para los ensayos de inmunohistoquímica.

### **Determinación por inmunohistoquímica de RP y antígeno Ki-67**

Se fijaron las muestras de tejido mamario en solución de formol tamponado con fosfato al 10 % pH 7,2, 20 h después fueron lavadas con agua de grifo, durante 1 h. Luego se deshidrataron en una solución de alcohol al 70° por 10 h y luego en alcohol 96° durante 4 h con repetición, continuando en alcohol 100°, 2 h con repetición y en benzoato de bencilo durante 12 h. Finalmente, se sumergieron en xilol 1 h con repetición. Posteriormente se incluyeron en parafina y luego se realizaron cortes histológicos de 3 µm para realizar la técnica de peroxidasa (ver técnica en ANEXO II).

### **Análisis estadístico**

Para las inmunomarcaciones de RP y Ki-67 se contaron de 6 a 8 campos representativos a 60x y 40x respectivamente. Se calculó el porcentaje de células epiteliales de acinos glandulares con inmunoexpresión contando los núcleos positivos (marrones) y negativos de aproximadamente 100 células.

Fueron comparadas las diferencias de las medias por un test de Student para muestras relacionadas de los porcentajes de positividad de RP y Ki-67, por animal, obtenidos en cada uno de los días del protocolo (día 0 vs. día 14 o día-0 vs. día-14).

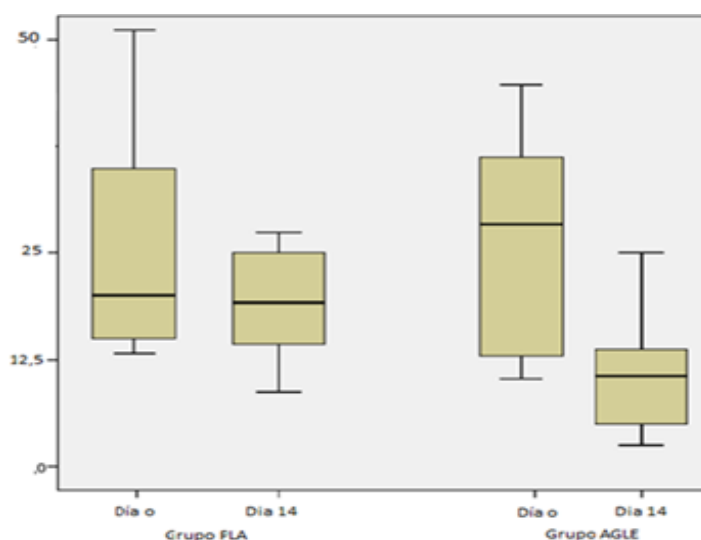
El nivel de significancia se estableció en  $p < 0,05$ , los datos muestrales se sometieron al test de Shafiro-Wilk para evaluar su distribución normal y a la prueba de Levene

para verificar la calidad de varianza. Luego de comprobar el cumplimiento de los supuestos se realizó la prueba T para dos medias relacionadas.

## RESULTADOS

Antes de comenzar los tratamientos, los valores de progesterona sérica de las perras del grupo PLA el día 0 fueron  $22,31 \text{ ng/ml} \pm 11,75$  media  $\pm$  DE y a 14 días posteriores,  $17,04 \text{ ng/ml} \pm 8,56$  media  $\pm$  DE, no presentando diferencias significativas  $p = 0,054$ .

La progesterona sérica del grupo AGLE del día 0 presentó una media de  $29,58 \text{ ng/ml} \pm 10,74$  media  $\pm$  DE y en el día 14 fue de  $10,06 \text{ ng/ml} \pm 13,46$  media  $\pm$  DE, estas diferencias poseen significación estadística  $p = 0,002$  (Fig. 2).



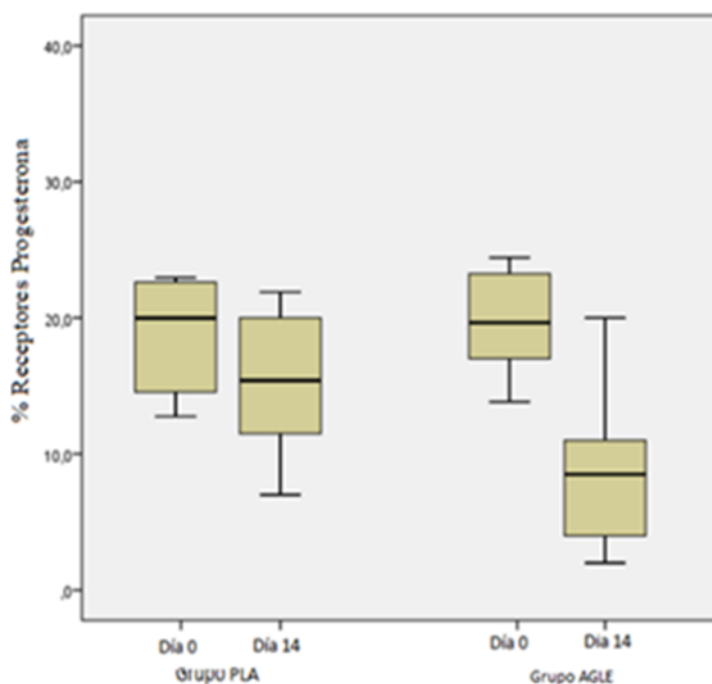
**Figura 2:** Distribución de los niveles de progesterona sérica en el grupo PLA y AGLE a los 14 días del tratamiento.

Los resultados de la prueba T para muestras relacionadas presentaron una media de para los valores de inmunexpresión de los RP para el grupo PLA el día 0 de 21 %

de  $\pm 13,00$  media  $\pm$  DE (fig. 4- 6) y para el día 14 de  $19,53 \% \pm 5,88$  media  $\pm$  DE (fig. 5-7) no presentando diferencias significativas,  $p = 0,71$  (Fig. 3).

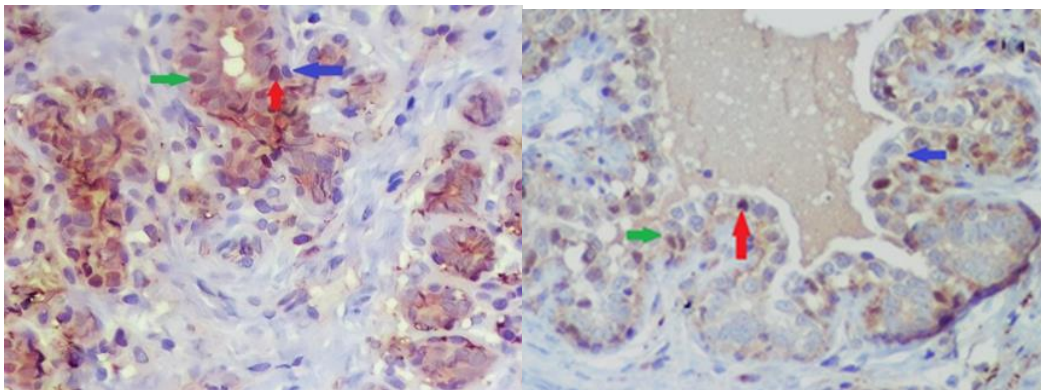
La inmunexpresión de los RP del grupo AGLE el día 0 (fig. 8-10) presentó un valor de  $23,16 \% \pm 12,01$ ; media  $\pm$  DE y el día 14 de  $10,8 \% \pm 4,86$  media  $\pm$  DE siendo la diferencia entre ambas medias estadísticamente significativa  $p = 0,009$  (Fig. 9-11).

Como puede observarse, se produjo una reducción en el porcentaje de inmunexpresión de RP del  $49,2 \%$  en el grupo AGLE en comparación con el mantenimiento de dicho porcentaje en el grupo PLA presentando significancia estadística entre ambos grupos  $p = 0,0002$ .

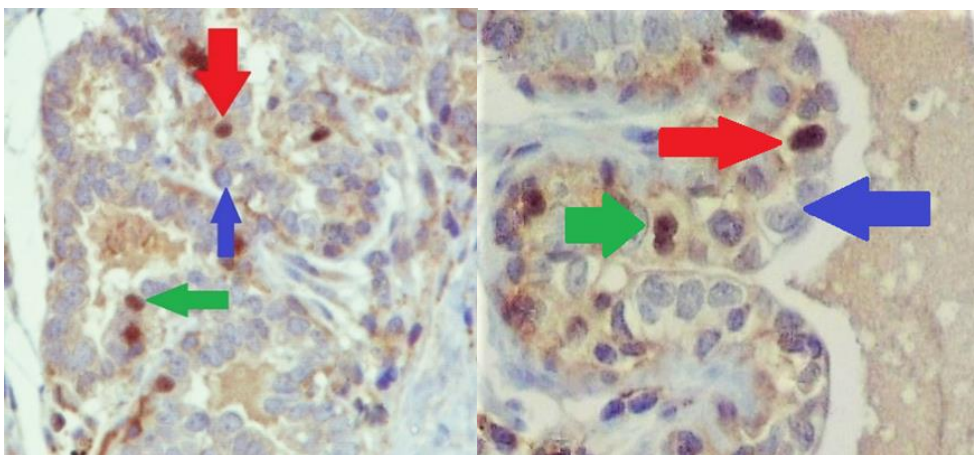


**Figura 3:** Distribución de las medias de la inmunexpresión de los RP en el tejido mamario.

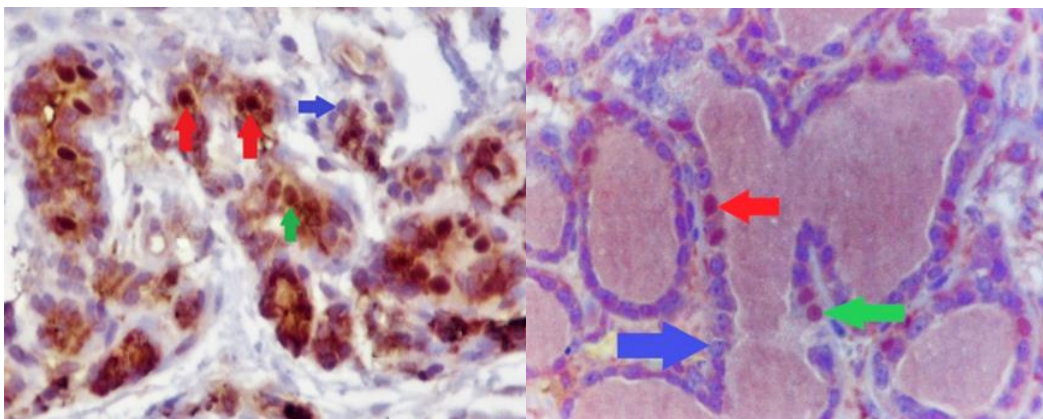




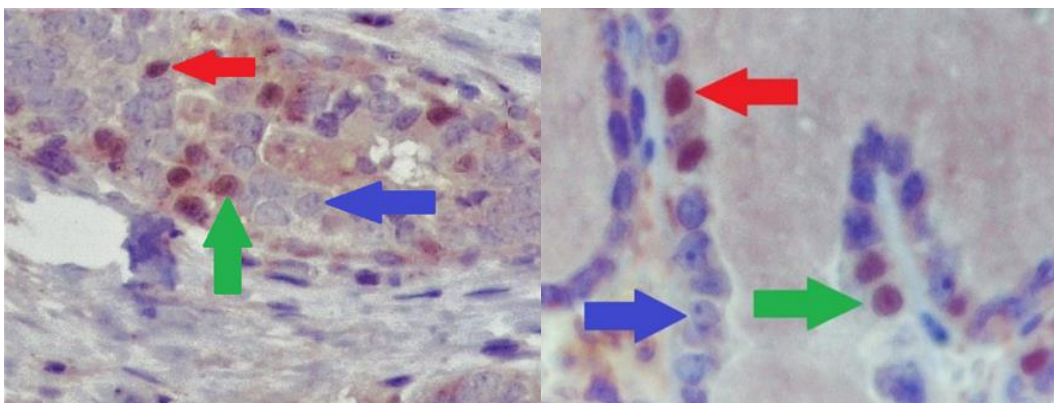
**Figuras 4 y 5.** Grupo PLA. Marcación nuclear en células epiteliales de RP. IHQ. DAB. Flechas rojas: marcación nuclear positiva intensa (marrón oscuro), flechas verdes marcación positiva moderada (marrón claro), flechas azules células negativas (celeste). Obj. 40x. **4:** muestra día 0. **5:** muestra día 14.



**Figuras 6 y 7.** Grupo PLA. Marcación nuclear en células epiteliales de RP. IHQ. DAB. Flechas rojas: marcación nuclear positiva intensa (marrón oscuro), flechas verdes marcación positiva moderada (marrón claro), flechas azules células negativas (celeste). Obj. 100x. **6:** muestra día 0. **7:** muestra día 14.



**Figuras 8 y 9.** Grupo AGLE. Marcación nuclear en células epiteliales de RP. IHQ. DAB. Flechas rojas: marcación nuclear positiva intensa (marrón oscuro), flechas verdes marcación positiva moderada (marrón claro), flechas azules células negativas (celeste). Obj. 40x. **8:** muestra día 0. **9:** muestra día 14.



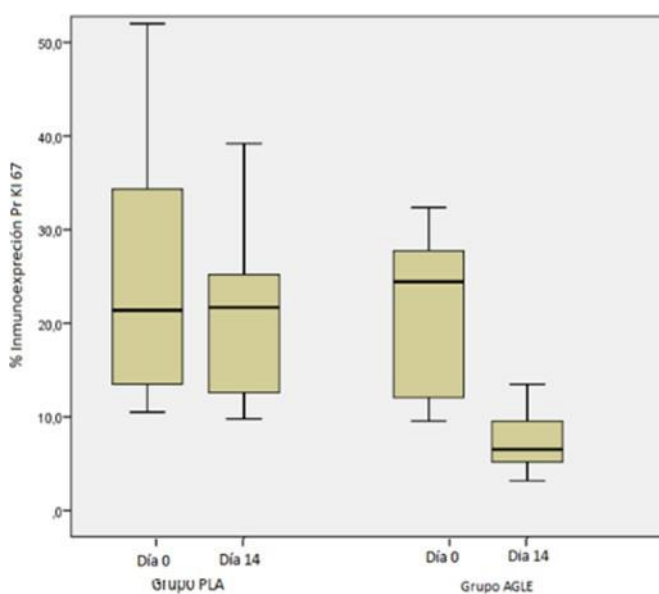
**Figuras 10 y 11.** Grupo AGLE. Marcación nuclear en células epiteliales de RP. IHQ. DAB. Flechas rojas: marcación nuclear positiva intensa (marrón oscuro), flechas verdes marcación positiva moderada (marrón claro), flechas azules células negativas (celeste). Obj. 100x. **10:** muestra día 0. **11:** muestra día 14.

Por su parte el porcentaje de inmunoexpresión de Ki-67 en el grupo PLA presentó una de media  $\pm$  DE de 27,29 %  $\pm$  14,05 el día 0 (Fig. 13-15) y de 22,71 %  $\pm$  12,13 el día 14 (Fig. 14-16) siendo la diferencia entre ambas medias estadísticamente significativa  $p = 0,005$ .

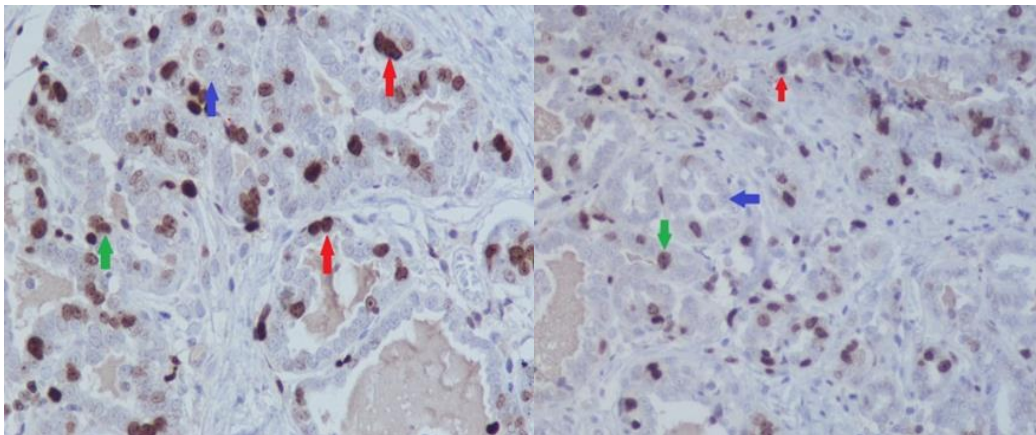
El grupo AGLE presentó una inmunoexpresión de Ki-67 media  $\pm$  DE de 23,74 %  $\pm$

8,3 en el día 0 (Fig. 17-19) y el día 14 (Fig.18-20) presento una media de  $7,45\% \pm 3,43$  media  $\pm$  DE, siendo la diferencia entre ambas medias estadísticamente significativa  $p = 0,0002$ .

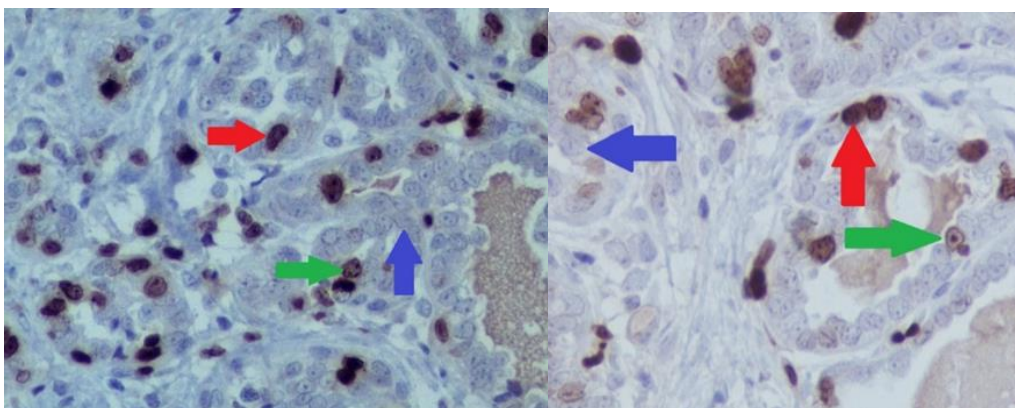
Si bien se observó una disminución en el recuento de la inmunoexpresión de Ki67 en ambos grupos, el porcentaje de inmunomarcación de Ki 67 observado luego de 14 días disminuyó  $64,15\%$  para el grupo AGLE, mientras que dicha reducción fue sólo del  $16,19\%$  para el grupo PLA, presentando una diferencia significativa entre ambos grupos  $p = 0,0001$  (Fig. 12).



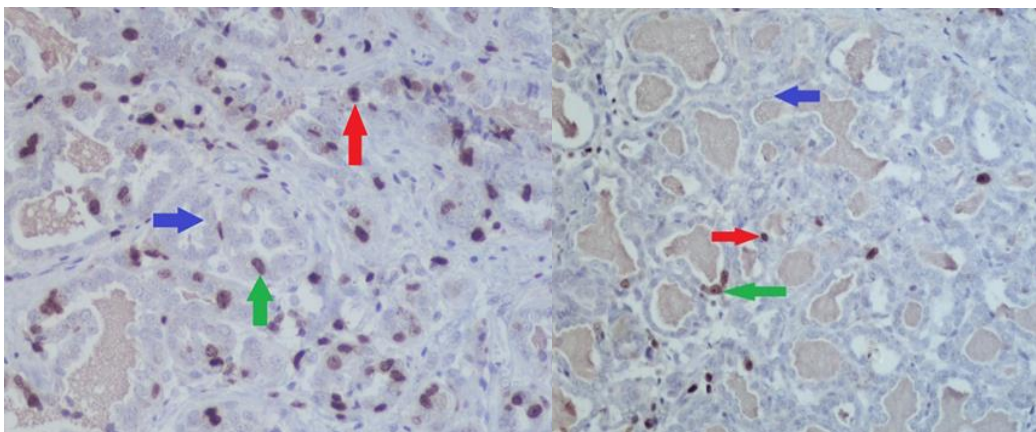
**Figura 12:** Distribución de los valores de la inmunoexpresión de Ki-67 en tejido mamario.



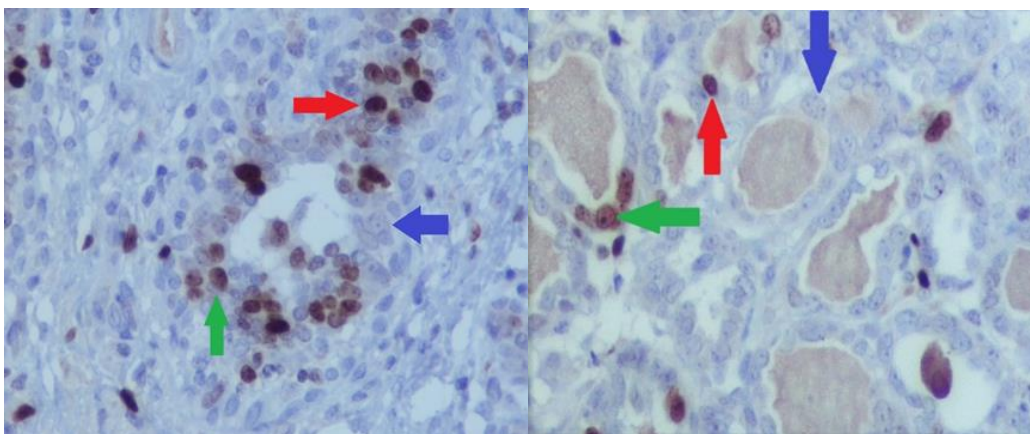
**Figuras 13 y 14.** Grupo PLA. Marcación nuclear en células epiteliales de Ki 67. IHQ. DAB. Flechas rojas: marcación nuclear positiva intensa (marrón oscuro), flechas verdes marcación positiva moderada (marrón claro), flechas azules células negativas (celeste). Obj. 40x. **13:** muestra día 0. **14:** muestra día 14.



**Figuras 15 y 16.** Grupo PLA. Marcación nuclear en células epiteliales de Ki 67. IHQ. DAB. Flechas rojas: marcación nuclear positiva intensa (marrón oscuro), flechas verdes marcación positiva moderada (marrón claro), flechas azules células negativas (celeste). Obj. 100x. **15:** muestra día 0. **16:** muestra día 14.



**Figuras 17 y 18.** Grupo AGLE. Marcación nuclear en células epiteliales de Ki 67. IHQ. DAB. Flechas rojas: marcación nuclear positiva intensa (marrón oscuro), flechas verdes marcación positiva moderada (marrón claro), flechas azules células negativas (celeste). Obj. 40x. **17:** muestra día 0. **18:** muestra día 14.



**Figuras 19 y 20.** Grupo AGLE. Marcación nuclear en células epiteliales de Ki 67. IHQ. DAB. Flechas rojas: marcación nuclear positiva intensa (marrón oscuro), flechas verdes marcación positiva moderada (marrón claro), flechas azules células negativas (celeste). Obj. 100x. **19:** muestra día 0. **20:** muestra día 14.

## **ESTUDIO EXPERIMENTAL II**

### **Efectos de un antiprogéstágeno en la sobrevida de hembras caninas con neoplasias mamarias**

#### **Materiales y métodos**

##### **Animales**

El estudio se realizó en una población de 20 perras de 6 a 10 años de edad, no ovariectomizadas, con TGM malignos en estadios I, II, III, previo consentimiento firmado por sus respectivos propietarios.

Los animales fueron evaluados sistemáticamente durante la consulta registrándose en la historia clínica del animal la edad, raza, condición fisiológica y evolución del proceso tumoral.

Previamente a la cirugía se realizaron estudios obteniendo muestras de sangre de todos los animales (AGLE y PLA) por punción venosa periférica para la realización de hemograma completo, determinación de urea, creatinina, recuento plaquetario, con el objetivo de evaluar el estado de salud de los animales. También se evaluaron el momento del ciclo estral de cada paciente realizando un frotis vaginal para la obtención de una muestra citológica, y el momento de la ovulación, determinando la progesterona sérica, con igual técnica que la utilizada en el estudio experimental I.

Se realizó la evaluación radiológica del tórax con el objetivo de poner en evidencia eventuales metástasis de cada una de las pacientes intervenidas, mediante tres t o m a s radiológicas (latero lateral izquierda y derecha y ventro dorsal),

utilizando un equipo (RAIX, Buenos Aires, Argentina) de 90Kv y 30 mA.

### **Diseño experimental**

Las 20 perras de 6 a 10 años con TGM maligno protocolizadas en el estudio fueron divididas en 2 grupos y distribuidas al azar a cada uno de los siguientes protocolos terapéuticos: AGLE (Aglepristone; Alizine®, Virbac, Francia) en dosis de 10 mg/kg vía subcutánea, inmediatamente después de la cirugía; se administró la misma dosis a los 15, 30, 45 y 60 días y posteriormente 1 dosis luego de cada celo durante el seguimiento de 12 meses. Al grupo PLA (n = 10) se le inyectaron volúmenes equivalentes de vehículo oleoso, inmediatamente después de la cirugía, con igual protocolo al tratamiento AGLE.

### **Obtención de las muestras**

Se obtuvieron las muestras para el estudio histopatológico mediante mastectomía y nudilectomía de los linfonódulos centinelas, utilizando el protocolo anestésico descrito en anexo I.

La técnica quirúrgica aplicada fue en bloque, con la remoción de la/s glándula/s afectada/s, glándulas ipsilaterales involucradas en el drenaje linfático, así como las glándulas craneales y caudales a la/s afectada/s y el linfonódulo centinela.

### **Estadificación clínica**

La estadificación clínica de cada paciente se efectuó de acuerdo con el sistema TNM (Owen, 1980) (Tabla 1).

Estadio clínico	Tamaño del tumor	Estado del linfonódulo regional	Metástasis a distancia
I	< 3 cm	No afectado	Sin metástasis
II	3-5 cm	No afectado	Sin metástasis
III	>5 cm	No afectado	Sin metástasis
IV	cualquiera	Afectado	Sin metástasis
V	cualquiera	Afectado	Metástasis a distancia

Las perras en estadio avanzado, con metástasis regionales (IV) y a distancia (V) no fueron incorporadas en este estudio. Los estadios IV se establecieron mediante biopsia diferida de los linfonódulos, desestimando los afectados (N1), según la estadificación propuesta por Lana y col. (2007). Para los estadios V se diagnosticó metástasis de tórax mediante radiografías (RAIX, Buenos Aires, Argentina) latero-lateral y ventro-dorsal.

### **Estudio histopatológico**

Las biopsias obtenidas de las mastectomías se colocaron en un casete histológico y se sumergieron en su totalidad en una solución de formol buffer al 10 %, pH 7,2 hasta su procesamiento.

Las muestras fueron sometidas posteriormente a una serie de pasajes por etanol de graduación creciente 70 % durante 5 min, 95 % durante 5 min, 100 % durante 5 min



luego se sumergieron en xileno y finalmente fueron incluidas en parafina fundida a 60°C. A partir de los bloques de parafina, se obtuvieron secciones de 5 µm de grosor mediante micrótomo (HM 315, Microm®).

Para su tinción con hematoxilina y eosina (H/E), las secciones se desparafinaron en xileno, luego se hidrataron pasando por etanol de graduación decreciente 5 min al 100 %, 5 min al 95 %, 5 min a 75 % y por último se tiñeron con Hematoxilina de Harris (Biopack®, Argentina) y Eosina (Biopack®, Argentina). Luego de la tinción, las muestras fueron deshidratadas, sumergidas en xileno, y montadas con Bálsamo de Canadá sintético (Biopack®, Argentina).

Las biopsias de tejido tumoral se clasificaron histológicamente según Misdorp y col., 1999. Los hallazgos histopatológicos fueron evaluados y clasificados. La malignidad tumoral fue graduada histológicamente por el método Nottingham modificado ( Elston y Ellis, 1991) para su uso en caninos, esta evaluación toma en cuenta tres características morfológicas, la formación tubular, el polimorfismo nuclear y el conteo mitótico, cada uno registrado como 1-3. Luego se sumaron para obtener el grado tumoral como se detalla a continuación: 3-5 puntos = bien diferenciado grado I; 6-7 puntos = moderadamente diferenciado grado II; 8-9 puntos= pobremente diferenciado, grado III (tabla 2 y 3).

Tabla 2. Sistema de graduación histológica para cáncer mamario canino.

<b>A.Formación de túbulos</b>	Puntaje	
	1	>75%
	2	Entre 10-75%
	3	< 10%
<b>B.Pleomorfismo nuclear</b>		
	1	Nucleos pequeños, regulares, cromatina uniforme
	2	Moderado grado de variación en tamaño y forma nuclear

	3	Marcada variación en el tamaño nuclear, nucleolo prominente
<b>C.Figuras mitóticas en 10 campos de observación (objetivo 40 X ) HPF</b>		
	1	0-9 mitosis/10 HPF
	2	10-19 mitosis/ 10 HPF
	3	≥ 20 mitosis/10 HPF

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

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

Los tumores mamarios fueron definidos como osteosarcomas cuando la matriz osteoide fue producida por las células tumorales, y las lesiones fueron luego clasificadas como grado bajo (grado I), intermedio (grado II) o alto (grado III).

### **Seguimiento clínico**

Se llevó a cabo una evaluación clínica de las glándulas mamarias remanentes, de los linfonódulos y de la herida quirúrgica cada 3 meses o bien cuando acontecía algún cambio, durante un mínimo de doce meses luego de la cirugía.

Se realizó el seguimiento radiológico cada 6 meses de todos los pacientes intervenidos con el objetivo de evidenciar eventuales metástasis de tórax utilizando un equipo (RAIX, Buenos Aires, Argentina) de 90 Kv y 30 mA. Las imágenes fueron obtenidas en tres proyecciones latero-lateral derecha e izquierda y otra

ventro- dorsal.

### **Análisis estadístico**

Para verificar la igualdad en la distribución de los datos en los tratamientos entre los grupos (AGLE vs. PLA), estadio clínico y grado histológico fueron evaluados con el test de Kruskal-Wallis para variables continuas y por el test de Fisher para variables categóricas. El nivel de significancia se fijó en todos los casos en  $p < 0,05$ .

Se analizaron dos variables, la SLE y la SG, que fueron definidas como el tiempo transcurrido desde la primera cirugía a la recidiva (local, regional o distante) o hasta la muerte del animal, respectivamente. En el análisis de SLE los animales fueron estadísticamente censurados si al tiempo del cierre de la compilación de datos el tumor no presentó recidivas o las metástasis no eran detectadas. En el análisis de SG, los animales fueron estadísticamente censurados si al tiempo del cierre del seguimiento clínico de la compilación de datos estos permanecían vivos. Ambas curvas de supervivencia se estimaron utilizando el método de Kaplan-Meier dado que el estimador tiene en cuenta la censura.

## RESULTADOS

El valor medio de progesterona sérica fue de 0,81 ng/ml con un desvío estándar de  $\pm 1,18$  no mostrando diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los desvíos entre PLA y AGLE.

Las hembras más afectadas fueron mestizas 55 % (11/20) el 45 % restantes correspondieron a las siguientes razas: beagle (3/20), cócker spaniel (2/20), ovejero alemán (2/20), chihuahua (1/20) y airedale terrier (1/20).

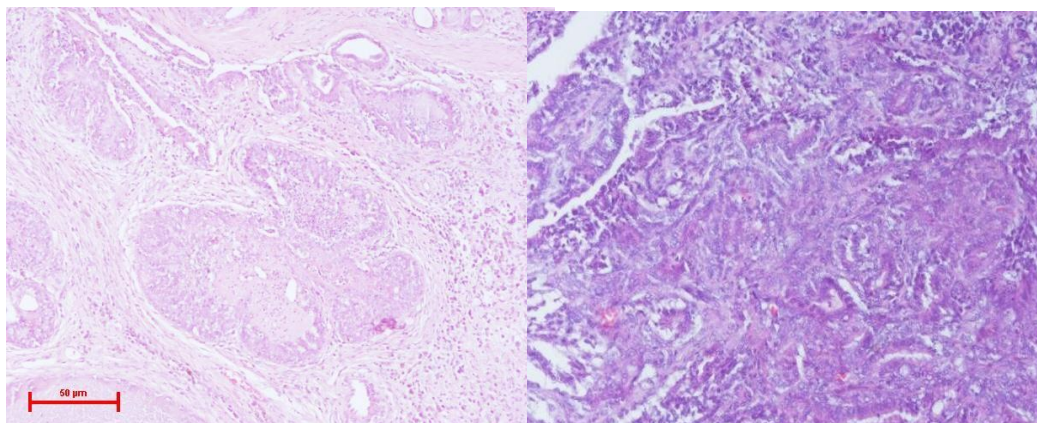
La frecuencia de presentación del estadio clínico fue mayoritaria en el estadio II 75%, estadio III 20% y un solo caso de estadio I. El 55 % (11/20) de los tumores resultaron con lesiones ulcerativas (Fig. 21)



**Figura 21-** Lesión ulcerativa de la mama abdominal derecha de la paciente tratada AGLE 9 antes de la cirugía citorreductiva.

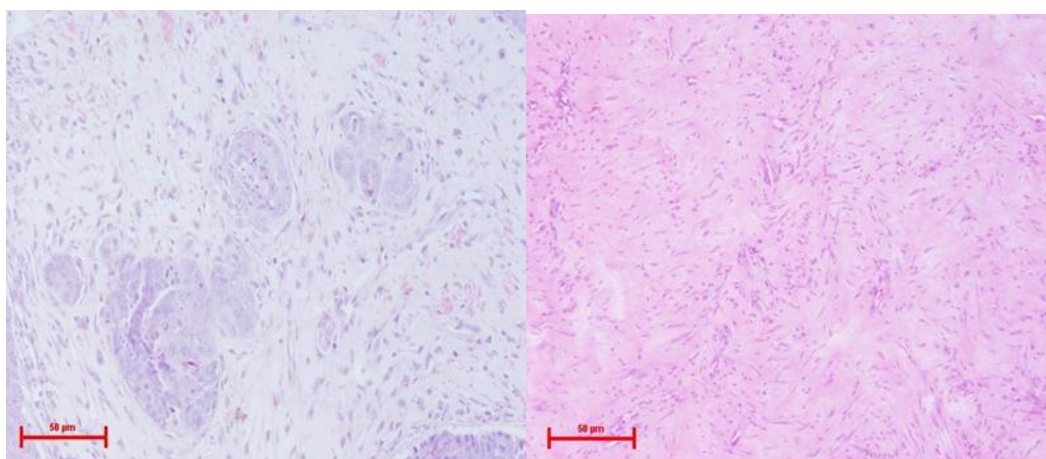
El tipo más frecuente de tumor diagnosticado en un 40 % (8/20) fue el carcinoma simple (Fig. 22); el 25 % (5/20) fueron carcinomas complejos (Fig. 23), 20 % (4/20) de carcinomas mixtos (Fig. 24) y 15 % (3/20) fueron fibrosarcomas (Fig. 24).

Teniendo en cuenta el grado histológico resultó como más frecuente que el 50 % (10/20) de los tumores fueron de grado II, el 35 % (7/20) fueron III y solo el 15 % (3/20) corresponde al grado I. En el grupo AGLE la recurrencia de la enfermedad se presentó en 3/10 (30 %) y en PLA en 9/10 (90 %) de los animales. Durante el seguimiento murieron 5/10 (50 %) perras en el grupo AGLE y 8/10 (80 %) en



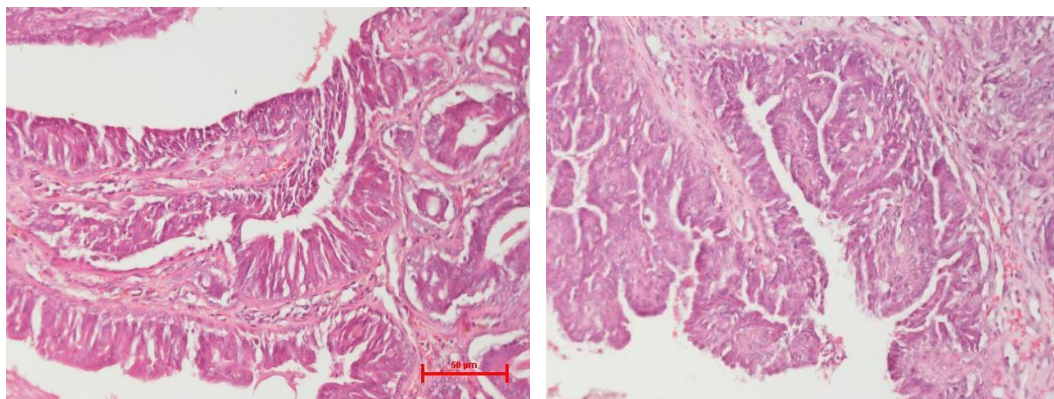
el grupo PLA

**Figuras 22 y 23:** caninos hembras, grupo PLA. H E. Izquierda **22**.: paciente 5, carcinoma simple grado 1. Obj. 40x. Derecha **23**: paciente 6, carcinoma complejo grado 2. Obj 60x



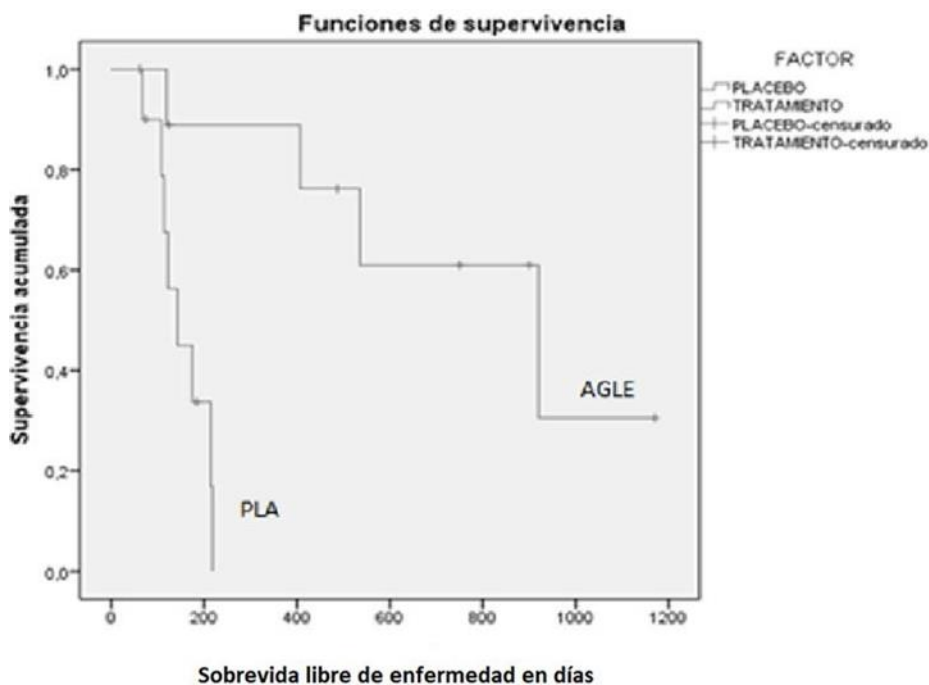
**Figura 24 y 25:** caninos hembras, grupo AGLE. H E. Izquierda **24**: paciente 7, carcinoma

mixto grado 2. Obj. 40x . Derecha **25**: paciente 3, fibrosarcoma de grado 2. Obj 40x.



**Figura 26 y 27**: caninos hembras, grupo AGLE. H E. Izquierda **26**: paciente 1, carcinoma tubulopapilar de grado 3. Obj.40x. Derecha **27**: paciente 3, carcinoma de grandes conductos de grado 2. Obj 40x.

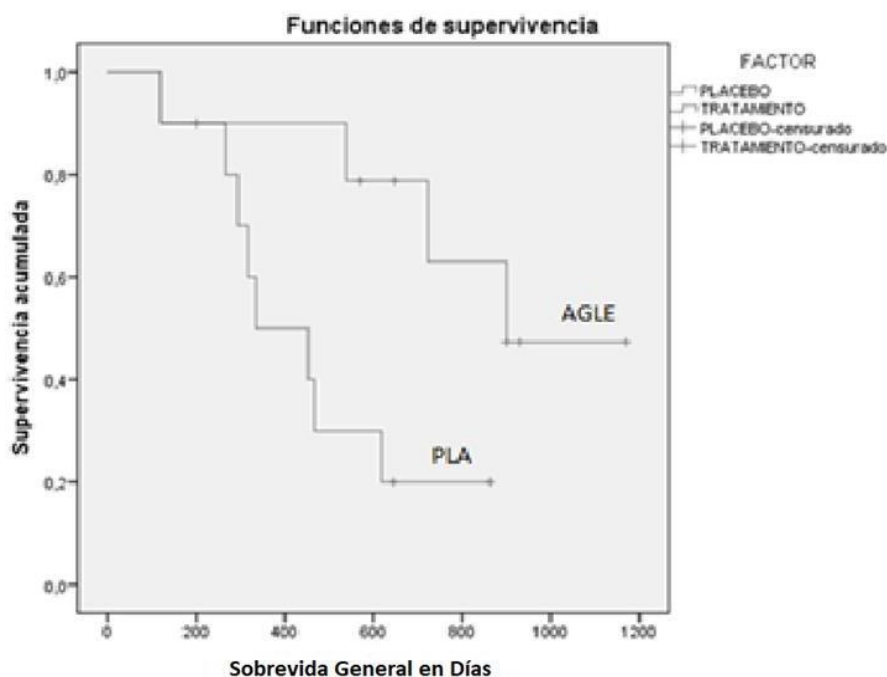
La probabilidad de SLE tuvo una media de 805 días el grupo AGLE y para el grupo placebo (PLA n= 10) una media de 159 días y un  $p > 0,001$  en la prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia Log Rank (Mantel-Cox) (Fig. 28).



**Figura 28**: Curva de supervivencia construida mediante el método de Kaplan-Meier del

grupo de hembras caninas. En el eje de las abscisas se consigna el tiempo de seguimiento en días, mientras que en el eje de las ordenadas consta la probabilidad (p) de supervivencia.

La probabilidad de SG de 20 perras con tumores de glándula mamarias con estadios I, II, III tratadas AGLE (n= 10) tuvo una media de 880,93 días el grupo PLA (n= 10) media de 459,8 días. La probabilidad fue de  $p > 0,023$  en la prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia Log Rank (Mantel-Cox) (Fig. 29). La paciente del grupo tratamiento AGLE 1 fue un caso incluido y censurado, dado que su muerte fue por una causa no relacionada con la enfermedad (sufrió un accidente automovilístico a los 648 días posteriores al inicio del ensayo).



**Figura 29:** Curva de supervivencia construida mediante el método de Kaplan-Meier. En el eje de las abscisas se consigna el tiempo de seguimiento en días, mientras que en el eje de las ordenadas consta la probabilidad (p) de supervivencia.

**Tabla 4:** Características clínicas e histológicas (H) y evolución de la enfermedad en perras con neoplasia mamaria tratadas con AGLE, n=10 o PLACEBO, n=10.

CC: carcinoma complejo; FS: fibrosarcoma; CS: carcinoma simple; CM: carcinoma mixto;

PACIENTE	ESTADIO CLINICO	TIPO HISTOLÓGICO	GRADO HISTOLÓGICO	SLE (DIAS)	RECURRENCIA	SG (DIAS)	ESTADO
PLA 1	T2	CS	G2	219	MP	294	M
PLA 2	T2	CM	G2	143	MLR	267	M
PLA 3	T3	CC	G1	184	ML	863	V
PLA 4	T3	CS	G3	0	S/P	120	M
PLA 5	T2	CS	G1	215	MLR	618	M
PLA 6	T2	CC	G2	115	MP	335	M
PLA 7	T1	FS	G3	75	MP	645	V
PLA 8	T2	CS	G3	123	ML	453	M
PLA 9	T2	CM	G2	175	ML	467	M
PLA 10	T3	CC	G3	108	MLR	318	M
AGLE 1	T2	CS	G3	485	ML	648	C
AGLE 2	T2	CC	G2	0	S/P	723	M
AGLE 3	T3	FS	G2	0	S/P	538	M
AGLE 4	T2	FS	G3	0	S/P	120	M
AGLE 5	T2	CM	G1	125	ML	1170	V
AGLE 6	T2	CS	G2	0	S/P	930	V
AGLE 7	T2	CM	G2	62	MLR	900	V
AGLE 8	T2	CS	G3	0	S/P	200	V
AGLE 9	T3	CC	G2	0	S/P	920	M
AGLE 10	T2	CS	G2	0	S/P	570	V

V: vivo; M: muerto; MP: metástasis pulmonar; MLR: metástasis locoregional;

MML:metástasis local: S/P: sin presentación.



## DISCUSIÓN

### Estudio experimental I

Los reportes sobre la variación de los niveles séricos de progesterona en fase luteal en perras no grávidas y sin enfermedad aparente, tratadas con AGLE, son escasos en la bibliografía actual, ya que la mayoría de los estudios enfatizan su rol en la interrupción de la preñez, en el tratamiento de la piómetra y en los últimos años, en la inducción del parto (Galac y col., 2000).

Un trabajo realizado por Polisca y col (2010), en perras no preñadas, tratadas con AGLE durante la fase lútea media describe un acortamiento de dicha fase, en la que la luteólisis completa se produce en los días  $40,8 \pm 3,5$  mientras que en los controles se produce en los días  $71,5 \pm 4,6$ ; estos datos difieren de los de Galac y col. (2004), quienes observaron una media de  $72 \pm 6$  días en tratadas, en fase lútea temprana frente a  $74 \pm 4$  días en los controles. Estas diferencias se atribuyen a los diferentes tiempos de la fase lútea en los que se aplicó el AGLE, proponiendo a una dependencia con la hipófisis en la fase lútea media.

Los resultados de este estudio experimental, concuerdan con los obtenidos por Torres (2009) en un trabajo similar, en el que los niveles séricos de la progesterona durante el tratamiento con AGLE, a dosis terapéuticas, descendieron en un 38,8 % en el día 7 posterior al tratamiento y el 71,6 % el día 14, respectivamente, mientras que el grupo control el descenso fue solo del 7,5 %.

Un patrón similar fue descrito por Oguejiofor y col. (2013) en un estudio con ratas

preñadas tratadas con AGLE en la fase lútea temprana, con un protocolo similar al utilizado en este trabajo; observaron concentraciones séricas significativamente menores de progesterona y sugirieron un efecto luteolítico tardío dependiendo de la integridad del eje hipotalámico- hipofisario-ovárico.

Cuando se administra AGLE para la interrupción de la preñez, en fase lútea temprana, no se reportan variaciones significativas de progesterona durante los primeros 3 días (Kanca y Karakas, 2012). Algunos estudios estiman que esta condición se mantiene hasta 6 días posteriores a la aplicación (Corrada y col., 2005).

Las variaciones de la concentración sérica de progesterona son observadas en algunos estudios (Galac y col., 2000; Feini y col., 2001 y Kanca y Karakas, 2012) en perras preñadas aplicando AGLE alrededor del día 30 de gestación, cuando se produce una disminución significativa en la concentración de progesterona debido al cese prematuro de la fase luteal.

El acortamiento de la fase lútea en perras después de la administración de AGLE en la mitad del tiempo de gestación fue descrito por Linde y col. (1996) y fue asociado con un aumento de los niveles plasmáticos de 13,14-dihidro-15-quetoprostaglandina  $F2\alpha$  (PGFM) debido a que es el metabolito principal de prostaglandina  $F2\alpha$ , probablemente inducida por la expulsión fetal, propuesto por Baan y col. (2005).

Kowalewski y col. (2010) realizaron un tratamiento con AGLE entre los días 40 y 45 de la gestación, en los que tomaron muestras de tejido de útero/placentario, observando un aumento preparto de  $PGF2\alpha$  resultante de una fuerte regulación en el trofoblasto fetal con aumento de prostaglandina sintetasa, al bajar los niveles

plasmáticos de la progesterona con una función de señalización en las células deciduales y con un papel clave en el intercambio de célula a célula que participa activamente en la luteólisis preparto.

Se evaluaron los parámetros hemodinámicos intraováricos monitoreados por ecografía doppler codificada por color en perras no gestantes, contrastando un grupo control con un grupo tratado con AGLE, concluyendo que cuando se acelera el proceso luteolítico se acompaña de una disminución paralela en el suministro de flujo sanguíneo ovárico aproximadamente a los 8 a 10 días luego del tratamiento con aglepristone.

Algunos autores infieren una modulación del AGLE sobre el eje hipotalámico-pituitario con acción indirecta sobre el ovario, mediante la supresión del soporte luteotrófico, del boqueo de RP de la hipófisis anterior y en varias áreas del cerebro, incluido el hipotálamo y el endometrio (Polisca y col. 2010).

Un trabajo realizado por Baan y col. (2005) informa que al inducir el parto con AGLE a los 58 días de la preñez, no se producen variaciones de progesterona plasmática dentro de las 24 h, aunque al momento de la expulsión, los valores aproximadamente de 6,4 nmol/l estaban por encima de los requeridos para mantener la preñez, lo que apoya la hipótesis que el bloqueo de los RP reduce la retroalimentación positiva de la progesterona para su secreción, con mecanismos de luteolíticos diferentes.

Un trabajo realizado por Kowalewski y col. (2010), demuestra la evidencia del papel de la progesterona luteal como factor autocrino que retroalimenta su propia disponibilidad al bloquear los RP e inducir la luteólisis, con tratamiento de AGLE

en perras gestantes en los días 40 a 45 y propone un sistema de retroalimentación positivo que controla la disponibilidad de P4, StAR y  $\beta$ 3HSD.

Después de 24 h de administrar el AGLE, la prolactina plasmática se eleva en un patrón de variación opuesto a la progesterona (Galac y col., 2000), en respuesta a la privación de progesterona en la especie canina (Gobello y col., 2001; Baan y col., 2008). Estos mismos autores también observan un aumento del cortisol sérico. Todos estos procesos apoyan la importancia de la retirada funcional de la progesterona.

Los datos que se analizan y discuten no solo otorgan un rol importante a la progesterona endógena, sobre el eje hipofisiario hipotalámico, los efectos luteolíticos del AGLE y su acción autocrina/paracrina, sobre su producción/inhibición y de hormonas esteroides derivadas, sino que explican los mecanismos de regulación de sus receptores.

En el presente estudio, el tratamiento con AGLE en fase lútea, en perras no grávidas y sin enfermedad aparente, evidenció una disminución significativa de la progesterona a los quince días de tratamiento; este resultado se explicaría por una modulación sobre el eje hipotalámico-pituitario a través del bloqueo de RP. Si bien no se realizó seguimiento para evidenciar el acortamiento de la fase lútea, se puede inferir que el AGLE actuó sobre la fase independiente de la hipófisis.

En la perra, uno de los genes objetivo de la progesterona en la glándula mamaria es el gen de la hormona del crecimiento, cuyo producto puede actuar como un factor de crecimiento local contribuyendo a la proliferación y diferenciación de la glándula mamaria durante la fase lútea del ciclo estral y durante la maduración final

de la glándula mamaria durante el embarazo (Selman y col., 1994; Mol, y col., 1996).

Estos mecanismos explicarían que la glándula mamaria normal no solo responde a la señal de progesterona, sino que estaría condicionada a los patrones de expresión de su receptor contribuyendo así a un normal desarrollo o eventualmente derivando en procesos displásicos o tumorales (Knutson y col., 2017).

A diferencia de lo descrito sobre cuerpo lúteo, útero, gestación o parto, son pocos los estudios que evalúan los efectos del AGLE en glándula mamaria normal. Tampoco se encontraron trabajos específicos de regulación del RP y la influencia de la progesterona endógena para el tejido mamario de perras sin enfermedad aparente.

Los resultados obtenidos en este trabajo evidenciaron una reducción estadísticamente significativa de la expresión de los RP en tejido mamario de perras tratadas, con un comportamiento similar para Ki-67.

Estos resultados están en concordancia con ensayos similares de Torres (2009), la comparación de la diferencia en la media de expresión de RP en tejido mamario de perras tratadas con PLA y AGLE.

Existen estudios sobre tratamientos de enfermedades proliferativas dependientes de progesterona como la hiperplasia fibroadenomatosa mamaria en gatas y tumores vaginales en perras y en ambas condiciones, se ha demostrado un efecto reductor del volumen de tejido; Guil Luna (2011) recomienda el uso del AGLE en carcinomas mamarios caninos, por sus efectos inhibidores relacionados con la expresión de RP sobre la proliferación de células.

La investigación reciente se ha centrado en el valor terapéutico de los antiprogestágenos. La expresión de receptores de RP se evalúa como factor pronóstico junto con los RE. Los estudios experimentales en cáncer de mama humano sugieren que la expresión diferencial de las isoformas RPA y RPB como un marcador predictivo de la sensibilidad al tratamiento con antiprogestágenos (Lamb, y col., 2019).

Los resultados de este modelo, en glándula mamaria de perras sin enfermedad aparente, tratadas con AGLE en fase lútea, demuestran claramente el papel proliferativo de la progesterona a través de sus receptores en el tejido mamario (Mol y col 1996; Lange y col., 1999; Lanari, y col., 2001; Lanari y col.; 2009; Concannon, y Col., 2009; Soldati y col., 2010; Sleenckx y col., 2011).

Es alentador pensar que el modelo se puede replicar, e incorporar otros estudios IHQ sobre otros marcadores para evaluar la regulación autocrina/paracrina de hormonas esteroideas y sus receptores, en el ovario, glándula mamaria normal, útero y también poder evaluar la angiogénesis mediante ecografía doppler del flujo sanguíneo en el ovario e incorporar homogenatos a estas técnicas.

## **Estudio experimental II**

Únicamente el 41 % de los pacientes fueron portadores de TGM malignos, estos resultados fueron similares a los reportados en otras publicaciones que señalan incidencias del 50 % (Lana y col. 2007) y del 30 % (Misdorp, 2002) e infieren de un 60 % reportadas por Vidales y col. (2008). La razón para esta diferencia podría estar en la incidencia de las campañas de castración masivas realizadas en más de

una década en la zona de donde se desarrolló el presente estudio, lo que implicaría en una disminución significativa de la casuística oncológica en perras.

Los resultados respecto a la frecuencia de neoplasias mamarias en las diferentes razas contradicen los hallado por Sirvent (2015), quien describe como las razas predispuestas a labradores retrievers mientras otros investigadores observaron mayor predisposición en caniches (Zatloukal y col. 2005) y en perros pastores (Mangieri, 1994; Allende y col. 2007).

La predisposición racial predominante observada en este trabajo fue la mestiza, esto concuerda por el predominio racial en la provincia de La Pampa tal como ocurre en otras ciudades latinoamericanas (Chau, 2013; Ferreira 2003).

El estado clínico más frecuente fue el estadio II en contraposición con lo reportado por Nunes (2015) quien reporta una presentación clínica del estadio I con un 53 % en un estudio con 416 pacientes. A pesar de estos resultados, Aleza, M y Col. (1997) mencionan una mayor presentación del estadio clínico III con un 37,5% de un total de 40 casos.

El tipo de TGM malignos más frecuente fue el carcinoma simple, datos similares fueron reportados por Chau y col. (2013) y Hermo y col. (2010), por el contrario, Guil-Luna y col. (2011) reportan un predominio de carcinoma complejo con un 41,30%.

El grado histológico que se presentó con mayor frecuencia fue el grado II coincidiendo con Ramos Vega (2015) y Torres (2009) en contraposición a lo reportado por Karayannopoulou y col. (2005), quienes comunican una mayor frecuencia en el del grado III.

Estos resultados difirieron de los encontrados por estudios realizados por Guil-Luna y col. (2011) y Benavente (2018) en los que se reporta un predominio del grado I.

Karayannopoulou y col. (2005) encontraron diferencias significativas en la supervivencia entre casos con diferentes grados tumorales, en que la supervivencia fue peor en perros con carcinomas de grado III que en aquellos con grados I y II.

Las hembras portadoras de TGM malignos en estadios I, II y III tratadas quirúrgicamente que recibieron las dosis del antiprogéstágeno aglepristone, incrementaron significativamente la SLE y SG en este trabajo.

Hermo y col. (2009) evaluaron el efecto del tratamiento de Aglepristone en 20 perras en estadio V en dosis 10 mg/kg vía subcutánea cada 24 h durante 10 días, continuando con la misma dosis semanalmente hasta la muerte del animal. Ese experimento no tuvo resultados positivos: solo uno de los animales del grupo aglepristone presentó en el primer examen remisión parcial, pero no se logró observar beneficio en ese animal en las siguientes observaciones.

Las neoplasias mamarias caninas tienen limitadas opciones terapéuticas, mayoritariamente se realiza cirugía y en ocasiones se acompaña con quimioterapia con efectos limitados y de función paliativa (Sorenmo y col, 2012).

El aglepristone, en la dosis que se aplicó en este estudio, es segura en pacientes caninos con TGM malignos y tiene efectos antitumorales sin efectos tóxicos evidentes. Los resultados obtenidos en el grupo PLA, para el intervalo libre de enfermedad, fueron comparables con aquellos publicados teniendo como variables los estadios clínicos similares de TGM, donde el 50 % de las perras tuvieron recidivas, cercanos a los 200 días después de la cirugía (Lana y col, 2007).



Este resultado concuerda con un estudio realizado en el año 2017 por Guil Luna y col., que describe una disminución de la proliferación celular en la glándula mamaria normal en fase lútea, decreciendo los efectos biológicos de la progesterona. Estos resultados serían la consecuencia de la disminución de la expresión de RP y la expresión del marcador nuclear Ki 67 y se interpreta que estos mismos efectos permitieron incrementar el período libre de enfermedad en estadios clínicos I, II.

En pacientes no ovariectomizadas en estadios I, II y III tratadas quirúrgicamente se evidenció que el aglepristone incrementó en forma significativa la SG con una media de 880,97 días, contrastada con el grupo placebo que resultó con una media de 459,8 días en TGM malignos; es decir, aumentó aproximadamente el 50 % el período de supervivencia general. Estos resultados difieren de los obtenidos por Knutson y col. (2017) que explican en sus ensayos clínicos previos con antiprogéstágenos arrojaron pocas respuestas en tumores RP positivos, adjudicando a estos agentes la fosforilación de RP y la expresión de genes diana no deseados.

Con estos resultados manifiestan la importancia que poseen los adyuvantes antitumorales por su efecto antiproliferativo, también alientan a incluir en los estudios la acción de esta terapia en el tejido mamario normal. Demuestra la importancia de mantener un eje hormonal reproductivo intacto en el tratamiento con aglepristone y obligan a seguir trabajando en la temática, a fin de ampliar terapéuticas que apoyen el tratamiento quirúrgico de las neoplasias mamarias malignas en la especie.

En esta terapia hormonal es central realizar análisis hematológicos en forma

rutinaria como son los niveles de progesterona, en este estudio permitió decidir el momento de aplicación del bloqueador de RP, administrándolo en la segunda mitad de la fase lútea, con un nivel sérico de progesterona que asegure la expresión de sus receptores en el tejido mamario.

Alentar la investigación en el tratamiento con este adyuvante en hembras caninas enteras también supone avanzar en modelos de extrapolación hacia la medicina humana. Este protocolo de AGLÉ demostró ser seguro, ya que no evidenció efectos colaterales. Por esta razón, este antiprogestágeno surge como potencial adyuvante en el tratamiento de perras con TGM malignos y garantiza futuros estudios en la especie.

## **CONCLUSIONES MAS RELEVANTES**

### **Estudio experimental I**

El tratamiento con aglepristone descendió los valores séricos de progesterona con significancia estadística en perras sin signos clínicos aparentes de TGM en fase luteal.

El tratamiento con aglepristone disminuyó significativamente la expresión de RP y del marcador nuclear Ki67 en perras sin signos aparentes de TGM en fase luteal.

### **Estudio experimental II**

El estadio clínico de perras con TGM malignos más frecuente en este estudio fue el II.

El tipo histológico de perras con TGM malignos más frecuente en este estudio fue el carcinoma simple.

El grado histológico de perras con TGM maligno más frecuente fue el II.

El AGLE aplicado como adyuvante en perras enteras con TGM malignos en los estadios clínicos I, II y III que fueron tratadas quirúrgicamente incrementó en forma significativa la SLE.

El AGLE aplicado como adyuvante en perras enteras con TGM malignos en los estadios clínicos I, II y III que fueron tratadas quirúrgicamente incrementó en forma significativa la SG.

El AGLE a las dosis utilizadas en este trabajo es seguro en pacientes caninos con

TGM.

## **BIBLIOGRAFIA**

Alenza M, Peña L, Castillo N, Nieto, A. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *Journal of Small Animal Practice*. 2000; 41: 287–291.

Allende M, del Amo A, Castellano, M, Idiart, J, Diessler, E. Análisis estadístico de tumores mamarios en perras a través de una perspectiva Bayesiana. Presentado en VI Congreso Internacional de Ciencias Veterinarias y II Seminari Internacional de Salud Animal. La Habana, Cuba. 2007.

Aupperlee M, Smith K, Kariagina A, Haslam S. Progesterone receptor isoforms A and B: temporal and spatial differences in expression during murine mammary gland development. *Endocrinology*. 2005;146: 3577-3588.

Axlund S y Sartorius C. Progesterone regulation of stem and progenitor cells in normal and malignant breast. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012; 357: 71-79.

Baan M, Taverne M, Kooistra H, De Gier J, Dieleman S, Okkens, A. Induction of parturition in the bitch with the progesterone-receptor blocker aglepristone. *Theriogenology*. 2005; 63: 1958-1972.

Baan M, Taverne M, De Gier J, Kooistra H, Kindahl H, Dieleman S. Okkens. Hormonal changes in spontaneous and aglepristone-induced parturition in dogs. *Theriogenology*. 2008. 69(4), 399-407.

Beauvai W, Cardwell J, Brodbelt, D. The effect of neutering on the risk of

mammary tumours in dogs a systematic review. *Journal of Small Animal Practice*. 2012; 53:314-322.

Benavente, M. Estudios sobre la población de receptores hormonales en neoplasias mamarias caninas y evaluación in vitro de terapias adyuvantes. Tesis Doctoral Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. 2018.

Bostock, D. E. The prognosis following the surgical excision of canine mammary neoplasms. *European Journal of Cancer*. 1975, 11(6), 389-396.

Bullwinkel J, Baron-Lühr B, Lüdemann A, Wohlenberg C, Gerdes J y Scholzen, T. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *Journal of Cellular Physiology*. 2006; 206: 624- 635.

Camargo O, Olivera M. Desarrollo de la glándula mamaria (mamogénesis). Fondo Editorial Biogénesis, 2007, p 35-141.

Chang, C, Tsai M, Liao, J, Chan W, Wong M, Chang C. Evaluation of hormone receptor expression for use in predicting survival of female dogs with malignant mammary gland tumors. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2009; 235: 391-396.

Chang S, Chang C, Chang T, Wong M. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998–2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2005; 227: 1625-1629.

Chau G. Frecuencia de neoplasias en glándula mamaria de caninos: estudio retrospectivo en el periodo 1992-2006 en la ciudad de Lima, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* .2013; 4: 72-77.

Clark J, Mani S. Actions of ovarian steroid hormones. In 'The Physiology of Reproduction'. (Eds E. Knobil and JD Neill.). 1994. p. 1011–1059.

Clemente M, De Andrés P, Peña L, Perez-Alenza M. Survival time of dogs with inflammatory mammary cancer treated with palliative therapy alone or palliative therapy plus chemotherapy. *Veterinary Record*. 2009; 165: 78-81.

Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart, M. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? *Annals of Oncology*. 2005; 16: 1723-1739.

Cooley D, Schlittler D, Glickman L, Hayek M, Waters D. Exceptional longevity in pet dogs is accompanied by cancer resistance and delayed onset of major diseases. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2003; 12.

Concannon P, Yeager A, Frank D, Iyampillai, A. Termination of pregnancy and induction of premature luteolysis by the antiprogestagen, mifepristone, in dogs. *Reproduction*. 1990. 88(1): 9-104.

Concannon P, Castracane V, Temple M, Montanez, A. Endocrine control of ovarian function in dogs and other carnivores. *Animal Reproduction Science*. 2009; 6: 172-193.

Concannon, P. Reproductive physiology and endocrinology patterns of the bitch. en: Kirk RW, editor. *Current Veterinary Therapy VIII*. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 1983: 86-901.

Corrada Y, Garcia P, De La Sota P, Huzman M, Landoni M, Gobello C. Decrease of body temperature after aglepristone treatment in bitches. *Animal Reproduction*

Science. 2005; 87: 295-299.

Della Cella Pérez C. Expresión de los receptores de estrógenos y de progesterona en tejido mamario normal y tumoral canino. Tesis Maestría en Salud Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional de La República, Uruguay. 2014.

De Las Mulas J, Millán Y, Dios R. prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor  $\alpha$  and progesterone receptorexpression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Veterinary Pathology*. 2005; 42: 200-212.

Dellman, Dieter. *Histología Veterinaria* (Ed. 2nd) Acribia. Buenos Aires, 1994, p. 344.

Diessler M. Carcinomas mamarios de caninos: influencia de variables histológicas e inmunohistoquímicas en el pronóstico. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional de La Plata. 2009.

Diessler, M., Castellano, M., Portiansky, E., Burns, S. y Idiart, J. Caninemammary carcinomas: influence of histological grade, vascular invasion, proliferation, microvessel density and VEGFR2 expression on lymph node status and survival time. *Veterinary and Comparative Oncology*. 2017; 15: 450-461.

Dobson J, Samuel S, Milstein H, Rogers K., Wood, J. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal of Small Animal Practice*. 2002; 43: 240-246.

Donnay I, Rauis J, Devleeschouwer N, Wouters-Ballhnan P, Leclercq G, Verstegen, J. Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in



normal and tumor mammary tissues. *Am J Vet Res.* 1995;56: 1188-1194.

Elston W, Ellis I. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 1991; 19: 403-410.

Egenvall A, Bonnett, B, Ohagen P, Olson P, Hedhammar A, Von Euler H. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Preventive Veterinary Medicine.* 2005; 69: 109-127.

Ferreira De La Cuesta G, Pedraza F. Caracterización y análisis de las neoplasias registradas en el laboratorio de patología animal de la Universidad de Antioquía durante 30 años 1968-1998. *Patología Veterinaria*, 2003, 573.

Fieni F, Marnet P, Martal J, Siliart B, Riou F, Bernard F. Hormonal variation in bitches after early and mid-pregnancy termination with aglepristone (RU 534). *J Reprod Fertil.* 2001; 57:245–50.

Galac S, Kooistra H, Butinar, J, Bevers M, Dieleman, S, Voorhout, G y Okkens, A. Termination of mid-gestation pregnancy in bitches with aglepristone, a progesterone receptor antagonist. *Theriogenology.* 2000; 3: 941-950.

Galac S, Kooistra H, Dieleman S, Cestnik V, y Okkens A. Effects of aglepristone, a progesterone receptor antagonist, administered during the early luteal phase in non-pregnant bitches. *Theriogenology.* 2004; 62: 494-500.

Geraldes M, Gärtner F, Schmitt F. Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous

mammary tumours. *Veterinary Record*. 2000; 146: 403-406.

Gerdes J, Li, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach, Stahmer I, Kloth S, Brandt, E y Flad H. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *The American Journal of Pathology*. 1983; 138:867.

Ghali W Quan H. Comparison of 2 methods for calculating adjusted survivalcurves from proportional hazards models. *Journal of the American Medical Association* 2001; 286: 1494-1497.

Ginel P, Lucena, R., Perez J., Mozos, E. Vesiculopustular dermatitis associated with cutaneous metastases of an inflammatory mammary carcinosarcoma in a bitch. *Veterinary Record*. 2000. 550-552.

Gobello C, Castex G, Klima L, Rodriguez R, Corrada Y. A study of two protocols combining aglepristone and cloprostenol to treat open cervix pyometrain the bitch. *Theriogenology*. 2003; 60: 901-908.

Gobello C, Corrada Y. Canine mammary tumors: An Endocrine Clinical Approach. *J. Small Animal Pract*. 2001; 23: 705-708.

Guil-Luna S, Millán Y, De Andres J, Rollón E, Domingo V, García-Macías J, de las Mulas, JM. Prognostic impact of neoadjuvant aglepristone treatment in clinicopathological parameters of progesterone receptor-positive canine mammary carcinomas. *Veterinary and Comparative Oncology*. 2017; 15: 391-399.

Guil-Luna S, Sánchez-Céspedes R., Millán Y, De Andrés F, Rollon E, Domingo V, de Las Mulas J. Aglepristone decreases proliferation in progesterone receptor-positive canine mammary carcinomas. *Journal of Veterinary Internal Medicine*.

2011; 25: 18-523.

Hagan C, Daniel A, Dressing, G. E., & Lange, C. A. Role of phosphorylation in progesterone receptor signaling and specificity. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012; 357(1-2): 43-49.

Hermo, G. Estudio de terapias adyuvantes con antiprogéstágenos y agentes antimetastásicos en neoplasias mamarias caninas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP; 2009.

Hermo G, Soldati R, Wargon V, Scursoni A, Lanari C, Gobello, C. Inmunohistoquímica y expresión de receptores de estrógenos y progesterona en neoplasias mamarias malignas caninas en distintos estadios clínicos. *Revista Científica*. 2010; 20: 245-253.

Hennighausen, Lothar; Robinson, Gertraud W. Information networks in the mammary gland. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2005, vol. 6, no 9, p. 715-725.

Hoffmann B, Schuler G. Receptors blockers-general aspects with respect to their use in domestic animal reproduction. *Anim Reprod Sci*. 2000; 60: 295- 312.

Illera, C, Pérez-Alenza D, Nieto A, Jiménez M., Silvan G, Dunner S, Peña L. Steroids and receptors in canine mammary cancer. *Steroids*. 2006;1: 548.

Im K, Kim N, Lim H, Kim H, Shin J, Sur J. Analysis of a new histological and molecular-based classification of canine mammary neoplasia. *Veterinary Pathology*. 2014; 51: 549-559.

Jacobsen B, Horwitz K. Progesterone receptors, their isoforms and progesterone

regulated transcription. *Molecular and cellular endocrinology*. 2012; 357: 18-29.

Kanca H, Kübra K. Effectiveness of aglepristone at lower-than-standard doses in prevention of pregnancy in mismated bitches." *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2012; 18: 517-521.

Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis T, Dessiris, A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *Journal of comparative pathology*, 2005; 133: 246-252.

Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis T, Dessiris, A. Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. *Journal of Veterinary Medicine Series A*. 2001; 48: 85-96.

Khan M, Luong T, Watkins J, Toumpanakis C, Caplin M.; Meyer T. A comparison of Ki-67 and mitotic count as prognostic markers for metastatic pancreatic and midgut neuroendocrine neoplasms. *British Journal of Cancer*. 2013; 108: 1838.

Kirsan I. Comparison of partial and total bilateral mastectomy in bitches with regard to early and late complications. *Indian Veterinary Journal*. 2005; 82: 662- 663.

Knutson T, Truong T, Ma S, Brady N, Sullivan M, Raj G, Schwertfeger K, Lange C. Posttranslationally modified progesterone receptors direct ligand-specific expression of breast cancer stem cell-associated gene programs. *Journal of Hematology & Oncology*. 2017; 10: 89.

Kowalewski P, Beceriklisoy H, Pfarrer C, Aslan S, Kindahl H, Küçükaslan I, Hoffmann, B. Canine placenta: a source of prepartal prostaglandins during normal and antiprogestin-induced parturition. *Reproduction*. 2010; 139: 655-664.

Lamb C, Vanzulli S, Lanari, C. Hormone receptors in breast cancer: more than

estrogen receptors. *Editorial Medicina Buenos Aires*. 2019. 79: p 540-545.

Lana S, Rutteman G y Withrow S. Tumors of the Mammary Gland. In: Withrow, S. J. Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology. Elsevier Health Sciences. 2007.

Lanari C, Lamb C, Fabris, V, Helguero L, Soldati R., Bottino M, Giulianelli, S, Cerliani J, Wargon, V. Molinolo A. The MPA mouse breast cancer mammary epithelial proliferation and carcinogenesis. *Nature*. 2009; 468: 103–107.

Lanari C, Lüthy I, Lamb C, Fabris V, Pagano E, Helguero L, Sanjuan, N, Merani S, Molinolo, A. Five novel hormone-responsive cell lines derived from murine mammary ductal carcinomas: in vivo and in vitro effects of estrogens and progestins. *Cancer Research*. 2001; 61:293-302.

Lange C, Richer K. Horwitz K. Hypothesis: progesterone primes breast cancer cells for cross-talk with proliferative or antiproliferative signals. *Molecular Endocrinology*. 1999; 13: 829-836.

Lavalle G, De Campos C, Bertagnolli A, Cassali G. Canine malignant mammary gland neoplasms with advanced clinical staging treated with carboplatin and cyclooxygenase inhibitors. *In Vivo*. 2012; 26: 375-379.

Lima S. Tumor mamário canino: estudo in vitro, imunomarcção e ação da doxorubicina. Tesis Doctorado - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária. 2014.

Linde-Forsberg C, Kindhal H, Madej, A. Termination of midterm pregnancy in the dog with oral RU 486. *Journal of Small Animal Practice*. 1992; 33(7):331-336.

Linde-Forsberg, C. Monitoreo preciso del ciclo estral de la perra para la inseminación artificial. Facultad de Veterinaria .1996.

Liu S, Dontu G, Wicha MS. Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. *Breast Cancer Res.* 2005; 7 (3): 86-95.

Mangieri J. 3er Edición. Buenos Aires, Argentina, Oncología Prensa Veterinaria. Argentina. 1994; 131.

McEwen D, Sanchez M. Complications associated with excision of a submandibular salivary gland tumor. *AORN Journal.* 1996; 64: 109-111.

Merlo D, Rossi L, Pellegrino C., Ceppi M, Cardellino U, Capurro C, Ratto A, Sambucco P, Sestito V, Tañara G, Bocchini V. Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *Journal of Veterinary Internal Medicine.* 2008; 22: 976-984.

Merlo W, Rosciani A, Infrán R, López J, Macció O. Análisis de parámetros histopatológicos y clínicos en pacientes caninas con neoplasias mamarias tratadas con tamoxifeno. *Revista Veterinaria.* 2010; 21(1): 34-37.

Millanta F, Calandrella M, Bari G, Niccolini M, Vannozzi I, Poli A. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Res. Vet Sci.* 2005, 79:225-232.

Misdorp W. Histological classification of the mammary tumors of the dog and the cat. *World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals second series.* 1999, 7: 1-59.

Misdorp, W. Tumors of the mammary gland. *Tumors in domestic animals.*

2002; Pág. 575-606.

Mol J, Van Garderen E, Rutteman G, Rijnberk, A. New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary gland of dogs, cats and humans. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1996; 57: 67-71.

Mora Montero O. Uso del aglepristone como tratamiento de piometra en perras. Tesis. Universidad De Lasalle Bogotá, Colombia. 2010.

Morris J, Dabson J, Bostock D. Use of tamoxifen in the control of canine mammary neoplasia. *Veterinary Rec*. 1993; 133(22): 539-542.

Muller A, Guaguère, E. Métastasescutanées. *Guidepratique de dermatologie canine*. Kalianxis. 2006; 521-525.

Nemere I, Pietras R, Blackmore P. Membrane receptors for steroid hormones: signal transduction and physiological significance. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2003; 88: 438-445.

Nieto A, Peña L, Pérez-Alenza M, Sánchez M, Flores J, Castaño, M. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: Clinical and Pathologic Associations and Prognostic Significance *Veterinary Pathology*. 2000; 37: 239-247.

Nunes F. Diagnóstico, prognóstico e tratamento dos carcinomas de glândulas mamárias de cadelas atendidas no hospital veterinário da UFMG, estudo retrospectivo. Tesis Maetria. Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. 2015

O'Neill D, Church D, McGreevy P, Thomson P, Brodbelt D. Longevity and mortality of owned dogs in England. *The Veterinary Journal*. 2013; 198: 638-643.

Oguejiofor C, Ochiogu C, Uchendu A. Changes in peripheral hormone levels after mid-gestation termination of pregnancy with aglepristone in rats. *Vet Arhiv*. 2013; 81-91.

Owen L. *TNM Classification of Tumours in Domestic Animals*. edited by LN Owen (No. VPH/CMO/). Geneva: World Health Organization. 1980; 80: 20.

Peña L, Perez-Alenza M, Rodriguez-Bertos A, Nieto A. Canine inflammatory mammary carcinoma: histopathology, immunohistochemistry and clinical implications of 21 cases. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2003; 78: 141-148.

Philibert C, Snyder P, Glickman N, Glickman L, Knapp D, Waters D. Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2003; 17:102-106.

Polisca A, Scotti L, Orlandi, R, Brecchia G, Maranesi M, Zerani M y Boiti, C. Aglepristone (RU534) administration to non-pregnant bitches in the mid-luteal phase induces early luteal regression. *Theriogenology*. 2010; 74: 672-681.

Prieto Ocejó, D. Fisiología de la lactación. En: *Fisiología Veterinaria*. García Sacristán, A. Madrid, España. Editorial Interamericana-McGraw-Hill. 1995 p. 893–914.

Ramos Vega, S. Cirugía selectiva o "a la carta" como tratamiento de las neoplasias mamarias caninas. Tesis doctoral. Universidad De Las Palmas De Gran Canaria. Facultad de Veterinaria. 2015.



Richards H, McNeil P, Thompson H, Reid S. An epidemiological analysis of a canine-biopsies database compiled by a diagnostic histopathology service. *Preventive Veterinary Medicine*. 2001; 51: 125–136.

Rutteman G, Misdorp W. Hormonal background of canine and feline mammary tumours. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement. 1993; 47: 483-487.

Rutteman G, Misdorp W, Blankenstein M, Van Den Brom W. Estrogen and progesterin receptors in mammary tissue of the female dog: Different receptorprofile in nonmalignant and malignant states. *Breast Cancer*. 1988; 58: 594–599.

Sharma S, Sharma M, Sarkar C. Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprognostic perspective and significance of neoangiogenesis. *Histopathology*. 2005; 46: 481-489.

Schneider C, Dorn D, Taylor A, Factors influencing canine mammary cancer development and postchirurgical survival. *J. Natl. Cancer Inst*. 1969; 43: 1249-1261.

Schramek D, Leibbrandt A, Kenner L, Pospisilik J, Lee H, Hanada R, Joshi, P, Aliprantis A, Glimche L, Pasparakis M, Khokha R, Ormandy Ch, Widschwendter M, Schet G, Pasparakis, M differentiation factor RANKL controls development of progesterin-driven mammary cancer. *Nature*. 2010. 468:7320, 98.

Selman P, Mol J, Rutteman G, van Garderen E, Rijnberk A. Progesterin-induced growth hormone excess in the dog originates in the mammary gland. *Endocrinology*. 1994; 134(1): 87-292.

Simon D, Schoenrock D, Baumgärtner W, Nolte, I. Postoperative adjuvant treatment of invasive malignant mammary gland tumors in dogs with doxorubicin

and docetaxel. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2006; 20: 1184-1190.

Sleeckx N, De Rooster H, Veldhuis Kroeze E, Van Ginneken, C, Van Brantegem, L. Canine mammary tumours, an overview. *Reproduction in Domestic Animals*. 2011; 46: 1112-1131.

Soldati R, Wargo V, Cerliani J, Giulianelli S, Vanzulli S, Gorostiaga M, Bolado J, do Campo P, Molinolo A, Vollmer G, Lanari, C. Inhibition of mammary tumor growth by estrogens: is there a specific role for estrogen receptors alpha and beta? *Breast cancer Research and Treatment*. 2010; 123: 709- 724.

Sorenmo K. Canine mammary gland tumors. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*. 2003;33: 573-596.

Sorenmo K, Kristiansen V, Cofone M, Shofer F, Breen A, Langeland M, Goldschmidt M. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Veterinary and Comparative Oncology*. 2009; 7: 162-172.

Sorenmo K, Rasotto R, Zappulli V, Goldschmidt, M. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Veterinary Pathology*. 2011; 48:85-97.

Sorenmo K, Worley D, Goldschmidt M. Tumors of the mammary gland. In: Withrow, Macewen's *Small Animal Clinical Oncology*. (5th Ed) St, Louis, MO, Saunders/Elsevier. 2012; 538-556.

Stratmann N, Faling A, Richter A, Wehrend A. Mammary Tumor Recurrence In: Bitches After Regional Mastectomy. *Veterinary Surgery*. 2008; 37: 82-86.

Tavares W, Lavalle G, Figueiredo M, Souza A, Bertagnolli A, Viana F, Cassali G.

Evaluation of adverse effects in tamoxifen exposed healthy female dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2010. 52(1), 1-6.

Torres P. Efecto de la extensión de la cirugía y un antimestatásico en laprogresión de tumores y de un antiprogéstágeno en glándula mamaria canina. Tesis doctoral Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Veterinaria. 2009.

Trasch, K, Wehrend A, Bostedt, H. Follow-up examinations of bitches after conservative treatment of pyometra with the antigestagen aglepristone. *Journal of Veterinary Medicine Series A*. 2003; 50: 375-379.

Vanzulli I, Soldati R, Meiss R, Colombo L, Molinolo A, Lanari, C. Estrogen or antiprogesterin treatment induces complete regression of pulmonary and axillary metastases in an experimental model of breast cancer progression. *Carcinogenesis*. 2005; 26(6): 1055-1063.

Sirvent M. Correlación de factores pronósticos clínicos, histopatológicos e inmunohistoquímicos en lesiones neoplásicas mamarias malignas en la especie canina. Tesis doctoral. Universidad de Extremadura. 2016.

Vidales G, Espinosa L, Botero, E. Estudio histopatológico retrospectivo de neoplasias de glándula mamaria en caninos (1975-2000). *Orinoquia*. 2008; 12: 80-88.

Wang Z, Zhang X, Shen P, Loggie B, Chang Y, Deuel, T. A variant of estrogen receptor- $\alpha$ , hER- $\alpha$ 36: transduction of estrogen-and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006; 103: 9063-9068.

Waters D. Longevity in pet dogs: understanding what's missing. *Veterinary Journal*,

London, England. 1997; 2014:200-2003.

Wei M, Xu J, Dignam J, Nanda R, Sveen L, Fackenthal J, Olopade O. Estrogen receptor  $\alpha$ , BRCA1, and FANCF promoter methylation occur in distinct subsets of sporadic breast cancers. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2008; 111:113-120.

Withrow S. *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*. Elsevier Health Sciences. 2007; 15: 17.

Yang W, Liu C, Chang C, Lee C, Chang K, Lin C. Proliferative activity, apoptosis and expression of oestrogen receptor and Bcl-2 oncoprotein in canine mammary gland tumours. *Journal of Comparative Pathology*. 2006; 134: 70-79.

Zatloukal J, Lorenzova J, Tichý F, Nečas A, Kecova H, Kohout, P. Breed and age as risk factors for canine mammary tumours. *Acta Veterinaria Brno*. 2005; 74: 103-109.

## **ANEXO I**

### **Protocolo anestésico**

En todas las intervenciones se realizó una premedicación, con sulfato de atropina (Atropina, John Martin; 0,04 mg/kg SC), maleato de acepromacina (Acedan, Holliday-Scott; 0,10 mg/kg ev junto con Tramadol 1mg/ev) y Propofol (Propovet 1,0 g Richmond; 8mg/kg; IV lento), una vez intubado se mantuvo la anestesia con isofluorano 1,7 vol % y oxígeno, distribuido por sistema cerrado. Como analgésico postquirúrgico ketoprofeno 1mg/24 h IM y antibióticoterapia con monohidrato de cefalexina (Cefal laboratorio AFFORD) 24 mg / 8 h /7 días PO.

## ANEXO II

### Determinación por inmunohistoquímica de RP y antígeno Ki-67

#### Técnica de la Peroxidasa

- 1- Obtener cortes de 3 micras de espesor y acondicionarlos sobre portaobjetos positivados (GENEX, USA).
- 2- Mantener en estufa a 37°C durante las 24 h previas al procedimiento.
- 3- Desparafinar: 3 pasajes por xilol, de 10 min cada uno (observar que el xilol no esté hidratado, con burbujas o turbio).
- 4- Hidratar con 2 pasajes por alcohol 100° de 5 min cada uno. 2 pasajes por alcohol 96° de 5 min cada uno 1 pasaje por alcohol 70° de 5 min.
- 5- Lavar con PBS pH 7,4; 2 veces durante 10 min.
- 6- Quitar el exceso de PBS e incubar con solución de peróxido de hidrógeno al 3 % (para inactivar la peroxidasa endógena) 20 min.
- 7- Lavar 2 veces con PBS cada 5 min cada uno.
- 8- Se realizó tratamiento de recuperación antigénica con un microondas de uso doméstico.
- 9- Colocar los cortes en jarras de Koplín de plástico sin tapar, sumergidos en
- 10- Buffer de citrato 0,01 molar, pH 6,0. Colocar siempre el mismo número de jarras cerca del centro del plato giratorio, con un número fijo de preparados (3 ó 4); agregar portaobjetos vacíos si es necesario.
- 11- Irradiar a potencia 100 % en baño maría durante 3 min repetir potencia 50 por 9 min.
- 12- Reponer el buffer de citrato evaporado y repetir la operación con los mismos

parámetros.

- 13- Dejar enfriar 20 min en el buffer.
- 14- Realizar 2 lavados de PBS durante 5 min cada uno.
- 15- Colocar bloqueante de biotina endógena (Avidin-biotin-blocking-reagents Cell Marque, USA).
- 16- Incubar con avidina 10 min.
- 17- Realizar un Baño con PBS durante 5 min. 12- Incubar con Biotina 10 min.
- 18- Lavar 2 veces con PBS por 5 min cada uno.
- 19- Permeabilizar la membrana nuclear con triton X 100 al 0,1 % en PBS durante 5 min
- 20- Bloquear la adherencia inespecífica mediante la incubación durante 30min con suero equino diluido en PBS (1/100) a temperatura ambiente.
- 21- Agregar los anticuerpos primarios anti-RP; PR-20 laboratorio Santa Cruz Biotechnology, Inc. concentración 1:200 para la inmunomarcación de los receptores de progesterona, o para inmunomarcación de Ki-67 el antígeno monoclonal Ki-67 NCL del laboratorio Leica Biosystems, Novocastra Lab, Newcastle, United Kingdom una dilución de 1:100.
- 22- Incubar a 4 C° toda la noche.
- 23- Realizar 2 lavados con PBS de 5 min cada uno.
- 24- Incubar con los anticuerpos secundarios biotinilados inmunoglobulina anti, anticuerpos de conejo, ratón y cabra (Cytoscan Biotinylated Link, Cell Marque, USA) durante 30 min a temperatura ambiente con cobertura de film.
- 25- Lavar 2 veces con PBS dos baños de 5 min cada uno.
- 26- Colocar estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (Cytoscan TM HRP

Detection System, Cell Marque, USA) durante 30 min

- 27- Lavar con PBS dos veces por 5 min.
- 28- Revelar con solución cromógena diaminobenzidina (DAB Substrate Kit, Cell Marque) durante 15 min control de microscopio óptico).
- 29- Cortar la coloración con un pasaje bajo agua corriente y luego lavar con agua destilada.
- 30- Contrastar los preparados con hematoxilina activada por 1 minuto (Biopur, Argentina)
- 31- Cubrir con agua corriente durante 10 min para que vire el colorante.27- Lavar con agua destilada.
- 32- Realizar un pasaje por alcohol 70 en 1 minuto.29- Realizar 2 pasajes por alcohol 96 en 1 minuto
- 33- Realizar 2 pasajes por alcohol 100 en 1 minuto. Ecurrir.
- 34- Sumergir en xilol 2 min.
- 35- Montar con un medio de montaje sintético (Canadax®, Biopur Argentina).

El control negativo se trata igual que las muestras con el reemplazo del anticuerpo primario por PBS. Las muestras fueron observadas al microscopio (Axiophot, Carl Zeiss, Göttingen, Alemania). La adquisición de imágenes se realizó a través de una cámara digital (Powershot G6, 7.1 megapixels, Canon INC, Japón), adosada al microscopio.