



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de

DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

**EFFECTO DE LA EXTENSION DE LA CIRUGIA Y UN ANTIMETASTASICO EN LA
PROGRESION DE TUMORES Y DE UN ANTIPROGESTAGENO EN GLANDULA
MAMARIA CANINA**

DIRECTOR: Dra. CRISTINA GOBELLO, DECAR
CODIRECTORA: Dra. CECILIA MERKIS
AUTORA: M.V. PERLA TORRES

LUGAR DE TRABAJO:
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

MIEMBROS DEL JURADO:
DRA. JORGELINA ECHEVERRIA
DRA. MIRTA KONCURAT
DR. LUCAS COLOMBO

AÑO: 2009

DEDICATORIA

"Solo es útil el conocimiento que nos hace mejores"

Sócrates

A los seres que amo...

...a mi esposo, Cacho, a mis hijos, Romina, Mauro, Franco y Gastón, a mi nieta Julieta y a mi madre, Elvira.

A los seres que quiero...

...a mi familia grande, tíos y primos, a mis suegros y cuñados, a mi yerno Germán, a mis amigos y compañeros.

Y a los que extraño...

...a mi padre, a mis primos Hugo y Norma, a mis tíos, a mi abuela y a mis amigas, Ester y Gladys.

AGRADECIMIENTOS

- Deseo agradecer en primer lugar y muy especialmente a mi Directora Dra. Cristina Gobello quien orientó con dedicación, sabiduría y paciencia mi interés por la investigación científica.
- A mi Codirectora Dra. Cecilia Merkis y a todos sus colaboradores del Área de Microscopía Electrónica de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad de Rio Cuarto, por su invaluable apoyo y ayuda en la realización de los estudios inmunohistoquímicos incluidos en esta Tesis. Por la calidez humana que siempre demostró, lo que me permitió trabajar en un ámbito de profunda cordialidad.
- Al Dr. Daniel Alonso, Investigador de la Universidad Nacional de Quilmes, quien enriqueció mi visión científica y me introdujo en el aspecto molecular de la oncología. Asimismo a todos los integrantes de su equipo de investigación, por la colaboración recibida para realizar el estudio del antimetastásico desmopresina que forma parte de esta Tesis.
- A la memoria del Dr. Nelson Selfero Audisio, que me inició en la docencia y la investigación. A mis compañeros de cátedra que doblaron su esfuerzo y trabajo y me brindaron todo cuanto estuvo a su alcance para sortear cualquier dificultad.
- A los docentes, técnicos y alumnos del equipo de trabajo que colaboraron siempre y en cualquier circunstancia.

- A la Dra. Yanina Corrada y al Médico Veterinario Guillermo Hermo que me brindaron ayuda material y conocimientos para avanzar en mis tareas.
- A la Sociedad Protectora de Animales de General Pico por el reconocimiento de nuestra tarea en investigación canina y consecuente donación de los caninos utilizados en algunos experimentos.
- A los Bioquímicos, Sergio y Oscar Riesco, a la Patóloga Laura Moiraghi y a los colaboradores de ambos laboratorios por adecuar y contribuir desde su área en las determinaciones hormonales y procesamiento de muestras histológicas, respectivamente. Sus responsabilidades y calidad en los procedimientos calificaron esta tesis.
- Al Señor Fernando Doti del Laboratorio Ruminant S.A distribuidores en Argentina de productos del Laboratorio Virbac S.A. por la provisión del fármaco Aglepristone (Alizin) para la realización de esta Tesis.
- A la empresa Royal Canin de Argentina por la provisión de alimento para los caninos incluidos en los experimentos.
- Al Estudio Suyai por el diseño y producción gráfica de esta Tesis.
- A todos los colegas y propietarios de las hembras caninas portadoras de tumores mamarios que confiaron en mí y me permitieron incluir a sus pacientes y mascotas en los experimentos.

- A la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa que financió los proyectos de investigación realizados para esta Tesis y al Hospital Escuela que proporcionó pacientes, espacio y recursos humanos.

- Finalmente a todas las personas que de una u otra manera hicieron posible este objetivo, a los buenos momentos, a las dificultades y complicaciones porque añadieron fuerzas y me permitieron crecer.

PUBLICACIONES PARCIALES

- **Evaluación del efecto de la desmopresina en caninos con neoplasias mamarias. Resultados preliminares.** 4tas. Jornadas Internacionales de veterinaria práctica de pequeños, grandes animales y bromatología. Hermo, G.; Torres, P.; García, P.; Corrada, Y.; Ripoll, G.; Audisio, S.; Gomez, D.; Alonso, D.; Gobello, C. Organizado por el Colegio de Veterinarios de la provincia de Buenos Aires. Mar del Plata. Argentina, 5 y 6 de Agosto de 2005. Posters. *Nominación: Mejor presentación.*
- **Evaluación del efecto de la desmopresina en caninos con neoplasias mamarias: resultados preliminares.** Jornadas de Ciencia y Técnica. Torres P.; Hermo G.; Audisio S.; D´Amico G[†]; Adagio L.; Hierro J.; Verna E.; García P; Gomez D.; Alonso D.; Audisio N.; Gobello C. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Pampa, 18 de Noviembre de 2005. Poster.
- **Evaluación de la desmopresina (DDAVP) perioperatoria en caninos con tumores mamarios espontáneo.** 50° Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Ripoll, G.; Hermo, G.; Torres, P.; Gobello, C.; Gomez, D; Alonso, D. Mar del Plata. Argentina, Noviembre de 2005.
- **Evaluation of perioperative desmopressin in dogs with spontaneous mammary gland tumors.** World Congress 2006 WSAVA/FECAVA/CSAVA. Hermo, G.; Torres, P.; Ripoll, G.; Gomez, D.; Alonso, D.; Gobello. C. Praga. Republica Checa, 11 de Octubre 2006. Poster.

- **Evaluación del efecto de la desmopresina (DDAVP) en caninos con tumores mamarios.** Torres, P.; D'Amico, G[†]; Adagio, L.; Audisio, S.; Hierro, J.; Alonso, D.; Gobello, C. Jornadas de Ciencia y Técnica. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Pampa, 27 de Octubre de 2006. Resúmen.
- **Evaluación de la desmopresina (DDAVP) perioperatoria en caninos con tumores mamarios espontáneos.** Ripoll, G.; Hermo, G.; Torres, P.; Gobello, C.; Gomez, D.; Alonso, D. Revista Medicina. Buenos Aires. Argentina 65 (2):73-74, 2005.
- **Tumores de mama en la perra (revisión).** Hermo, G.; Garcia, M.; Torres, P.; Gobello, C. Revista "Ciencia Veterinaria" Año 2005. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la Pampa. Versión on line publicada en la página de la FCV. UNLPam www.vet.unlpam.edu.ar
- **Perioperative desmopressin prolongs survival in surgically treated bitches with mammary gland tumours: A pilot study.** Hermo, G.; Torres, P.; Ripoll, G.; Scursoni, A.; Gomez, D. Alonso, D.; Gobello, C. The Veterinary Journal 178:103–108, 2008.
- **Relación de la extensión de la cirugía de tumores mamarios caninos y el tiempo de sobrevida libre de enfermedad y general. Estudio preliminar.** Torres, P.; Audisio, S.; Vaquero, P.; Verna, E.; Adagio, L.; DAMico, G[†]; Maria, A.; Wheeler, T. IX Seminario – Taller Argentino de la Enseñanza de la Cirugía y Anestesiología. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto, 28 y 29 de noviembre de 2008. Exposición oral.

- **Efecto de la extensión de la cirugía en tumores mamarios caninos** Torres, P.; Audisio, S.; Vaquero, P.; Verna, E.; Adagio, L.; Maria, A.; Hierro J. Meder, A.; Galeano M. F.; Lattanzi D.; Ríos F.; Cesán, R.; Wheeler. VI Jornada de Ciencia y Técnica Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional de La Pampa, 7 y 8 de Agosto de 2009. Poster.

PROLOGO

El presente trabajo de Tesis representa un objetivo alcanzado y a la vez un nuevo desafío para continuar. Es el fruto de un período de trabajo de un equipo que organizó sus tiempos y buscó los espacios necesarios. Es el esfuerzo conjunto y multidisciplinario que conjugó voluntad, conocimiento y entusiasmo para esclarecer algunas dudas y plantear nuevos interrogantes en la investigación de los tumores de glándula mamaria canina y aspectos hormonales de la glándula mamaria normal.

Esta Tesis consta de ensayos aplicados para el tratamiento del cáncer mamario, con avances en la puesta a punto de un protocolo perioperatorio antimetastásico y también se evalúan dos técnicas de resección tumoral mamaria. Incluye además, una parte de experimentos básicos sobre receptores de progesterona realizados en glándula mamaria canina al tiempo que proporciona un modelo experimental para posteriores estudios aplicados a fin de esclarecer la acción de la progesterona en la mamogénesis y en el desarrollo de los tumores mamaros. Se ha obviado la descripción detallada de técnicas y hallazgos rutinarios de metodologías ya reportadas en la literatura. Por el contrario, se describen con minuciosidad técnicas y conceptos originales.

La escritura está ordenada por capítulos que representan experiencias independientes a fin de una mayor organización, claridad y para resguardar el rigor científico. Sin embargo frente al cáncer de mama, no se puede hablar de un tratamiento en particular puesto que no es una

enfermedad sino el conjunto de varias enfermedades provocadas por la supervivencia de clones celulares excepcionales que desconocen el ambiente que los originó, por esto requiere acciones multifocales. Se espera que esta obra cumpla con las expectativas mencionadas y resulte un inicio para futuros estudios.

ABREVIATURAS

AGLE: aglepristone

BMD: biopsia mamaria derecha

BMI: biopsia mamaria izquierda

CC: carcinoma complejo

CCE: carcinoma de células escamosas

CS: carcinoma simple

DAB: diaminobenzidina

DDAVP: desmopresina

FVW: factor de von Willebrand

IM: intramuscular

IV: intravenosa

KI67: proteína nuclear marcadora de proliferación

MB: mastectomía en bloque

MS: mastectomía simple

OS: osteosarcoma

P₄: progesterona

PBS: buffer fosfato salino

PLA: placebo

RE: receptor de estrógeno

RP: receptor de progesterona

RU 486: mifepristone

S: sólido

SC: subcutánea

SG: sobrevida general

SLE: sobrevida libre de enfermedad

TGM: tumores de glándula mamaria

TP: túbulo papilar

ZK 98299: onapristone

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN – SUMMARY	1
INTRODUCCION GENERAL	3
CAPITULO I	
<i>Efecto de la extensión de la cirugía de tumores mamarios sobre el tiempo de sobrevida libre de enfermedad y general</i>	17
CAPITULO II	
<i>Estudio del efecto de la desmopresina en la sobrevida libre de enfermedad y general en perras con tumores mamarios tratadas quirúrgicamente</i>	30
CAPITULO III	
<i>Estudio del efecto del antagonista de progesterona, el aglepristone, en tejidos mamarios caninos</i>	45
CONCLUSIONES FINALES	58

RESUMEN

Palabras clave: antiprogestágeno - cirugía - desmopresina - tumores mamarios caninos.

Los tumores de glándulas mamarias (TGM) son las neoplasias más prevalentes de la hembra canina. Las hormonas sexuales tienen un papel fundamental en su etiopatología. Uno de los objetivos de este Trabajo de Tesis fue el de contribuir al esclarecimiento del papel proliferativo de la progesterona en el tejido mamario. Para esto, se usó un bloqueante de los receptores de progesterona (RP), el aglepristone, en seis perras en fase lútea y se describió la expresión de estos receptores y de la proteína nuclear marcadora de proliferación, Ki-67, en tejido mamario. Además, ante la necesidad de encontrar técnicas quirúrgicas y opciones adyuvantes para esta enfermedad se evaluó los efectos un antimetastásico, la desmopresina y de la extensión de la resección quirúrgica (mastectomía simple vs. en bloque) en la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y general (SG). Cuarenta y tres perras enteras con TGM (estadios I al IV) fueron incluidas en dos grupos independientes con diseños experimentales prospectivos, aleatorizados y con grupo control. En todos los casos, los datos obtenidos se analizaron estadísticamente donde se incluyeron pruebas de Kaplan-Meier. Con el número de animales aquí estudiado no se detectaron diferencias significativas en el SLE y SG entre las dos técnicas mastectomía. Por su parte, la desmopresina tuvo un efecto beneficioso significativo sobre las mismas variables. Finalmente, el aglepristone, disminuyó significativamente la expresión de los RP y Ki-67 en tejidos mamarios. Estos resultados alientan, a la continuación de estudios terapéuticos orientadas a estos blancos moleculares. Reevaluar los efectos no significativos y corroborar los positivos en un mayor número de animales.

SUMMARY

Key words: antiprogesterin - surgery-desmopresin- canine mammary tumor

Mammary gland tumors (MGT) are the most prevalent neoplasia of the female dogs and sexual hormones have a fundamental role on its etiopathology. One of the aims of this Thesis was to contribute to the understanding of the progesterone proliferative role on canine mammary tissue. For this purpose, a progesterone receptor blocker, aglepristone, was administered to six diestrous bitches to describe the expression of progesterone receptors (PR) and the nuclear proliferation marker, Ki-67, on mammary tissue. In order to find out new surgery and adjuvant therapies the effect of an antimetastatic, desmopresin, and surgery extension (simple vs. block mastectomy) was evaluated on disease free (DF) and overall survival (OS). Forty-three intact bitches suffering from MGT (stage I to IV) were included in two separate randomized controlled trials. Obtained data were statistically analyzed including Kaplan-Meier test. Using this number of dogs, no significant difference in DF and OS could be detected between the two mastectomy techniques. Conversely, desmopresin had a beneficial effect on both variables. Finally, aglepristone significantly decreased PR y Ki-67 expression on mammary tissue. These results warrant further therapeutic studies focused on these molecular targets. Reevaluation of our non- significant results on a larger number of animals is also planned.

INTRODUCCION GENERAL

Los tumores de glándula mamaria (TGM) son las neoplasias prevalentes en la perra (1, 2), representan aproximadamente el 42% de la totalidad de los tumores en los caninos y el 82% de los que aparecen en los órganos reproductores femeninos (3).

Entre los factores de riesgo de los TGM se describe la edad avanzada, siendo la edad media de inicio de la enfermedad los 6 a 7 años (4). No existe un criterio definido con respecto a la predisposición racial, algunos estudios han encontrado menor incidencia en perras mestizas que en puras (5,6). Otros no reportan predisposición racial alguna (7). También se encontraron diferencias entre hembras y machos siendo muy raros los TGM en estos últimos (8-12).

El factor hormonal está involucrado en el desarrollo de los TGM (13,14). Los estrógenos y la progesterona endógenos tienen un papel central en la etiología del TGM (15,16). Actúan a través de sus receptores nucleares y son esenciales para el desarrollo normal y diferenciación de la glándula. También, es bien conocido el efecto protector de la ovariectomía temprana sobre estas neoplasias (17).

La glándula mamaria experimenta cambios cíclicos en respuesta a la estimulación ovárica. Así por ejemplo, en la fase lútea humana el índice de proliferación aumenta (18-20). En la perra, la progesterona endógena y los progestágenos inducen la síntesis de la hormona del crecimiento en condiciones normales y tumorales de la glándula mamaria (21-26). También la

administración de progestágenos de larga acción para la prevención del estro se asoció con TGM benignos (21, 27-29).

En la especie canina los receptores para estrógeno y progesterona (RE, RP) se encuentran en el tejido glandular mamario normal, en un 70 % de los TGM benignos y en un 50 % de los malignos (6,7, 30,31). Los tumores que poseen receptores hormonales son más diferenciados y de conducta menos agresiva que aquellos que no los poseen (31-34). Además, la concentración de RE y RP decrece con el incremento del tamaño del tumor (34,35) y su presencia es muy poco frecuente en las metástasis (36), indicando un patrón autónomo de crecimiento. En humanos los tumores positivos a los RE y/o RP responden a la terapia de ablación endocrina, pero los tumores que carecen de tales receptores no lo hacen y se los consideran de peor pronóstico (37).

El pronóstico de esta enfermedad neoplásica está influenciado negativamente por factores como el tamaño del tumor, la invasión sanguínea y linfática, la metástasis a los linfonódulos regionales o a distancia; la infiltración a los tejidos adyacentes, la ulceración; la ausencia o disminución de receptores hormonales, el grado histológico avanzado y la tasa de crecimiento rápida.

La sobrevida general de estas neoplasias se ubica entre los 4 a 17 meses, siendo los sarcomas los de peor pronóstico (14,38). Los tumores malignos suelen dar metástasis dentro de los 2 años luego de realizada la cirugía. A pesar de que los pulmones son la localización más frecuente de las metástasis, también pueden presentarse en cerebro, hígado, riñones, corazón, linfonódulos abdominales, adrenales y hueso. También, las perras que desarrollaron TGM

tanto benignos como malignos están en mayor riesgo de desarrollar TGM malignos en un futuro cercano (4,31).

El diagnóstico histopatológico de TGM es fundamental para anticipar el comportamiento del tumor luego de la exéresis quirúrgica y para implementar un plan quimioterapéutico posoperatorio apropiado (39).

El tratamiento de elección de los TGM es la mastectomía, aunque la cirugía no asegura la curación en casos malignos (40). Queda demostrado por la alta tasa de mortalidad en pacientes caninos intervenidos quirúrgicamente (41-44). Existe escasa y controvertida información sobre el papel de la extensión de la cirugía en el pronóstico del cáncer de mama canino. Para algunos autores la extensión de la escisión quirúrgica no tendría influencia alguna en el pronóstico de los TGM (45,46). Además, la manipulación del tumor durante el acto quirúrgico, puede provocar la liberación de células tumorales viables hacia la circulación sanguínea o los ganglios regionales (47-51).

Por lo anteriormente expuesto, los caninos con estadio III clínicamente malignos y aquellos con tumores de cualquier tamaño con evidencia de invasión a tejidos adyacentes o linfáticos (estadio IV) (25, 31, 52) son candidatos para la terapia adyuvante. Sin embargo, se torna difícil recomendar al propietario de un animal la aplicación de dicha terapia luego de la cirugía, por la poca información publicada que apoya su uso. El uso de quimioterapia adyuvante, además de provocar efectos adversos (31, 39, 53,54), es incierto y su efecto en la sobrevida no ha sido claramente documentado (12, 30, 39, 52, 54,55).

La acción local y la regulación mediada por hormonas vía receptores es un área en pleno desarrollo. Contar con un modelo experimental para el esclarecimiento del papel de la

progesterona y su acción proliferativa en el desarrollo mamario normal en la especie, resulta muy interesante. Esto permitirá a futuro inferir su acción en la carcinogénesis del tejido mamario canino.

Dentro de los tratamientos, cabe mencionar que se ha desarrollado ampliamente en medicina humana la hormonoterapia. Sin embargo, el uso de antiestrógenos como el tamoxifeno está restringido en el canino debido a los severos efectos secundarios que posee, como metritis, piómetra e hiperplasia vaginal (56,57). Otros fármacos antihormonales que se investigaron son los antiprogestágenos. Este grupo de drogas, incluye el onapristone (ZK 98.299), el mifepristone (RU 486) y el ZK 112.993, entre otros, compiten por los RP con una gran afinidad evitando que la progesterona desarrolle sus efectos biológicos (58).

Los antiprogestágenos han demostrado poseer acción antitumoral y antimetastásica en roedores (59,60), líneas celulares humanas (61) y cáncer mamario en humanos (62-64). La disponibilidad de antiprogestágenos como aglepristone (RU 534) en el mercado veterinario de algunos países, plantea la posibilidad de su uso en el tratamiento de los TGM caninos. A pesar de admitirse los efectos proliferativos y carcinogénicos de la progesterona, sobre el tejido mamario de las perras (65) muy poco se conoce sobre el mecanismo de su acción.

La desmopresina (DDAVP) es un análogo sintético de la hormona antidiurética con propiedades hemostáticas que ha sido usada en humanos y en caninos con diabetes insípida y enfermedad de von Willebrand (66-68). La DDAVP inhibió la colonización pulmonar experimental de células de cáncer mamario altamente agresivas (69) y disminuyó dramáticamente las metástasis a distancia y a nódulos linfáticos en un modelo murino

sometido a manipulación tumoral y extirpación quirúrgica (51). Considerando las propiedades antimetastásicas, hemostáticas, la DDAVP podría ser un candidato excelente para la terapia adyuvante en la cirugía de TGM.

Por lo anteriormente expuesto, surge la necesidad de encontrar técnicas quirúrgicas y opciones adyuvantes eficaces y seguras que garanticen una mayor supervivencia y una mejor calidad de vida a los caninos con TGM. Así los objetivos específicos del presente trabajo de Tesis incluyeron los enumerados a continuación:

Parte I

- Describir la relación existente entre la extensión de la cirugía de tumores mamarios en grados I, II o III y la sobrevida libre de enfermedad y general.

Parte II

- Describir los efectos de la DDAVP en la sobrevida libre de enfermedad y general en perras con tumores mamarios en grado III tratadas quirúrgicamente.

Parte III

- Describir el efecto del aglepristone, en tejido mamario de perras en fase lútea en relación a la expresión de los RP y al marcador de proliferación celular Ki-67.

BIBLIOGRAFIA

1. MOE, L. (2001) Population-based incidence of mammary tumors in some dog breeds. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 57:439–443.
2. EGENVALL, A.; BONNETT, B.N.; OHAGEN, P., OLSON, P.; HEDHAMMAR, A.; VON EULER, H. (2005) Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Preventive Veterinary Medicine* 69(1-2):109–127.
3. COTCHIN, F. (1954) Further observations on neoplasias in dogs with particular reference to site of origin and malignancy. *British Veterinary Journal* 110-218
4. MOULTON, J.E. (1990) Tumors of the mammary gland, In: Moulton, J.E. Ed. *Tumours in Domestic Animals*, 3 ed. Berkeley, University of California Press, p. 518–552.
5. THEILEN, G.H.; MADEWELL, B.R. (1987) Clinical application of cancer chemotherapy. In: Theilen, G.H., Madewell, B.R. (Eds.). *Veterinary Cancer Medicine*, 2 ed. Lea and Febiger, Philadelphia, p. 183–196.
6. BRODEY, R.S.; GOLDSCHMIDT, M.A.; ROSZEL, J.R. (1983) Canine mammary gland neoplasms. *Journal of the American Animal Hospital Association* 19:61-90.
7. PEREZ ALENZA, D.; RUTTEMAN G.R.; PEÑA, L.; BEYNEN, A.; CUESTA, P. (1998) Relation between habitual diet and canine mammary tumours in a case control study. *Journal Veterinary Internal Medicine* 12(3):132–139.
8. ROSTAMI, M.; TATEYAMA, S.; UCHIDA, K.; NAITOU, H.; YAMAGUCHI, R.; OTSUKA, H. (1994) Tumors in domestic animals examined during a ten year period (1980-1989) at Miyazaki University. *The Journal of Veterinary Medical Science* 56(2):403-405.

9. VAN GARDEREN, E.; DE WIT.; M, VOORHOUT, W.F. RUTTEMAN G.R.; MOL J.A.; NEDERBRAGT H.; MISDORP W. (1997) Expression of growth hormone in canine mammary tissue and mammary tumors: Evidence for a potential autocrine/paracrine stimulatory loop. *The American Journal of Pathology* 150(3):1037-1047.
10. SCHNEIDER, R. (1970) Comparison of age, sex, and incidence. Rates in human and canine. Breast cancer. *Cancer* 26(2):419-426.
11. O'KEEFE, D. (1995) Tumors of the genital system and mammary glands. In Ettinger SJ (ed): *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 3 ed. Philadelphia, WB. Saunders Co., p. 1699–1704.
12. THEILEN, G.H.; MADEWELL B.R. (1987) Hematopoietic neoplasms, sarcomas and related conditions: canine. In: Theilen, G.H., Madewell, B.R. (Eds.), *Veterinary Cancer Medicine*, 2 ed. Philadelphia, Lea & Febiger, p. 392-407.
13. BATTISTACCI, M; CALY RA, M. L. (1974) Quantitative measurement of metabolites of the tryptophane-niacin pathway in healthy bitches and those affected with mammary dysplasia and neoplasia. *Nuova Veterinaria* 50:246-252.
14. HELLMÉN E. (1993) Canine mammary tumour cell lines established in vitro. *Journal Reproduction Fertility Supplement* 47:489-499.
15. RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. (2001). Tumors of the mammary glands. In: *Small Animal Clinical Oncology*. 3 ed. W.B. Saunders Co., p. 455-477.
16. SORENMO K. (2003) Canine mammary gland tumors. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 33(3):573-596.
17. DONNAY, I.; RAUIS, J.; DEVLEESCHOUWER, N.; WOUTERS-BALLMAN, P.; LECLERCQ, G.; VERSTEGEN, J. (1995) Comparison of estrogen and progesterone

receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. *American Journal Veterinary Research* 56(9):1188-1194.

18. MEYER, J.S. (1977) Cell proliferation in normal human breast ducts, fibroadenomas, and other ductal hyperplasias measured by nuclear labeling with tritiated thymidine. Effects of menstrual phase, age and oral contraceptive hormones. *Human Pathology* 8:67–81.
19. ANDERSON, T.J.; FERGUSON, D.J.; RAAB, G.M. (1982) Cell turnover in the “resting” human breast: influence of parity, contraceptive pill, age and laterality. *British Journal of Cancer* 46(3):376–382.
20. POTTEN, C.S.; WATSON, R.J.; WILLIAMS, G.T.; TICKLE, S.; ROBERTS, S.A.; HARRIS, M.; HOWELL, A. (1988) The effect of age and menstrual cycle upon proliferative activity of the normal human breast. *British Journal of Cancer* 58(2):163–170.
21. SELMAN, P.; MOL, J.; RUTTEMAN, G.; VAN GARDEREN E.; RIJNBERK, A. (1994) Progesterin-induced growth hormone excess in the dog originates in the mammary gland. *Endocrinology* 134(1):287-292.
22. MOL, J.A.; VAN GARDEREN, E.; SELMAN, P.J.; WOLFSWINKEL, J.; RIJNBERK, A.; RUTTEMAN, G.R. (1995) Growth hormone mRNA in mammary gland tumour of dogs and cats. *Journal of Clinical Investigation* 95:2028-2034
23. ETTINGER, S.J.; FELDMAN E.C. (1997). *Tratado de medicina interna veterinaria*. 4ta ed. Intermedica, p. 2053-2056.
24. HAHN K. A. (2001) Practical indications and contraindications for tamoxifen. *Proceeding The North American Conference. Small Animal and Exotics*. Orlando, Florida, p. 665-666.
25. HAMPE J. F.; MISDORP W. (1974) Tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bulletin of the World Health Organization*. 50(1-2):111-133.

26. RUTTEMAN G.R.; MISDORP W.; VAN DEN BROM W. E.; RIJNBEEK A. (1989) Anterior pituitary function in female dogs with mammary tumors I: Growth hormone. *Anticancer Research* 9:235-240.
27. MISDORP, W (1988) Canine mammary tumours: Protective effect of late ovariectomy and stimulating effect of progestins. *Vet Q* 10:26-33
28. DONNAY, I.; RAUIS, J.; VERSTEGEN, J. (1994) Influence des antécédents hormonaux sur l'apparition clinique des tumeurs mammaires chez la chienne. Étude épidémiologique. *Annals Medicine Veterinary* 138:109–117.
29. RUTTEMAN G. R. (1990) Hormones and mammary tumour disease in the female dog. An update. *In Vivo*. 4:33-40.
30. RUTTEMAN, G.R.; (1995) Mammary tumors in the dog. In: Bonagura, J.D. Ed., *Kirk's Current Veterinary Therapy XII. Small Animal Practice*. Saunders, WB, Philadelphia, p. 518–523.
31. MAC EWEN, E.G.; WITHROW, S.J. (1996) Tumors of the mammary glands, In: Withrow S.J., Mac Ewen E.G. Eds: *Small Animal Clinical Oncology*, 2 ed. Philadelphia, WB Saunders Co., p. 356–372.
32. MIALOT, J.P.; Y RÉ, F.; MARTIN, P.M., COTARD, D. M; AYNAUD, J.P. (1982) Etude de récepteurs des hormones stéroïdes dans les tumeurs mammaires de la chienne II: Correlations avec quelques caractéristiques cliniques. *Rec. Méd. Vét.* 158:513–521
33. RUTTEMAN, G.R.; MISDORP, W. (1993) Hormonal background of canine and feline mammary tumours. *Journal Reproduction Fertility Supplement* 47:483–487
34. NIETO, A.; PEÑA, L.; PÉREZ-ALENZA, M. D.; SÁNCHEZ, M. A.; FLORES, J. M.; CASTAÑO. M. (2000) Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine

mammary tumors: Clinical and Pathologic Associations and Prognostic Significance
Veterinary Pathology 37:239-247.

35. DONNAY I.; DEVLEESCHOWER N.; WOUTERS-BALLMAN P.; LECLERO G.; VERSTEGEN J. (1996) Relationship between receptors for epidermal growth factor and steroid hormones in normal, dysplastic and neoplastic canine mammary tissues. *Research. Veterinary Science* 60(3):251-254.
36. RUTTEMAN, G.R.; MISDORP, W.; BLANKENSTEIN, N. MA.; VAN DEN BROM W.E. (1988). Oestrogen and progestin receptors in mammary tissue of the female dog: Different receptor profile in nonmalignant and malignant states. *Breast Cancer* 58(5):594–599
37. MC GUIRE, W.L. (1980) Un update on oestrogen and progesterone receptors for primary and advanced breast cancer, In: Lacobelli Eds: *Hormones and Cancer*. New York, Raven Press, p. 337–344.
38. MISDORP, W.; COTCHIN, E.; HAMPE, J. F.; JABARA, A.G.; VON SY ERSLEBEN J. (1971) Canine malignant mammary tumours. I. Sarcomas. *Veterinary Pathology* 8(2):99-117.
39. KARAYANNOPOULOU, M., KALDRYMIDOU, E., CONSTANTINIDIS, T.C., DESSIRIS, A. (2001) Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. *Journal of Veterinary Medicine A. Physiology Pathology Clinical Medicine* 48(2):85–96.
40. JOHNSTON, S.D. (1993) Reproductive system (mammary neoplasia). In: Slatter, D.H. Ed., *Textbook of Small Animal Surgery*. Saunders, WB, Philadelphia, p. 2185–2192.
41. WEY, N.; KOHN, B.; GUTBERLET, K. (1999) Mammary tumours in the bitch: clinical follow-up study (1995-1997). *Kleintierpraxis* 44:565-578.

42. SCHNEIDER R.; DORN C.R.; TAYLOR D.O. (1969) Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *Journal Natl Cancer Inst.* 43(6):1249-1261.
43. NOVOSAT, C. A. (2003) Principles of treatment for mammary gland tumor. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 18(2):107-109.
44. STRATMANN, N; FALING, K.; RICHTER, A. WEHREND, A. (2008) Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy. *Veterinary Surgery* 37:82-86.
45. SUSANECK, S.J.; ALLEN, T.A.; HOOPS, J. (1983) Inflammatory mammary carcinoma in the dog. *JAAHA* 19:971–976.
46. MISDORP, W.; HART, A. A. (1979) Canine mammary cancer. I. Prognosis. *Journal Small Animal Practice* 20:385–394.
47. BROWN, D.C.; PURUSHOTHAM, A.D.; BIRNIE, G.D.; GEORGE, W.D. (1995) Detection of intraoperative tumor cell dissemination in patients with breast cancer using reverse transcription and polymerase chain reaction. *Surgery* 117:95–101.
48. MORI, M.; MIMORI, K.; UEO, H. (1996) Molecular detection of circulation solid carcinoma cells in the peripheral blood: The concept of early systemic disease. *International Journal of Cancer* 68:739-743.
49. CARTER, B.A.; JENSEN, R.A.; SIMPSON, J.F.; PAGE, D.L. (2000) Benign transport of breast epithelium into axillary lymph nodes after biopsy. *American Journal of Clinical Pathology* 113(2):259–265.
50. MOORE, K.H.; THALER, H.T.; TAN, L.K.; BORGAN, P.I.; CODY, H.S. (2004) Immunohistochemically detected tumor cells in the sentinel lymph nodes of patients with breast carcinoma: biologic metastasis or procedural artifact? *Cancer* 100:929-934.

51. GIRON S.; TEJERA A.M.; RIPOLL G.M.; GOMEZ D.E.; ALONSO D.F. (2002) Desmopressin inhibits lung and lymph node metastasis in a mouse mammary carcinoma model of surgical manipulation. *Journal of Surgical Oncology* 81:38-44.
52. LOAR, A.S. (1986) The management of canine mammary tumors. In: Kirk, R.W. Ed., *Current Veterinary Therapy IX. Small Animal Practice*. Philadelphia. WB Saunders, Co., p. 480–487.
53. HAHN, K.A.; RICHARDSON, R.C.; KNAPP, D.W. (1992) Canine malignant mammary neoplasia: biological behavior, diagnosis and treatment alternatives. *Journal of the American Animal Hospital Association* 28:251-56.
54. OGILVIE, G.K.; REYNOLDS, H.A.; RICHARDSON, R.C.; WITHROW, S.J.; NORRIS, A.M.; HENDERSON, R.A.; KLAUSNER, J.S.; FOWLER, J.D.; MCCAWE, D. (1989) Phase II evaluation of doxorubicin for treatment of various canine neoplasms. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 195(11):1580–1583.
55. POIRIER, V.J.; HERSHEY, A.E.; BURGESS, K.E.; PHILLIPS, B.; TUREK, M.M.; FORREST, L.J.; BEAVER, L.; VAIL, D.M. (2004) Efficacy and toxicity of paclitaxel (Taxol) for the treatment of canine malignant tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 18(2):219–222.
56. MORRIS J.S.; DABSON, J.M.; BOSTOCK, D.E. (1993) Use of tamoxifen in the control of canine mammary neoplasia. *Veterinary Rec.* 133(22):539-542.
57. KITCHELL, B.E. (1995) Mammary tumors. En: Bonagura JD Ed. *Kirk's current veterinary therapy Animal Practice*. Saunders, WB. Philadelphia, WB Saunders, p. 1098-1102.
58. HOFFMANN, B.; SCHULER, G. (2000). Receptors blockers-general aspects with respect to their use in domestic animal reproduction. *Animal Reproduction Science*. 60(61): 295-312.

59. SCHNEIDER, M.R.; MICHNA, H.; HABENICHT, U.F.; NISHINO, Y.; GRILL H.J.; FOLLOW, K. (1992) The tumour-inhibiting potential of the progesterone antagonist onapristone in the human mammary carcinoma t61 in nude mice. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 11(3):187-189.
60. MONTECCHIA, M.F.; LAMB, C.; MOLINOLO, A.A.; LUTHY, I.A.; PAZOS, P.; CHARREAU, E.H.; VANZULLI, S.; LANARI, C. (1999) Progesterone receptor involvement in independent tumor growth in mpa-induced mammary adenocarcinomas. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 68(1-2):11-21.
61. SCHNEIDER, M.R.; MICHNA, H.; NISHINO, E.L.; ETREBY, M.F. (1990) Antitumor activity and mechanism of action of different antiprogestins in experimental breast cancer models. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 20(76):783-787.
62. MICHNA, H.; NISHINO, Y.; SCHNEIDER, M.R.; LOUTON, T.; EL ETREBY. M.F. (1991) A bioassay for the evaluation of antiproliferative potencies of progesterone antagonists. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 38(3):359-365.
63. KLIJN, J.G.M.; SETYONO-HAN, B.; SY ER, H.J.; LAMBERTS, S.W.J.; DE JONG F.H.; DECKERS, G.H.; FOEKENS, J.A (1994) Pre-clinical and clinical treatment of breast cancer with antiprogestins. *Human Reproduction* 9(1)181-189.
64. HORWITZ, KB. (1992) The molecular biology of RU486. Is there a role for antiprogestins in the treatment of breast cancer? *Endocrine Reviews* 13(2)146-163.
65. FRANK, D.W.; KIRTON, K.T.; MURCHISM, T.E; QUINTAN, W.J.; COLEMAN, T.J.; GILBERTSON, T.J.; FEENSTRA, E.S.; KIMBALL, F.A. (1979) Mammary tumors and serum hormones in the bitch treated with medroxyprogesterone acetate and progesterone for four years. *Fertility and Sterility* 31:340-346.

66. AUTHEMENT, J.M.; BOUDRIEU, R.J.; KAPLAN, P.M. (1989) Transient traumatically induced central diabetes insipidus in dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 194:683–685.
67. PAPICH, M.G. (2000). Table of common drugs: approximate dosages. In: Bonagura, J.D. Ed. *Kirk's Current Veterinary Therapy XIII. Small Animal Practice*. Saunders, WB, Philadelphia, p. 1241–1264.
68. RICHARDSON, D.W.; ROBISON, A.G. (1985) Desmopressin. *Annals of Internal Medicine* 103(2):228–239
69. ALONSO D.F.; SKILTON, G.; FARIAS E.F.; BAL DE KIER JOFFE E.; GOMEZ D. (1999) Antimetastatic effect of desmopressin in a mouse mammary tumor model. *Breast Cancer Research and Treatment* 57(3):271–

EFFECTO DE LA EXTENSION DE LA CIRUGIA EN TUMORES MAMARIOS SOBRE EL TIEMPO DE SOBREVIDA LIBRE DE ENFERMEDAD Y GENERAL

INTRODUCCION

El tratamiento de elección para los tumores de las glándulas mamarias (TGM) en grados I, II y III es la escisión quirúrgica. Los tratamientos adyuvantes como radiación, quimioterapia u hormonoterapia no se utilizan rutinariamente en medicina veterinaria por su complejidad, efectos secundarios, elevado costo o insuficiente conocimiento de los mismos. De esta manera, la cirugía toma un papel central en el pronóstico de esta entidad.

Existe una variedad de procedimientos quirúrgicos para los TGMs como la nodulectomía, mastectomía simple, mastectomía en bloque, o bien radical (1). Hasta el momento ningún estudio clínico prospectivo ha podido demostrar una supervivencia mayor en perras tratadas con mastectomía radical vs. nodulectomía (2,3). El escaso seguimiento de los pacientes en estos estudios pone en tela de juicio la frecuente indicación de realizar la menor resección para eliminar el tumor (4-6).

Contrariamente, a pesar de las eventuales complicaciones en el período posoperatorio, Stratmann y col., (2008; 7) recomiendan mastectomía radical unilateral y Kirsan (2005; 8) mastectomía bilateral total para disminuir las recidivas y aumentar la sobrevida. De esta manera, la extensión de la intervención se instala como uno de los aspectos de mayor controversia en cirugía oncológica veterinaria (9). Esta situación plantea, el problema de definir el efecto de la extensión de la cirugía de tumores mamarios en estadíos I, II o III (10) y la sobrevida libre de enfermedad (SLE) y sobrevida general (SG).

MATERIAL Y METODOS

Animales

Veintidós perras cruzas y puras, de 8 a 15 años de edad, de 5 a 45 kg de peso, enteras con TGM malignos en estadíos I, II o III (11) fueron incluidas en este estudio. Las metástasis de tórax fueron diagnosticadas por radiografías (RAIX, Buenos Aires, Argentina) látero-lateral y ventro-dorsal y el estado clínico evaluado por el examen físico general y la rutina hematológica y bioquímica.

Diseño experimental y mastectomías

Las perras fueron distribuidas al azar a uno de los siguientes protocolos quirúrgicos: Mastectomía simple de la glándula involucrada (MS; n=10) o Mastectomía en bloque respetando el drenaje linfático, mas una glándula craneal y una caudal a la afectada (MB; n=12).

Luego de la premedicación, con sulfato de atropina (Atropina, Jhon Martin; 0,04 mg/kg SC), maleato de acepromacina (Acedan, Holiday; 0,03 mg/kg SC) y butorfanol (Torbutrol Plus, Fort Dodge; 0,2mg/kg, IM) se indujo anestesia con tiopental sódico (Pentovet TM Richmond; 8mg/kg; IV) una vez intubado se mantuvo la anestesia con alotane y oxígeno, distribuido por sistema cerrado.

La mastectomía simple fue realizada en la/s glándula/s afectada/s y la mastectomía en bloque en la/s glándula/s afectada/s, glándulas ipsilaterales involucradas en el drenaje linfático, así como las glándulas craneales y caudales a la afectada (12-14). Los nódulos linfáticos regionales se extirparon cuando existió agrandamiento.

Estudio histopatológico

Las muestras de tejido mamario y de los nódulos linfáticos, se fijaron en formol tamponado al 10% y se incluyeron en parafina, luego fueron seccionados en láminas de 5 a 6 µm y teñidas con hematoxilina y eosina usando procedimientos de rutina. Los hallazgos histopatológicos fueron evaluados por un patólogo especializado y clasificados de acuerdo a Misdorp y col. (1999; 15). La malignidad tumoral fue graduada histológicamente por el método Nottingham (16,17) usado en medicina humana y veterinaria (18-23).

El grado histológico de carcinoma resultó de la evaluación de tres características morfológicas (formación tubular, pleomorfismo nuclear y 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).

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) de acuerdo a Kirpensteijn y col. (2002; 24).

Seguimiento

Se llevó a cabo una evaluación clínica de las glándulas mamarias remanentes, de los nódulos linfáticos y de la herida quirúrgica cada 3 meses o bien cuando acontecía algún cambio por un mínimo de doce meses luego de la cirugía. Las metástasis de tórax fueron diagnosticadas por radiografías (RAIX, Buenos Aires, Argentina) latero-lateral y ventro-dorsal a 90 kv y 30 mA

cada seis meses. Las variables analizadas fueron tiempo (días) de SLE, que incluye las recurrencias: local, regional y diseminación a distancia y tiempo (días) de SG.

Análisis estadístico

La SLE y la SG fueron definidas como el tiempo transcurrido desde la primera cirugía a la recidiva (local, regional o distante) o hasta la muerte del animal, respectivamente. En el análisis de SLE los animales fueron estadísticamente censurados, si al tiempo del cierre de la compilación de datos, el tumor no recidivaba o las metástasis no eran detectadas. En el análisis de SG, los animales fueron estadísticamente censurados, si al tiempo del cierre de la compilación de datos estos permanecían vivos. Ambas curvas de supervivencia se estimaron utilizando el método de Kaplan-Meier (1958; 25) y los grupos tratados se compararon por log-rank test.

Para verificar la comparabilidad de los tratamientos entre los grupos (MS vs. MB), el tamaño de los tumores, estadio clínico y grado histológico fueron evaluados por el test de Kruskal-Wallis (1952; 26) para variables continuas y por el test de Fisher (1922; 27) para variables categóricas. El nivel de significancia se fijó en todos los casos en $p < 0,05$.

RESULTADOS

Ambos grupos de animales tuvieron una similar distribución del grado histopatológico de diferenciación ($p > 0,05$). En el grupo MS se encontraron seis carcinomas simples, tres carcinomas complejos y un osteosarcoma, mientras que en el grupo MB hubo diez carcinomas simples, un osteosarcoma y un carcinoma de células escamosas (**Tabla 1**).

En el grupo MS la progresión de la enfermedad se presentó en 6/10 (60%) (**Figura 1**) y en MB la enfermedad progresó en 9/12 (75%) (**Figura 2**) de los animales. Durante el seguimiento murieron 5/10 (50%) perras en el grupo MS (**Figura 3**) y 8/12 (66,6%) en el grupo MB (**Figura 4**). No se detectaron diferencias entre los grupo MS y MB para la SLE (501,5 vs. 102,5; $p>0,2$) (**Figura 5**), ni SG (1021,0 vs 271,5; $p>0,3$; (**Figura 6**).

Figura 1. Sobrevida libre de enfermedad en el grupo con Mastectomía Simple

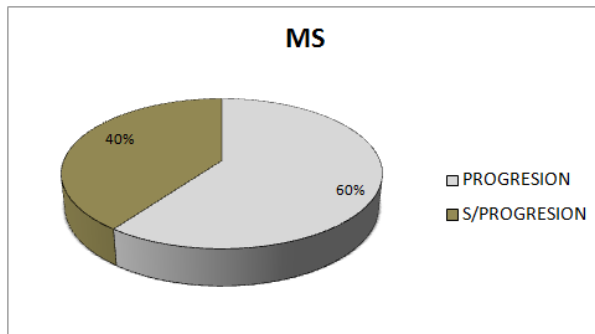


Figura 2. Sobrevida libre de enfermedad en el grupo con Mastectomía en Bloque

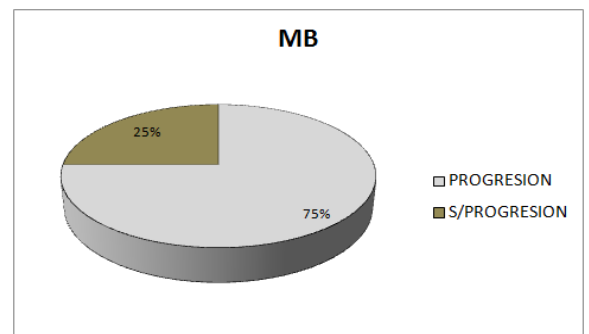


Figura 3. Sobrevida General en el grupo con Mastectomía Simple

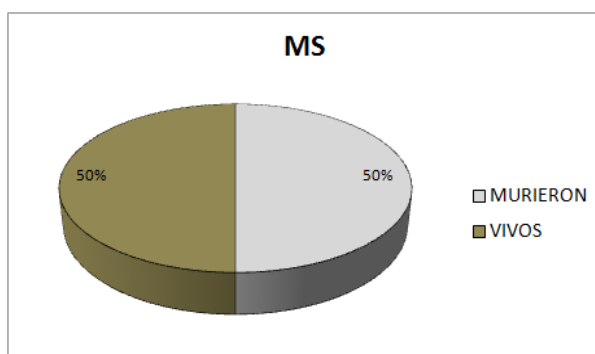


Figura 4. Sobrevida General en el grupo con Mastectomía en Bloque

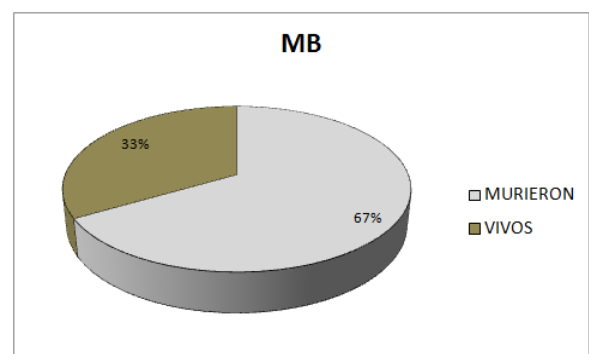
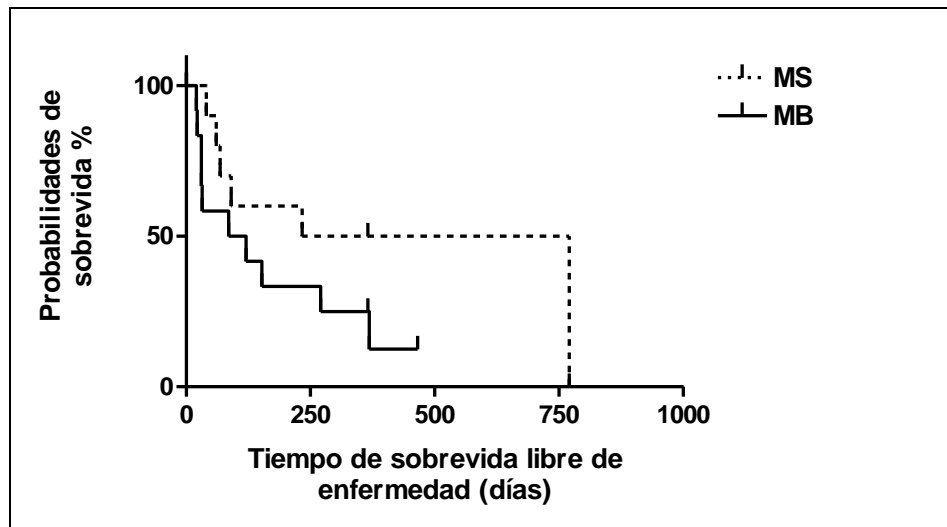


Tabla 1: Características clínicas e histológicas (H) en perras con neoplasia mamaria tratadas quirúrgicamente con mastectomía simple (MS, n=10) o en bloque (MB, n=12).

ANIMAL	TRATAMIENTO	ESTADIO	TIPO (H)	PATRON (H)	GRADO (H)	PROGRESION
1	MS	I	CC	TP	II	Metástasis local
2	MS	II	OS		I	No
3	MS	II	CC	TP	II	Metástasis pulmonar
4	MS	I	CC	TP	II	Metástasis pulmonar
5	MS	III	CS	S	II	Metástasis pulmonar
6	MS	III	CS	TP	I	Metástasis regional
7	MS	III	CS	S	I	No
8	MS	III	CS	TP	II	No
9	MS	II	CS	S	II	Metástasis locoregional
10	MS	II	CS	TP	II	No
1	MB	III	CCE		II	Metástasis local
2	MB	III	CS	S	II	Metástasis pulmonar
3	MB	III	OS		II	Metástasis local
4	MB	III	CS	TP	III	Metástasis locopulmonar
5	MB	III	CS	TP	III	Metástasis local
6	MB	III	CS	TP	I	Metástasis pulmonar
7	MB	III	CS	TP	III	Metástasis pulmonar
8	MB	III	CS	TP	I	No
9	MB	III	CS	TP	I	No
10	MB	II	CS	TP	I	Metástasis local
11	MB	III	CS	TP	III	Metástasis locoregional
12	MB	III	CS	TP	II	No

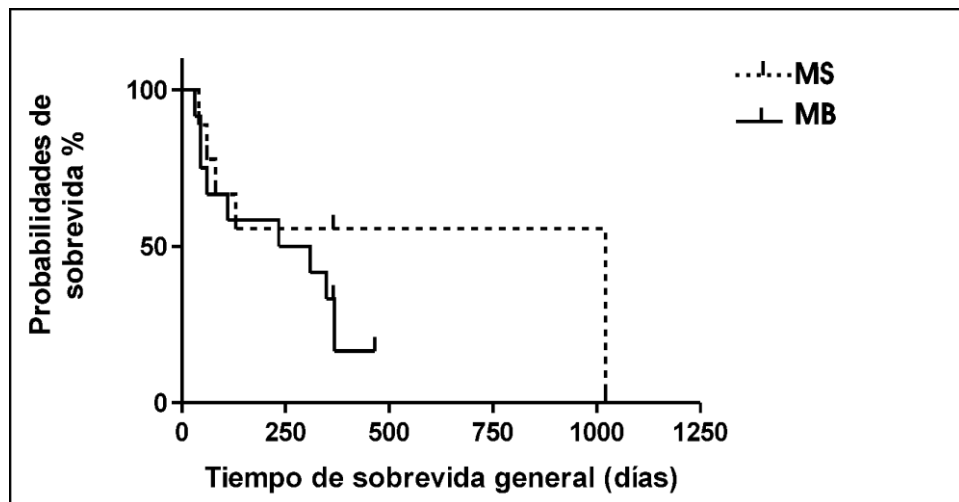
MB: mastectomía en bloque. MS: mastectomía simple. CS: carcinoma simple. OS: osteosarcoma. CC: carcinoma complejo. CCE: carcinoma de células escamosas. TP: túbulo papilar. S: sólido. SLE: supervivencia libre de enfermedad. SG: supervivencia general.

Figura 5: Curva de Kaplan-Meier de probabilidades de supervivencia libre de enfermedad en las hembras caninas de la Tabla 1.



Las barras verticales representan los animales estadísticamente censurados. **MB**: mastectomía en bloque. **MS**: mastectomía simple.

Figura 6: Curva de Kaplan-Meier de probabilidades de supervivencia general en las hembras caninas de la Tabla 1.



Las barras verticales representan los animales estadísticamente censurados. **MB**: mastectomía en bloque. **MS**: mastectomía simple.

DISCUSION

La alta recurrencia y mortalidad reportada en perras con tumores mamarios malignos luego de la resección quirúrgica (7, 28-30) y estos resultados corroboran que la cirugía no asegura su curación (31). Algunas de las causas atribuidas a la recidiva como la presencia de micrometástasis en sitios distantes (32), el aumento de la afluencia de células tumorales en los vasos linfáticos durante la manipulación quirúrgica (33-35) y el desarrollo de nuevas anastomosis entre los vasos linfáticos de diferentes glándulas (36), condicionan también la eficacia terapéutica de la cirugía.

Por lo tanto, el grado histológico de malignidad tumoral (1, 21) y/o la proliferación celular o actividad mitótica del tumor, reportados como factores pronósticos en carcinomas mamarios (37-39), estarían también influenciando el papel de la extensión de la cirugía.

En este estudio piloto y con este número de animales, no se pudo dilucidar el efecto de la extensión de la resección quirúrgica sobre la SLE y SG de perras con TGM. Es posible que un mayor número de animales sea necesario para detectar diferencias o bien que estas surjan al comparar la nodulectomía con la mastectomía en bloque. No obstante, la nodulectomía es una intervención de escasa aplicación en veterinaria ya que las pacientes son normalmente llevadas a la consulta cuando el compromiso mamario es mayor al de un nódulo.

Esto limita la aplicación de estudios donde se realicen estas comparaciones. En relación a los resultados obtenidos, planeamos seguir trabajando en la temática a fin de ampliar nuestro aporte para el tratamiento quirúrgico de las neoplasias mamarias malignas en la especie.

BIBLIOGRAFIA

1. MIRSDORP, W.; HART, A.A. (1976) Prognostic factors in canine mammary cancer. *The Journal of the National Cancer Institute* 56(4):779-86.
2. FERGUSSON, R. (1985) Canine mammary tumors. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 15(3):501-511.
3. MC EWEN, E.G.; HARVEY, H.J.; PATNAIK, A.K.; MOONEY, S.; HAYES, A.; KURZMAN, I.; HARDY, W. Jr. (1985) Evaluation of effects of levamisol and surgery on mammary cancer. *Journal of Immunotherapy*. 4(4):427-433.
4. BRODEY, R.S.; GOLDSCHMIDT, M.H.; ROSZEL, J.R. (1983) Canine mammary gland neoplasms. *Journal of the American Animal Hospital Association* 19:61-90.
5. MOULTON, J.E. (1990). Tumors of the mammary gland. In: Moulton J.E Ed. *Tumors of domestic animals*, 3 th. ed. University of California Press, Berkeley p. 544–545.
6. SAUTET, J.Y.; RUBERTE, J.; LOPEZ, C.; GINE J.M.; ORDONEZ, G.; CINGIA, A. (1992). Lymphatic system of mammary glands in the dog: an approach to the surgical treatment of malignant mammary tumors. *Canine Practice* 17(2):30-33.
7. STRATMANN, N.; FALING, K.; RICHTER, A.; WEHREND, A. (2008) Mammary Tumor Recurrence In: Bitches After Regional Mastectomy. *Veterinary Surgery* 37:82-86.
8. KIRSAN, I. (2005) Comparison of partial and total bilateral mastectomy in bitches with regard to early and late complications. *Indian Veterinary Journal* 82(6):662-663.
9. MC EWEN, E.G.; WITHROW, S.J. (1996) Tumors of the mammary glands. In: Withrow, S.J.; Mc Ewen, E.G. Eds. *Small Animal Clinical Oncology* 2nd ed. WB Saunders, Philadelphia, p. 356-372.
10. HAMPE, J.F.; MISDORP, W. (1974) Tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bull World Health Organ* 50 (1-2):111-33.

11. OWEN, L.N. (1980) The TNM Classification of Tumors in Domestic Animals. Bulletin of the World Health Organization, Geneva, p. 20-80.
12. BOJRAB, M.J.; BIRCHARD, S.J.; TOMLINSON, J.L. (1993) Técnicas Actuales en Cirugía de Pequeños Animales, 3 ed. Intermedica. Buenos Aires, Argentina, p. 447–452.
13. WILKINSON, G.T. (1971) The treatment of mammary tumors in the bitch and a comparison with the cat. The Veterinary Record 89:13–16.
14. WITHROW, S.J. (1975) Surgical management of canine mammary tumors. Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice 5:495–506.
15. MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMEN, E.; LIPSCOMB, T.P. (1999) In: Histological Classification of Mammary Tumor of the Dog and the Cat, vol. VII. Armed Forces Institute of Pathology and American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology, Washington DC, USA, p. 58–59.
16. ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. (1991) Pathological prognosis factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study, with long-term follow-up. Histopathology 19(5):403–410.
17. SLOANE, J.P.; AMENDOEIRA, I.; APOSTOLIKAS, N.; BELLOCQI, J.P.; BIANCHI, S.; BOECKER, W.; BUSSOLLATI, G.; COLEMAN, D.; CONNOLLY, C.E.; EUSEBI, V.; DEMIGUEL, C.; DERVAN, P.; DRIJKONIRNGEN, R.; ELSTON, C.W.; FAVERLY, D.; JACQUEMIER, J.; GAD, A.; LACERDA, M.; MARTINEZ-PENUELA, J.; MUNT, C.; PETERSE, J.L.; RANK, F.; SYVAN, M.; TSAKRAKIDES, V.; ZAFRANI, B. (1999) Consistency achieved by 23 European pathologists from 12 countries in diagnosing breast disease and reporting prognostic features of carcinomas. Virchows Archiv 434:3–10.

18. CASTAGNARO, M.; CASALONE, C.; BOZZETTA, E.; DE MARIA, R.; BIOLATTI, B.; CARAMELLI, M. (1998) Tumour grading and the one-year post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *Journal of Comparative Pathology* 119(3):263–275.
19. GILBERTSON, S.R.; KURZMAN, I.D.; ZACHRAU, R.E.; HURVITZ, A.I.; BLACK, M.M. (1983). Canine mammary epithelial neoplasm: biologic implications of morphologic characteristics assess in 232 dogs. *Veterinary Pathology* 20:127–142.
20. KARAYANNOPOULOU, M., KALDRYMIDOU, E., CONSTANTINIDIS, T. C., DESSIRIS, A., (2001) Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. *Journal of Veterinary Medicine A. Physiology Pathology Clinical Medicine* 48(2):85–96.
21. KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOU, E.; CONSTANTINIDIS, T.C.; DESSIRIS, A. (2005) Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *Journal of Comparative Pathology* 133(4):246–252.
22. NIETO, A.; PEREZ-ALENZA, M.D.; DEL CASTILLO, N.; TABANERA, E.; CASTANO, M., PENA, L. (2003) BRCA1 expression in canine mammary dysplasias and tumours: relationship with prognostic variables. *Journal of Comparative Pathology* 128(4):260–268.
23. REIS, A.L.; CARVALHEIRA, J.; SCHMITT, F.C.; GARTNER, F. (2003) Immunohistochemical study of the expression of E-cadherin in canine mammary tumours. *The Veterinary Record* 152(20):621–624.
24. KIRPENSTEIJN, J.; KIK, M.; RUTTEMAN, G.R.; TESKE, E. (2002) Prognostic significance of a new histologic grading system for canine osteosarcoma. *Veterinary Pathology* 39:240–246.

25. KAPLAN, E.L.; MEIER, E. (1958) Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistician Association* 53(282):457–481.
26. KRUSKAL, W.H.; WALLIS, W.A. (1952) Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association* 47(260):583–621.
27. FISHER, R.A. (1922) On the interpretation of χ^2 from contingency tables, and the calculation of P. *Journal of the Royal Statistical Society* 85(1):87-94.
28. WEY, N.; KOHN, B.; GUTBERLET, K. (1999) Mammary tumours in the bitch: clinical follow-up study (1995-1997). *Kleintierpraxis* 44:565-578.
29. SCHNEIDER, R.; DORN, C.R.; TAYLOR, D.O. (1969) Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *Journal of The National Cancer Institute* 43(6):1249-1261.
30. NOVOSAT, C. A. (2003) Principles of treatment for mammary gland tumor. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 18(2):107-109.
31. JOHNSTON, S.D. (1993) Reproductive system (mammary neoplasia). In: Slatter, D.H. Ed. *Textbook of Small Animal Surgery*. Saunders, WB, Philadelphia, p. 2185–2192.
32. BUSH, U.; RUDOLPH, R. (1995) Mammary carcinoma of the female dogs: clinical relevance of the immunohistochemical demonstration of micrometastases in the regional lymph nodes. *Berliner und Münchener Tierärztliche Praxis* 23(3):280-286.
33. GIRON, S.; TEJERA, A.M.; RIPOLL, G.V.; GOMEZ, D.E.; ALONSO, D.F. (2002) Desmopressin inhibits lung and lymph node metastasis in a mouse mammary carcinoma model of surgical manipulation. *Journal of Surgical Oncology* 81:38–44.
34. BAKER, D.G.; MASTERSON, T.M.; PACE, R.; CONSTABLE, W.C.; WANEBO, H. (1989) The influence of the surgical wound on local tumor recurrence. *Surgery* 106(3):525–532.

35. MUTTER, D.; HAJRI, A.; TASSETTI, V.; SOLIS-CAXAJ, C.; APRAHAMIAN, M.; MARESCAUX, J. (1999) Increased tumor growth and spread after laparoscopy vs. laparotomy: influence of tumor manipulation in a rat model. *Surgical Endoscopy* 13(4):365–370.
36. PEREIRA, C.T.; RAHAL, S.C.; DE CARVALHO BALIEIRO, J.C.; RIBEIRO, A.A. (2003) Lymphatic drainage on healthy and neoplastic mammary glands in female dog: Can it be really altered? *Anatomia, Histologia, Embryologia Journal of Veterinary Medicine* 32(5):282-290.
37. HELLMEN, E.; BERGSTROM, R.; HOLMBERG, L.; SPANGBERG, I. B.; HANSSON, K.; LINDGREN A. (1993) Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Veterinary Pathology* 30(1):20-27.
38. PEREZ ALENZA, M.D.; PENA, L.; DEL CASTILLO, N.; NIETO, A.I. (2000) Factors influencing the incidence and prognosis in canine mammary tumours. *Journal of Small Animal Practice* 41(7):287 – 291.
- SARLI, G.; PREZIOSI, R.; BENAZZI, C.; CASTELLANI, G.; MARCATO P.S. (2002) Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. *Journal of V*

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA DESMOPRESINA EN LA SOBREVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD Y GENERAL EN PERRAS CON TUMORES MAMARIOS TRATADAS QUIRURGICAMENTE

INTRODUCCION

El trauma tisular y la cirugía pueden aumentar el crecimiento y diseminación de las células malignas (1,2). Esto sugiere que la manipulación quirúrgica puede producir liberación de células cancerígenas viables dentro de la circulación.

Este hecho ha sido confirmado mediante técnicas de retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa inversa en pacientes humanas operadas por cáncer mamario (3,4). Además una serie de nódulos linfáticos axilares, extraídos luego de la biopsia mamaria, revelaron la presencia de células epiteliales en el drenaje linfático de los nódulos, que podría atribuirse a un mecanismo de transporte mecánico del epitelio tumoral mamario, secundario a la manipulación de la biopsia o quirúrgica (5).

La desmopresina (1-diamino-8-D-arginina vasopresina, también conocido como DDAVP) es un análogo sintético de la hormona antidiurética con propiedades hemostática que ha sido usada en humanos y en caninos con diabetes insípida y enfermedad de von Willebrand (6-8). DDAVP parece ser un agente hemostático eficaz para usar durante la cirugía en pacientes con trastornos sanguíneos. El compuesto aumenta los niveles de plasma del factor VIII coagulación, von Willebrand (FVW) y el activador tisular del plasminógeno y también aumenta la adhesión de las plaquetas a la pared de los vasos (9,10). La DDAVP inhibió significativamente la colonización pulmonar experimental de células de cáncer mamario

altamente agresivas (11) y disminuyó dramáticamente las metástasis a distancia y a nódulos linfáticos en un modelo murino sometido a manipulación tumoral y extirpación quirúrgica (12).

Considerando las propiedades antimetastásicas de la DDAVP, así como sus conocidas propiedades hemostáticas, el compuesto podría ser un candidato excelente para la terapia adyuvante en la cirugía de tumores mamarios en caninos, por lo tanto el objeto de este estudio fue evaluar la eficacia del tratamiento perioperatorio con DDAVP sobre el período libre de enfermedad y la supervivencia en perras con TGM en estadios III o IV durante la mastectomía.

MATERIAL Y METODOS

Animales

Veintiuna perras cruzas y puras, de 8 a 15 años de edad, de 5 a 45 kg de peso, enteras con TGM malignos en estadios III (13) fueron incluidas en el estudio. Las metástasis de tórax fueron diagnosticadas por radiografías (RAIX, Buenos Aires, Argentina) látero-lateral y ventro-dorsal y el estado clínico evaluado por el examen físico general y la rutina hematológica y bioquímica.

Diseño experimental y mastectomías

Las perras fueron distribuidas al azar a uno de los siguientes protocolos terapéuticos: DDAVP (Demopresin Ferring) 1µm/kg en solución salina, 30 minutos antes y 24 horas después de la cirugía (DDAVP; n=11) o placebo (PLACEBO; n=10) en volúmenes equivalentes de solución salina isotónica 30 minutos antes y 24 horas después de la cirugía.

Mastectomía

Luego de la premedicación, con sulfato de atropina (Atropina, Jhon Martin; 0,04 mg/kg SC), maleato de acepromacina (Acedan, Holiday; 0,03 mg/kg SC) y butorfanol (Torbutrol Plus, Fort Dodge; 0,2mg/kg, IM) se indujo anestesia con tiopental sódico (Pentovet TM Richmond; 8mg/kg; IV) una vez intubado se mantuvo la anestesia con halotano y oxígeno, distribuido por sistema cerrado.

La mastectomía en bloque fue realizada en 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 (14-17). Los nódulos linfáticos regionales se extirparon cuando existió agrandamiento.

Estudio histopatológico

Las muestras de tejido mamario y de los nódulos linfáticos, se fijaron en formol tamponado al 10% y se incluyeron en parafina, luego fueron seccionados en láminas de 5 a 6 µm y teñidas con hematoxilina y eosina usando procedimientos de rutina. Los hallazgos histopatológicos fueron evaluados por un patólogo especializado y clasificados de acuerdo a Misdorp y col. (1999; 18). En los caso de tumores múltiples se registró la lesión maligna de mayor grado. La malignidad tumoral fue graduada histológicamente por el método Nottingham (19,20) usado en medicina humana y veterinaria (21-26).

El grado histológico de carcinoma resultó de la evaluación de tres características morfológicas (formación tubular, pleomorfismo nuclear y 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).

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) de acuerdo a Kirpensteijn y col. (2002; 27).

Seguimiento

Se llevó a cabo una evaluación clínica, de las glándulas mamarias remanentes, de los nódulos linfáticos y de la herida quirúrgica cada tres meses o bien cuando aparecía algún cambio por un mínimo de doce meses luego de la cirugía. Las metástasis de tórax fueron diagnosticadas por radiografías (RAIX, Buenos Aires, Argentina) latero-lateral y ventro-dorsal a 90 kv y 30 mA cada seis meses. Las variables analizadas fueron tiempo (días) de sobrevida libre de enfermedad (SLE), que incluye las recurrencias: local, regional y diseminación a distancia y tiempo (días) de sobrevida general (SG).

Análisis estadístico

La SLE y la SG, fueron definidas como el tiempo transcurrido desde la primera cirugía a la recidiva (local, regional o distante) o hasta la muerte del animal, respectivamente. En el análisis de SLE los animales fueron estadísticamente censurados, si al tiempo del cierre de la compilación de datos, el tumor no recidivaba o las metástasis no eran detectadas. En el análisis de SG, los animales fueron estadísticamente censurados, si al tiempo del cierre de la compilación de datos estos permanecían vivos. Ambas curvas de supervivencia se estimaron

utilizando el método de Kaplan-Meier (1958; 28) y los grupos tratados se compararon por log-rank test.

Para verificar la comparabilidad de los tratamientos entre los grupos (DDAVP y PLACEBO), el tamaño de los tumores, estadio clínico y grado histológico fueron evaluados por el test de Kruskal-Wallis (1952; 29) para variables continuas y por el test de Fisher (1922; 30) para variables categóricas. El nivel de significancia se fijó en todos los casos en $p < 0,05$.

RESULTADOS

Ambos grupos de animales tuvieron una similar distribución en cuanto tamaño de los tumores, estadio clínico y grado histológico histopatológico de diferenciación ($p > 0,05$). La regresión multivariada reveló que ninguna de las variables analizadas influyó de forma significativa en el tiempo de SLE y SG.

El tipo más frecuente de tumor diagnosticado fue carcinoma simple en ambos grupos de tratamiento. Tres casos en el grupo DDAVP, que fueron diagnosticados sin lesiones malignas, incluyendo un paciente con mastitis subaguda y en el grupo PLACEBO, uno con un fibroadenoma y otro con un tumor mixto benigno, fueron excluidos del estudio (**Tabla 1**).

Cuatro (36%) pacientes del grupo DDAVP (**Figura 1**) y ocho (80%) del grupo PLACEBO (**Figura 2**), presentaron recidivas local o metástasis pulmonares durante el período de estudio. Las tasas de recurrencia local y metástasis fueron del 9% y 27% para el grupo DDAVP y 30% y 70% para el grupo placebo respectivamente.

Durante el seguimiento tres (27%) pacientes (**Figura 3**) y siete (70%) pacientes (**Figura 4**) de los mismos grupos de animales murieron dentro del período de estudio.

Figura 1. Sobrevida libre de enfermedad en el grupo con DDAVP

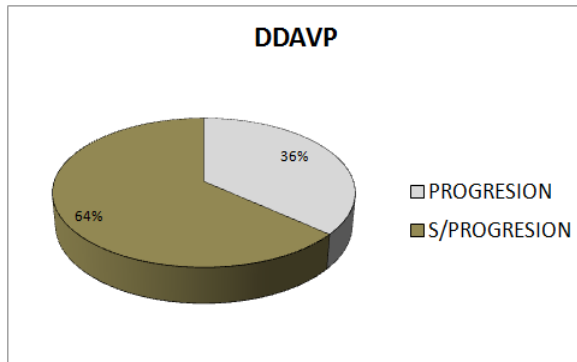


Figura 2. Sobrevida libre de enfermedad en el grupo PLACEBO

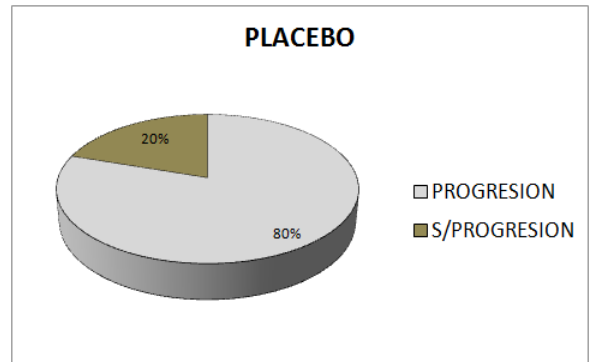


Figura 3. Sobrevida General en el grupo con DDAVP

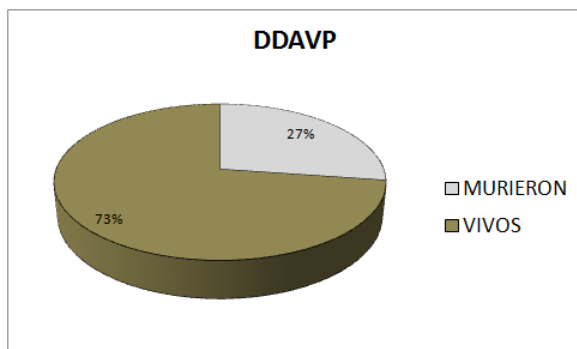


Figura 4. Sobrevida General en el grupo con PLACEBO

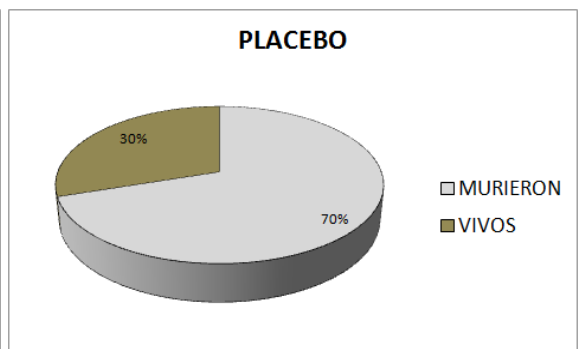


Tabla 1: Características clínicas e histológicas (H) y progresión de la enfermedad en perras con neoplasia mamaria tratadas con DDVAP, n=11 o PLACEBO, n=10.

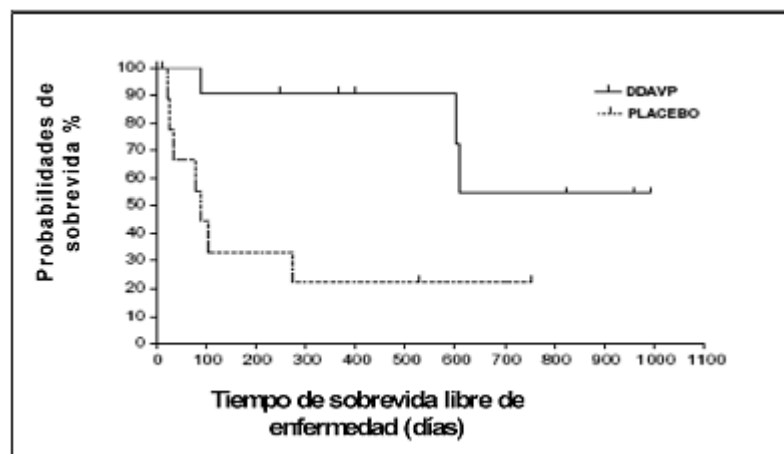
ANIMAL	TRATAMIENTO	ESTADIO	TIPO (H)	PATRON (H)	GRADO (H)	PROGRESION
1	PLACEBO	III	CCE		II	Metástasis pulmonar
2	PLACEBO	III	CS	TP	II	No
3	PLACEBO	III	CS	S	II	Metástasis pulmonar
4	PLACEBO	III	OS		II	Metástasis local
5	PLACEBO	III	CS	TP	II	Metástasis locopulmonar
6	PLACEBO	III	CS	TP	III	Metástasis locopulmonar
7	PLACEBO	III	CS		III	Metástasis pulmonar
8	PLACEBO	III	CS	TP	III	Metástasis pulmonar
9	PLACEBO	III	CS	TP	I	Metástasis pulmonar
10	PLACEBO	III	CS	TP	I	No
1	DDAVP	III	CS	TP	III	No
2	DDAVP	III	CS	S	I	No
3	DDAVP	III	CS	TP	II	No
4	DDAVP	III	CS	TP	II	No
5	DDAVP	III	CS	TP	I	No
6	DDAVP	III	CS	TP	III	Metástasis pulmonar
7	DDAVP	III	OS		I	Metástasis pulmonar
8	DDAVP	III	CS	S	III	No
9	DDAVP	III	CS	TP	II	Metástasis pulmonar
10	DDAVP	III	CS	TP	III	Metástasis local
11	DDAVP	III	CS		I	No

DDAVP: desmopresina. CS: carcinoma simple. OS: osteosarcoma. CC: carcinoma complejo. CCE: carcinoma de células escamosas. TP túbulo papilar. S: sólido.

El análisis Kaplan-Meier reveló que DDAVP tuvo un efecto positivo sobre el tiempo medio de SLE (DDAVP: 608 días vs PLACEBO: 85 días; $p<0,01$; **Figura 5**). Los análisis estadísticos demostraron diferencias significativas en el tiempo medio de SG entre los grupos (DDAVP: >600 días vs PLACEBO: 333 día; $p<0,05$; **Figura 6**). Se examinaron solo los carcinomas como subgrupo separado y se obtuvo resultados similares para tiempos de SLE (DDAVP: >600 días vs PLACEBO: 97 días; $p<0.05$) y tiempos de SG (DDAVP: >600 días vs PLACEBO: 351 días; $p<0.05$).

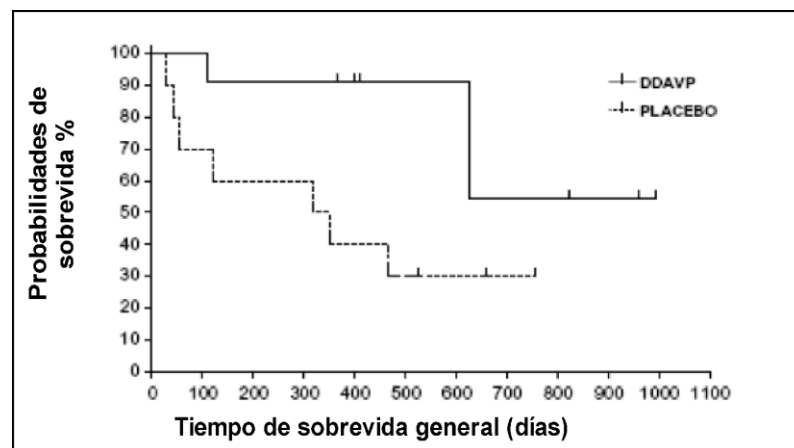
Clínicamente no se observó ningún efecto secundario en cualquiera de los casos. Cabe destacar que el sangrado intraoperatorio decreció en el grupo DDAVP, tal como se evaluó subjetivamente durante la cirugía.

Figura 5: Kaplan-Meier probabilidad de sobrevida libre de enfermedad en veintinueve perras con tumores de glándulas mamarias con estadio III tratadas con desmopresina (DDAVP, n=11, media 608 días) IV o placebo (PLACEBO, n=10, media 85 días) $p<0,01$ (log-rank test).



Las barras verticales representan las perras censuradas en el análisis estadístico.

Figura 6: Kaplan-Meier probabilidad de supervivencia general en veintiún perras con tumores de glándulas mamarias con estadio III y IV tratadas con desmopresina (DDAVP, n=11, media: 600 días) IV o placebo (PLACEBO, n=10, media: 333 días) $p < 0,05$ (log-rank test).



Las barras verticales representan las perras censuradas en el análisis estadístico.

DISCUSIÓN

La DDAVP perioperatoria incrementó en forma significativa la SLE y SG en perras con TGMs en estadios III o IV tratadas quirúrgicamente. El compuesto fue administrado 30 minutos antes y 24 horas después de la cirugía del tumor a una dosis hemostática clínicamente relevante (10, 7). El DDAVP, a esta dosis, es segura en pacientes caninos con cáncer y tiene efectos antitumorales sin efectos tóxicos evidentes. Como se esperaba, los resultados obtenidos en el grupo PLACEBO, para el intervalo libre de enfermedad, fueron comparables con aquellos publicados para estadios clínicos similares de TGM, donde el 50% de las perras tuvieron recidivas, alrededor de 200 días después de la cirugía (31).

La manipulación quirúrgica de un tumor puede resultar en un influjo aumentado de células tumorales en la circulación linfática y sistémica. Estudios experimentales previos en modelos

animales han confirmado que la manipulación de un tumor mamario agresivo es un factor de relevante que determina un aumento de la diseminación local, regional o distante de las células malignas. En cuanto a esto, la administración perioperatoria de la DDAVP fue capaz de disminuir la metástasis, por lo tanto inhibió la progresión tumoral luego de la cirugía (12). En el futuro se llevarán a cabo investigaciones para determinar los mecanismos precisos antimetastáticos ejercidos por la DDAVP en pacientes caninos con cáncer.

El efecto hemostático de la DDAVP puede representar una acción de apoyo, mejorando la hemostasia pos operatoria. El aumento de la coagulación luego de la cirugía tumoral puede contribuir a una encapsulación rápida del tejido tumoral residual, limitando la extravasación de las células hemostáticas. Recientemente Terraube y col (2006) (32) demostraron que el FVW, juega un rol protector contra la diseminación de las células tumorales en ratones deficientes en ese factor.

En un estudio a menor escala Karayannopoulos y col. (2001) (23) demostró que la quimioterapia es eficaz en perras con TGM en estadíos III y IV. Sin embargo, muchos autores han informado sobre el reclutamiento de células malignas en sangre periférica, luego del primer ciclo de quimioterapia, en pacientes con cáncer de pecho. Ya que la DDAVP puede disminuir el implante de células metastáticas, la administración del compuesto junto con los ciclos de quimioterapia convencional, puede ser útil considerando el posible efecto movilizante de la quimioterapia en las células cancerígenas.

BIBLIOGRAFIA

1. BAKER, D.G.; MASTERSON, T.M.; PACE, R.; CONSTABLE, W.C.; WANEBO, H. (1989) The influence of the surgical wound on local tumor recurrence. *Surgery* 106(3):525–532.
2. MUTTER, D.; HAJRI, A.; TASSETTI, V.; SOLIS-CAXAJ, C.; APRAHAMIAN, M.; MARESCAUX, J. (1999) Increased tumor growth and spread after laparoscopy vs. laparotomy: influence of tumor manipulation in a rat model. *Surgical Endoscopy* 13(4):365–370.
3. BROWN, D.C.; PURUSHOTHAM, A.D.; BIRNIE, G.D.; GEORGE, W.D. (1995) Detection of intraoperative tumor cell dissemination in patients with breast cancer using reverse transcription and polymerase chain reaction. *Surgery* 117:95–101.
4. GALAN, M.; VINOLAS, N.; COLOMER, D.; SOLER, G.; MUNOZ, M.; LONGARON, R.; VENTURA, P.J.; GASCON, P.; ESTAPE, J. (2002) Detection of occult breast cancer cells by amplification of CK19 mRNA by reverse transcriptase-polymerase chain reaction: role of surgical manipulation. *Anticancer Research* 22(5):2877–2884.
5. CARTER, B.A.; JENSEN, R.A.; SIMPSON, J.F.; PAGE, D.L. (2000) Benign transport of breast epithelium into axillary lymph nodes after biopsy. *American Journal of Clinical Pathology* 113(2):259–265.
6. AUTHEMENT, J.M.; BOUDRIEAU, R.J.; KAPLAN, P.M. (1989) Transient traumatically induced central diabetes insipidus in dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 194(5):683–685.
7. PAPICH, M.G. (2000) Table of common drugs: approximate dosages. In: Bonagura, J.D. (Ed.), *Kirk's Current Veterinary Therapy XIII. Small Animal Practice*. Saunders, WB, Philadelphia, p. 1241–1264.

8. RICHARDSON, D.W.; ROBISON, A.G. (1985) Drugs Five Years Later: Desmopressin. *Annals of Internal Medicine* 103(2):228–239.
 9. KAUFMANN, J.E.; VISCHER, U.M. (2003) Cellular mechanisms of the hemostatic effects of desmopressin (DDAVP). *Journal Thrombosis and Haemostasis* 1(4):682–689.
 10. MANNUCCI, P.M. (1997) Desmopressin (DDAVP) in the treatment of bleeding disorders, the first 20 years. *Blood* 90(7):2515–2521.
 11. ALONSO, D.F.; SKILTON, G.; FARIAS, E.F.; BAL DE KIER JOFFE, E.; GOMEZ, D.E. (1999) Antimetastatic effect of desmopressin in a mouse mammary tumor model. *Breast Cancer Research and Treatment* 57(3):271–275.
 12. GIRON, S.; TEJERA, A.M.; RIPOLL, G.V.; GOMEZ, D.E.; ALONSO, D.F. (2002) Desmopressin inhibits lung and lymph node metastasis in a mouse mammary carcinoma model of surgical manipulation. *Journal of Surgical Oncology* 81:38–44.
- OWEN, L.N. (1980) The TNM Classification of tumors in domestic animals. World Health Organization, Gene

ESTUDIO DEL EFECTO DEL ANTAGONISTA DE PROGESTERONA, EL AGLEPRISTONE, EN TEJIDOS MAMARIOS CANINOS

INTRODUCCION

Los estudios sobre el papel de la progesterona y sus receptores en el control de la proliferación de la glándula mamaria y la formación de neoplasias son insuficientes. Se conoce que la progesterona promueve la proliferación del epitelio mamario (1) ya que induce la síntesis de la hormona de crecimiento (2-4). También la expresión de los receptores de progesterona (RP) en tejido mamario disminuye en los procesos de diferenciación (5), como fue observado en ratones antes del parto (1).

Los antiprogestágenos son esteroides sintéticos que se unen con gran afinidad a los receptores de progesterona impidiendo que ésta ejerza sus efectos biológicos (6). El aglepristone actúa como un verdadero antagonista de progesterona a nivel uterino sin decrecer inicialmente las concentraciones séricas de progesterona (7,8).

Por su parte, el antígeno Ki-67 es una proteína que se localiza en el núcleo de las células y su concentración varía dependiendo de la actividad proliferativa de las mismas. La detección de Ki-67 se realiza durante las fases activas del ciclo celular (G_1 , S, G_2 y M), esto se utiliza en histopatología diagnóstica de neoplasias y su inmunodetección permite inferir el grado de proliferación celular (9-11). La presencia de Ki-67 es nula cuando las células están en reposo (fase G_0) (12,13). En humanos, existe una correlación entre los valores séricos de progesterona y el marcador de proliferación celular Ki-67 (14).

Por lo anteriormente expuesto, el tratamiento con aglepristone podría provocar variaciones en la expresión de Ki-67 y de RP en el epitelio mamario. Estas variaciones aportarían información sobre un potencial efecto antiproliferativo de esta droga sobre la glándula mamaria canina. Así, el objetivo del presente capítulo fue describir los efectos del aglepristone, un antagonista del RP, en tejido mamario de perras en fase lútea en relación a la expresión de los RP y el marcador de proliferación celular Ki-67.

MATERIAL Y METODOS

Animales

El estudio se realizó en una población de 6 perras enteras, mestizas, entre 1 y 3 años de edad y de 8 a 20 kg de peso, en fase lútea (progesterona sérica: >2ng/ml; n=6).

Diseño experimental y biopsias

Las perras fueron distribuidas al azar a uno de los siguientes protocolos terapéuticos: Aglepristone (Alizine®, Virbac, Brasil), 10 mg/kg/, vía subcutánea; (AGLE; n=4) o Placebo: igual volumen (0,33 cc/kg) de solución fisiológica, vía subcutánea (PLA, n=2).

Luego de la premedicación, con sulfato de atropina (Atropina, Jhon Martin; 0,04 mg/kg SC), maleato de acepromacina (Acedan, Holiday; 0,03 mg/kg SC) y butorfanol (Torbutrol Plus, Fort Dodge; 0,2mg/kg, IM) se indujo anestesia con tiopental sódico (Pentovet TM Richmond; 8mg/kg; IV), una vez intubado se mantuvo la anestesia con halotano y oxígeno, distribuido por sistema cerrado.

Las biopsias incisionales se realizaron resecando un fragmento de tejido mamario con bisturí en forma de cuña hasta el tejido celular subcutáneo, previa asepsia y con posterior sutura de la piel (15) de la mama inguinal derecha antes del tratamiento (día -1; n= 6). Siete días más tarde (día 7) se procedió a la biopsia de la mama inguinal izquierda con igual técnica (AGLE, n=2 y PLACEBO, n=1). El día 14 se realizó la biopsia de la mama izquierda en los animales restantes (AGLE, n=2 y PLACEBO, n=1; **Tabla 1**).

Tabla 1: Cronograma de las biopsias de mamas.

	Día -1	Día 0	Día 7	Día 14
Perra 1	BMD ₁	AGLE ₁	BMI ₁	
Perra 2	BMD ₂	AGLE ₂	BMI ₂	
Perra 3	BMD ₃	AGLE ₃		BMI ₃
Perra 4	BMD ₄	AGLE ₄		BMI ₄
Perra 5	BMD ₅	PLA ₅	BMI ₅	
Perra 6	BMD ₆	PLA ₆		BMI ₆

BMD: Biopsia de mama derecha. BMI: Biopsia de mama izquierda. AGLE: aglepristone. PLA: placebo.

Determinación de progesterona sérica

La determinación de progesterona se realizó por inmunoensayo enzimático quimioluminiscente en fase sólida (IMMULITE, Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, California).

Estudio histopatológico

Se fijaron las muestras de tejido mamario en solución de Bouin. Se deshidrataron, se incluyeron en parafina y se realizaron cortes histológicos de 4-5 μm . Parte de los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina para su estudio histológico, el resto de los cortes se destinaron para los ensayos de inmunohistoquímica.

Determinación por inmunohistoquímica de RP y antígeno Ki-67

La determinación de RP y Ki-67 se realizó por inmunohistoquímica en las secciones desparafinadas de los cortes histológicos obtenidos (16). Se desparafinaron los tejidos dejando las secciones histológicas por dos pasajes en xilol de 15 minutos cada uno. La hidratación del tejido se realizó por pasajes sucesivos en alcoholes de graduación decreciente, 100°, 96°, 80°, 50° y 40° de 5 minutos cada uno. Luego se lavaron dos veces en agua destilada, 10 minutos cada uno y dos veces en solución buffer fosfato salino (PBS), 10 minutos cada uno. La actividad de la peroxidasa endógena fue inhibida con solución de peróxido de

hidrógeno 3% en PBS por 20 minutos. Luego se lavaron nuevamente dos veces con PBS. El bloqueo de la adherencia inespecífica se realizó mediante la incubación durante 60 minutos con suero de caballo diluido en PBS (1/100) a temperatura ambiente. Sin lavar, se agregó el anticuerpo primario (anti-RP; Pr88, o el antígeno monoclonal Ki-67 MIB-1; DakoCytomation Dinamarca A/S). Luego de 60 minutos de incubación a temperatura ambiente, se realizaron dos lavados con PBS de 10 minutos. Se incubó con los anticuerpos secundarios biotinilados durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavó dos veces con PBS durante 10 minutos. Se incubó con el complejo streptavidina-peroxidasa, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Para el revelado se utilizó una solución cromógena que contenía el sustrato DAB (diaminobenzidina) El contraste de los preparados se realizó con hematoxilina de Mayer. Los preparados fueron montados con Entellan (Merck). Las muestras fueron observadas al microscopio (Axiophot, Carl Zeiss, Alemania). La adquisición de imágenes se realizó a través de una cámara digital (Powershot G6, 7.1 megapixels, Canon INC, Japón), adosada al microscopio.

Análisis estadístico

Para las inmunomarcaciones de RP y Ki-67 se contaron de 6 a 8 campos representativos a 1000x y 400x respectivamente. Se calculó el porcentaje de células epiteliales de acinos glandulares con inmunoexpresión contando los núcleos positivos (marrones) y negativos de aproximadamente 100 células (17,18).

En cada animal los porcentajes de positividad de RP y Ki-67 obtenidos en cada uno de los días del protocolo (día -1 vs. día 7 ó 14) se compararon por un test de Student para muestras apareadas. El nivel de significancia se estableció en $p < 0.05$.

RESULTADOS

Antes de comenzar los tratamientos los valores de progesterona sérica de las perras oscilaron entre los 23 y 36,7 ng/ml y no difirieron entre los animales de los grupos AGLE y PLA ($p < 0.1$). Durante el tratamiento con aglepristone esta hormona descendió 38,8% y el 71,6 % al día 7 y 14, respectivamente mientras que el grupo PLA el descenso fue solo del 7,5 %.

En las perras tratadas con aglepristone, la expresión de RP disminuyó al día 7 ($p < 0.01$) y al 14 ($p < 0.01$; **Figura 1**). En los animales del grupo PLA, la expresión de RP aumentó el día 7 ($p < 0.01$) o bien se mantuvo igual en el día 14 ($p > 0.1$; **Figura 2; Fotos 1 y 2**).

Por su parte la expresión de Ki-67, presentó un comportamiento similar. Ki-67 descendió al día 7 ($p < 0.01$) y 14 ($p < 0.01$; **Figura 3**) en las perras tratadas con aglepristone. En las hembras del grupo PLC Ki-67 no varió al día 7 ($p > 0.05$) ni al 14 ($p > 0.1$; **Figura 4; Fotos 3 y 4**).

Figura 1: Porcentaje (media \pm SEM) de expresión de receptores de progesterona en tejido mamario de perras tratadas con aglepristone (10 mg/kg) el día 1 del protocolo.

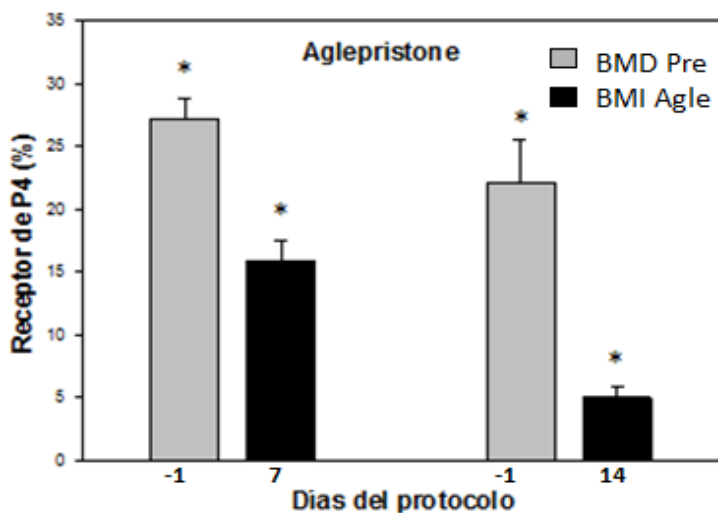


Figura 2: Porcentaje (media \pm SEM) de expresión de receptores de progesterona en tejido mamario de perras tratadas con un placebo el día 1 del protocolo.

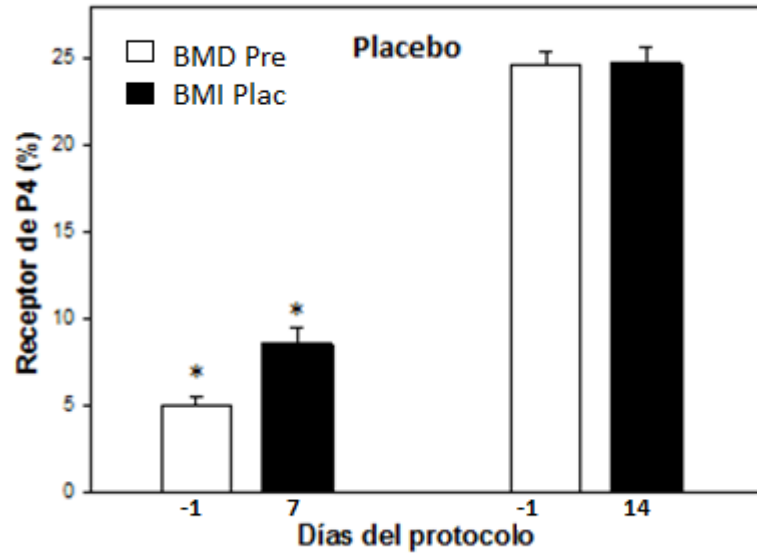


Figura 3: Porcentaje (media \pm SEM) de expresión de Ki-67 en tejido mamario de perras tratadas con aglepristone (10 mg/kg) el día 1 del protocolo.

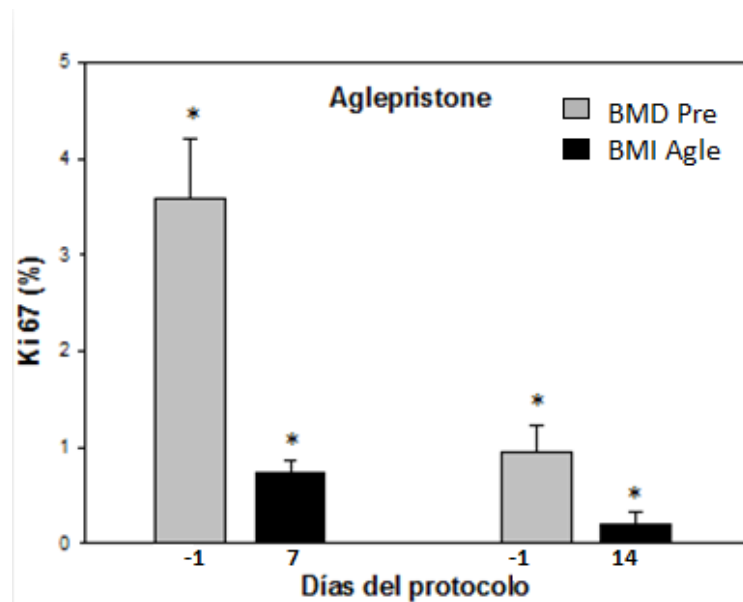


Figura 4: Porcentaje (media \pm SEM) de expresión de Ki-67 en tejido mamario de perras tratadas con un placebo el día 1 del protocolo.

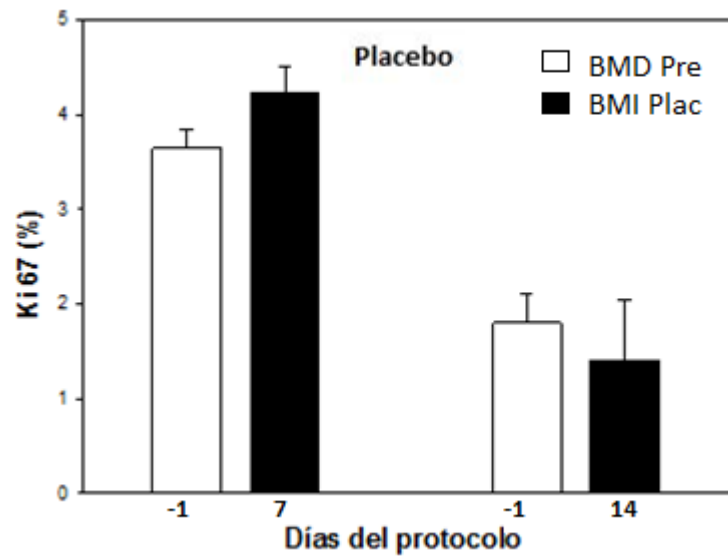
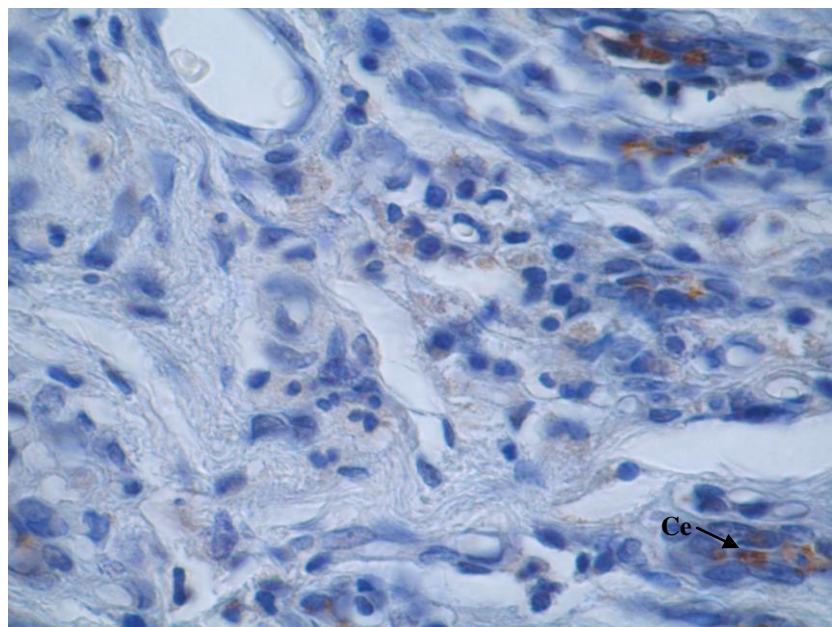
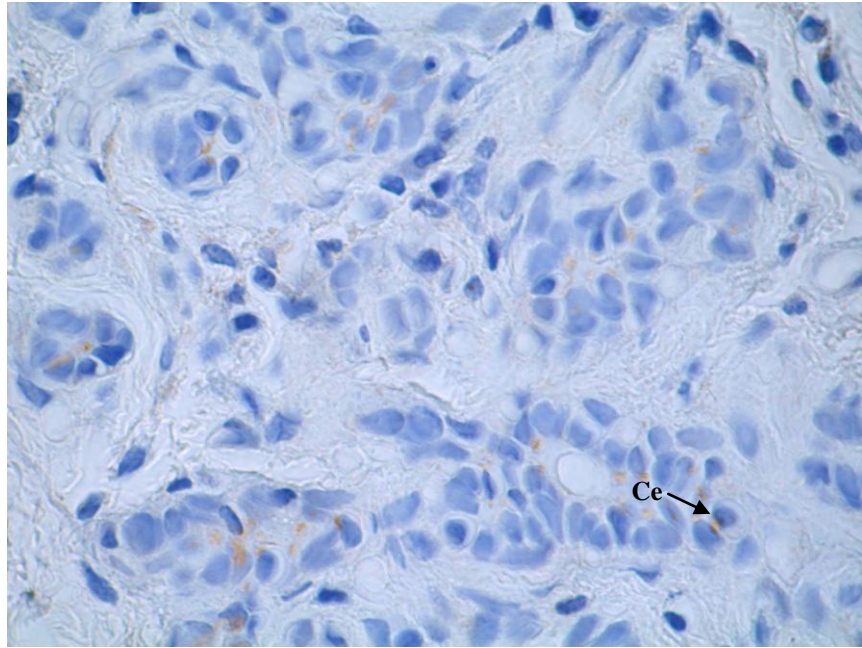


Foto 1: Inmunomarcación de receptores de progesterona en biopsias pretratamiento (1000x).



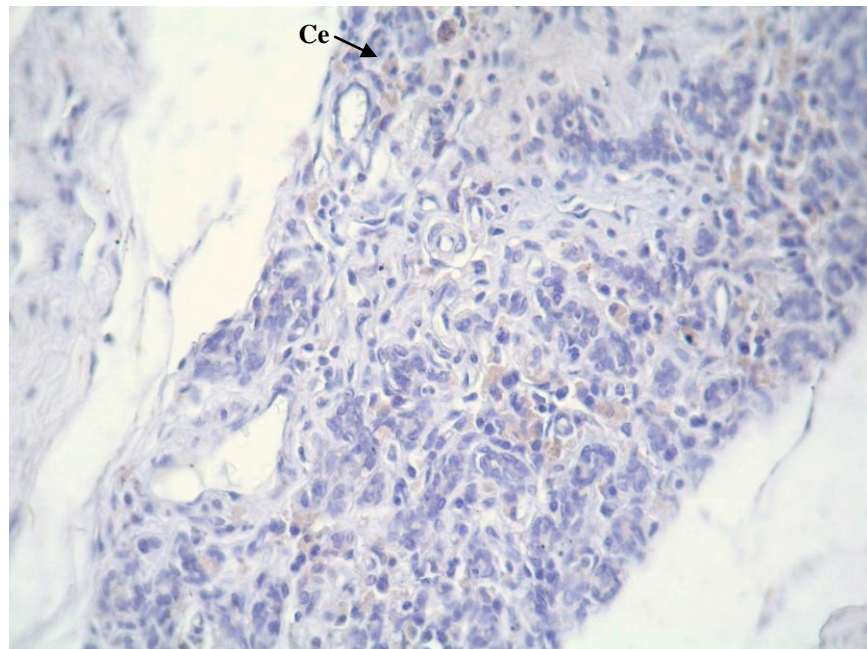
Ce: Células epiteliales con núcleos positivos

Foto 2: Inmunomarcación de receptores de progesterona en biopsias a los 7 días de tratamiento con aglepristone (1000x).



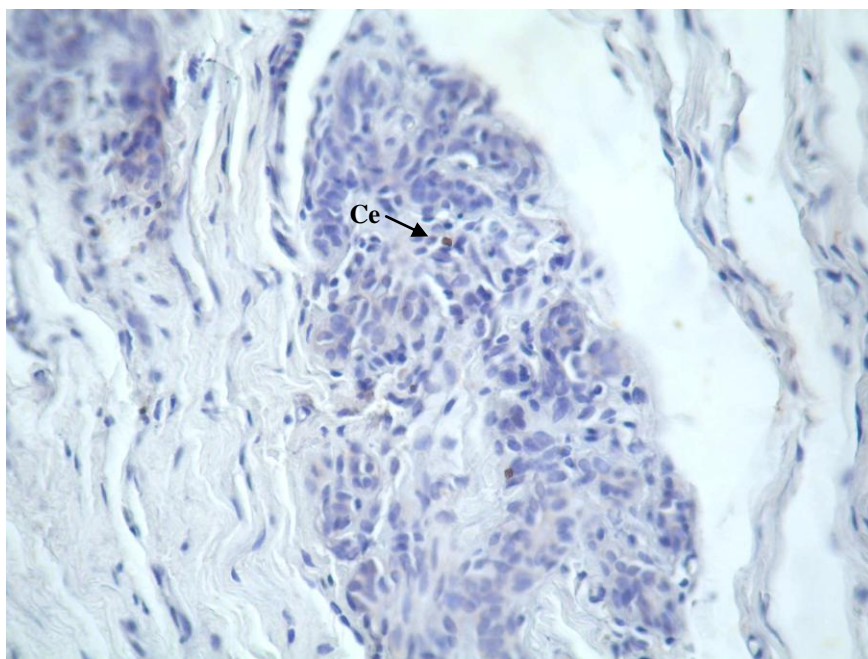
Ce: Células epiteliales con núcleos positivos

Foto 3: Inmunomarcación del marcador nuclear de proliferación Ki-67 en biopsias pretratamiento (400x).



Ce: Células epiteliales con núcleos positivos

Foto 4: Inmunomarcación del marcador nuclear de proliferación Ki-67 en biopsias de 7 días de tratamiento con aglepristone (400x).



Ce: Células epiteliales con nucleos positivos

DISCUSION

La fase lútea canina se caracteriza por su larga duración (hasta 90 días) y por valores elevados de progesterona sérica que pueden alcanzar hasta 80 ng/ml (19). Estas características fisiológicas hacen que la exposición de la glándula mamaria a dicha hormona sea muy importante y prolongada. En línea con los hallazgos de Galac y col. (2004; 20) los valores séricos de progesterona de las perras tratadas con el bloqueante de los RP descendieron de manera importante a través del estudio. Esto demuestra un efecto luteolítico tardío, cuyo mecanismo aún no se ha dilucidado (20).

El antiprogéstágeno aglepristone, a dosis terapéuticas, disminuyó significativamente la expresión de los RP y del marcador nuclear Ki-67 en las biopsias de tejido mamario tanto a los 7 como a los 14 días posteriores al tratamiento. Tal como se esperaba, estos resultados claramente demuestran el papel proliferativo de la progesterona a través de sus receptores en

el tejido mamario (2-4). Este mecanismo explicaría 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.

Además de los efectos antiproliferativos, este protocolo de aglepristone 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 y garantiza futuros estudios en la especie.

BIBLIOGRAFIA

1. ISMAIL, P.M.; AMATO, P.; SOYAL, S.M.; DEMAYO, F.J.; CONNEELY, O.M.; O'MALLEY, B.W.; LYDON J.P. (2003) Progesterone involvement in breast development and tumorigenesis—as revealed by progesterone receptor “knockout” and “knockin” mouse models. *Steroids* 68(10-13):779-787
2. MOL, J.A.; VAN GARDEREN, E.; RUTTEMAN, G.R.; RIJNBERK, A. (1996) 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* 57(1-2):67-71

3. VAN GARDEREN, E.; SCHALKEN, J.A. (2002) Morphogenic and tumorigenic potentials of the mammary growth hormone/growth hormone receptor system. *Molecular and Cellular Endocrinology* 197 (1-2):153-165
4. CONCANNON, P.W.; CASTRACANE, V.D.; TEMPLE, M.; MONTANEZ, A. (2009) Endocrine control of ovarian function in dogs and other carnivores. *Animal Reproduction*. 6(1):172-193.
5. LANTINGA-VAN LEEUWEN, I.S.; VAN GARDEREN, E.; RUTTEMAN, G.R.; MOL, J.A. (2000) Cloning and cellular localization of the canine progesterone receptor: co-localization with growth hormone in the mammary gland. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 75(4-5):219-28.
6. HOFFMANN, B.; LEMMER, W.; BOSTEDT, H.; FAILING, K. (2000) Application of the anti-progestin aglepristone for the conservative treatment of pyometra in the dog. *Tierarztl Prax* 28:323–329.
7. CONCANNON, P.W.; YEAGER, A.; FRANK, D.; IYAMPILLAI, A. (1990) Termination of pregnancy and induction of premature luteolysis by the antiprogestagen, mifepristone, in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility* 88:99–104.
8. LINDE-FORSBERG, C.; KINDHAL, H.; MADEJ, A. (1992) Termination of midterm pregnancy in the dog with oral RU 486. *Journal of Small Animal Practice* 33(7):331-336.
9. HUUHTANEN, R.L.; BLOMQVIST, C.P.; WIKLUND, T.A.; BÖHLING, T.O.; VIROLAINEN, M.J.; TUKIAINEN, E.J.; TRIBUKAIT, B.; LEIF, L.C. (1999) Comparison of the Ki-67 score and S-phase fraction as prognostic variables in soft-tissue sarcoma. *British Journal of Cancer* 79(5-6):945-951.

10. BORRE, M.; BENTZEN, S.M.; NERSTRØM, B.; OVERGAARD, J. (1998) Tumor cell proliferation and survival in patients with prostate cancer followed expectantly. *The Journal of Urology* 159(5):1609-1614.
11. SESHADRI, R.; LEONGAS-Y; MCCAUL, K.; FIRGAIRA, F.A.; SETLUR, V.; HORSFALL, D.J. (1996) Relationship between p53 gene abnormalities and other tumour characteristics in breast-cancer prognosis. *International Journal of Cancer* 69(2):135-41.
12. GERDES, J.; LEMKE, H.; BAISCH, H.; WACKER, H.; SCHWAB, U.; STEIN, H. (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *The Journal of Immunology* 133(4):1710-1715.
13. GERDES, J.; LI, L.; SCHLUETER, C.; DUCHROW, M.; WOHLLENBERG, C.; GERLACH, C. STAHMER, I.; KLOTH, S.; BRANDT, E; FLAD H.D. (1991) Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *American Journal of Pathology* 138(4):867-873.
14. KHAN, S.; BHANDARE, D.; CHATTERTON R. JR. (2005) The local hormonal environment and related biomarkers in the normal breast. *Endocrine-Related Cancer* 12(3):497–510.
15. CLEARY, J.B. (1987) *Breast Biopsy*. En: IRVIN, M.A.; CLEARY, J.B. *Breast Cancer Diagnosis and Treatment*. Editorial Mc Graw-Hill, p. 194-204.
16. RAMOS VARA, J.A. (2005) Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology* 42:405-426.
17. NIETO, A.I.; PEÑA, L.; PÉREZ-ALENZA, M.D.; SÁNCHEZ, M.A.; FLORES, J.M.; CASTAÑO, M. (2000) Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine

mammary tumors: Clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet Pathol* 37:239-247.

18. PARMAR, H; YOUNG, P.; EMERMAN, J.T.; NEVE, R.M.; SHANAZ DAIRKEE, S.; CUNHA, G.R. (2002) A Novel Method for Growing Human Breast Epithelium in Vivo Using Mouse and Human Mammary Fibroblasts. *Endocrinology* 43(12):4886-4896
19. CONCANNON, P.W. (1983) Reproductive physiology and endocrinology patterns of the bitch. In: Kirk RW, editor. *Current Veterinary Therapy VIII*. Philadelphia: W.B. Saunders Co, p. 886-901.
20. GALAC, S.; KOOISTRA, H.S.; DIELEMAN, S.J.; CESTNIK, V.; OKKENS, A.C. (2004) Effects of aglepristone, a progesterone receptor antagonist, administered during the early luteal phase in non-pregnant bitches. *Theriogenology* 62(3-4):494-500.

CONCLUSIONES FINALES

- La desmopresina demostró tener efectos antitumorales, confirmando los resultados previos obtenidos en modelos murinos. Así se infiere que la desmopresina podría prolongar la sobrevida libre de enfermedad y sobrevida general en perras con cáncer mamario cuando se administra en forma perioperatoria durante la extirpación quirúrgica del tumor primario.
- Con el número de animales utilizados en esta Tesis, no se pudo dilucidar el efecto de la extensión de la resección quirúrgica sobre la sobrevida libre de enfermedad y sobrevida general de perras con tumores de glándula mamaria. Es posible que un mayor número de animales sea necesario para detectar diferencias o bien que éstas surjan al comparar técnicas quirúrgicas más dispares como la nodulectomía y la mastectomía en bloque.
- El aglepristone demostró poseer efectos antiproliferativos en glándula mamaria canina y podría ser evaluado como tratamiento pos operatorio a las mastectomías en la especie.
- Tanto el aglepristone como la desmopresina, requieren de estudios posteriores más amplios y minuciosos sobre los mecanismos de acción y estimación de los factores que inciden en su mejor respuesta. No obstante, este trabajo de Tesis genera conocimientos de biología celular que eventualmente podrían ampliar el espectro de tratamientos convencionales.