

# RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y PROGESTERONA EN CARCINOMAS DE MAMA CANINOS. TÉCNICAS DE ESTUDIO Y VALOR PRONÓSTICO.

J. Martín de las Mulas,  
Y. Millán, D. Rincón,  
J. Ordás, F. Javier Andrés.\*

\*Clínica Veterinaria THOR (Córdoba)  
Dpto. de Anatomía y Anatomía  
Patológica Comparadas  
Facultad de Veterinaria.  
Universidad de Córdoba.

## RESUMEN.

En este trabajo presentamos los resultados de la estandarización de las técnicas de detección de receptores de estrógenos y progesterona en tumores de mama caninos, con el fin de analizar la hormonodependencia de dichos tumores. Además, hemos estudiado si la hormonodependencia de un tumor guarda relación con la evolución post-quirúrgica de la enfermedad contabilizando el periodo libre de enfermedad. Las técnicas de detección utilizadas fueron de tipo inmunohistoquímico y el número de tumores malignos analizados de 21. Nuestros resultados muestran que se puede analizar la naturaleza hormonodependiente de una neoplasia mamaria en las mismas muestras en las que se realiza el diagnóstico histopatológico, que la mitad, aproximadamente, de los tumores malignos de la mama canina son hormonodependientes, y que estos tumores tienen periodos libres de enfermedad más largos que los hormono-independientes, y por tanto, mejor pronóstico.

**Palabras clave:** Mama; Carcinoma; Perra; Receptores; Estrógenos; Progesterona; Hormonodependencia; Inmunohistoquímica; Pronóstico.

## INTRODUCCIÓN.

Los tumores de mama son los segundos en el orden de frecuencias en la especie canina, afectan a hembras de edades medias y su comportamiento biológico es maligno en la mitad, aproximadamente, de los casos. El pronóstico de los tumores malignos es desfavorable, con una supervivencia media postquirúrgica de 8 a 12 meses, y, sin embargo, el

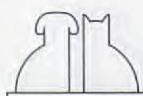
## ABSTRACT.

Results concerning the standardization of estrogen and progesterone receptors detection techniques, as a means to study the hormonodependence of canine mammary tumours, are presented. In addition, the prognostic value of hormonodependence has been evaluated by its association with the disease free period. Receptors detection techniques employed were of the immunohistochemical type, and the number of malignant tumours analyzed was 21. Our results show that the hormonodependence of canine mammary tumours can be analyzed in the very same tissue samples used for the histopathological diagnosis of the neoplasm. They also show that half of the tumours studied, approximately, are hormonedeprendent and that these tumours have longer disease free periods than hormone-independent carcinomas and, accordingly, better prognosis.

**Key words:** Mammary gland; Carcinoma; Dog; Estrogen; Progesterone; Receptors; Hormonedeprendent; Immunohistochemistry; Prognosis.

uso de tratamientos adyuvantes a la cirugía es muy limitado y no estandarizado<sup>(12)</sup>.

El tratamiento endocrino post-quirúrgico, bien sea administrando hormonas o antihormonas, o bien por métodos ablativos, se utiliza de forma rutinaria en las mujeres con carcinomas de mama hormonodependientes porque prolonga la supervivencia de modo significativo (incluso hasta 10 años) y alivia la



sintomatología asociada a la enfermedad. Además, también es un hecho comprobado en la mujer que los tumores que son hormonodependientes tienen mejor pronóstico (20).

Los carcinomas de mama hormonodependientes son aquéllos que contienen receptores de estrógenos y/o de progesterona (2, 20). Algunos tumores de mama caninos son tumores hormonodependientes (4, 13, 18, 21), pero los estudios realizados hasta la fecha son muy escasos y limitados al campo de la investigación, debido a que los métodos de análisis de receptores hormonales (métodos bioquímicos de unión del ligando al receptor) eran muy costosos, requerían muestras de tejido especialmente preparadas para tal fin y, sobre todo, no eran de fácil acceso. Así, en España no se realizan estos análisis en ninguna Facultad de Veterinaria o Laboratorio de Análisis Clínicos. En la actualidad, los métodos bioquímicos están siendo sustituidos por métodos inmunohistoquímicos que se basan en la unión del receptor hormonal a un anticuerpo específico, y una de cuyas mayores ventajas es que se pueden aplicar sobre las mismas muestras de tejido sobre las que se realiza el diagnóstico anatomo-patológico de la neoplasia (14, 19).

En este trabajo presentamos los resultados de la estandarización de los métodos inmunohistoquímicos de detección de receptores de estrógenos y progesterona en tumores de mama caninos. Además, presentamos los resultados de un estudio piloto en el que hemos analizado si la presencia de receptores de estrógenos y/o progesterona guarda relación con la evolución post-quirúrgica de la enfermedad.

## MATERIAL Y MÉTODOS.

### Material.

#### 1.1. Procedencia y número de casos.

Para la realización de este trabajo hemos utilizado 21 tumores malignos de mama que habían sido remitidos al Laboratorio de Diagnóstico Histopatológico de la Universidad de Córdoba entre los años 1993 y 1998 por la Clínica Veterinaria Thor y clasificados (9) como adenocarcinoma tubular simple (n=3), adenocarcinoma tubular complejo (n=3), adenocarcinoma papilar quístico complejo (n=1), carcinoma sólido simple (n=6), carcinoma sólido complejo (n=2), tumor mixto maligno (n=1) y patrón combinado (n=5). La raza y la edad de los 21 animales, así como la localización de los tumores, aparecen reflejados en la Tabla I.

## Métodos.

### 2.1. Procesado de las muestras.

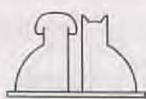
Todas las muestras objeto de estudio fueron piezas de extirpación quirúrgica (tumorectomías, mastectomías simples o mastectomías en bloque) que habían sido fijadas en formol salino al 10% e incluidas en parafina.

### 2.2. Detección de receptores de estrógenos y receptores de progesterona.

La técnica empleada fue la técnica inmunohistoquímica (IHQ) de la Avidina-biotina-peroxidasa (ABC) de Hsu y colaboradores (1981) modificada. El desarrollo de la técnica tiene tres partes fundamentales:

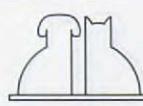
- Preparación de los cortes de tejido para el desarrollo de la reacción antígeno-anticuerpo (desparafinado, hidratación, inhibición de la peroxidasa endógena, desenmascaramiento antigénico y bloqueo de reacciones inespecíficas).
- Desarrollo de la reacción antígeno-anticuerpo mediante incubación de los cortes de tejido con los anticuerpos anti-receptores de estrógenos y anti-receptores de progesterona durante 18 horas a 4 grados centígrados.
- Amplificación de la reacción antígeno-anticuerpo para su visualización en microscopía óptica.

Los anticuerpos utilizados fueron comerciales y desarrollados frente a antígenos humanos, por los que la estandarización de las técnicas IHQ incluía la demostración de que estos anticuerpos reconocían también antígenos caninos (controles positivos de especie). Los controles positivos de especie (aquéllos tejidos que contienen el antígeno que se desea detectar con una técnica IHQ) utilizados fueron muestras de útero canino procesadas de forma idéntica a los tumores, es decir, fijadas en formol salino al 10% e incluidas en parafina, y el tejido mamario normal encontrado alrededor de los tumores. Además de los controles de especie, se utilizaron controles técnicos (aquéllos que prueban la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo) o controles negativos: cortes de tejido de útero canino en los que se sustituyó el anticuerpo específico por líquido ascítico de ratón (para comprobar si éste reacciona de manera inespecífica con los tejidos caninos objeto de estudio) y tampón fosfato (para comprobar que la señal óptica obtenida no se debe a reacciones indeseadas de los productos utilizados para colorear la reacción antígeno-anticuerpo); y cortes de tejido de bazo y pulmón caninos (para



**Tabla I.** Características epidemiológicas, clínicas e histopatológicas de las neoplasias analizadas y resultados del estudio de receptores hormonales.

	Número de caso	Raza	Edad	Localización	Tipo	Estíp	Grado	R.E	R.P
Período de enfermedad corto	B750/93	Caniche	7 años	¿?	Patrón combinado (Tubular y sólido)	Simple	III	-	-
	B507/93	Pastor alemán	9 años	¿?	Sólido	Simple	III	-	-
	B908/96	Cruzado	9 años	¿?	Sólido	Simple	III	-	-
	B341/93	Epagneul Bretón	13 años	¿?	Sólido	Complejo	II	-	+
	B248/97	Doberman	11 años	¿?	Carcinoma de células fusiformes	Simple	III	-	-
Período libre de enfermedad medio	B318/94	Cruzado	11 años	¿?	Sólido	Simple	II	-	+
	B247/96	Schnauzer	8 años	¿?	Patrón combinado (Túbulo-papilar)	Complejo	II	-	-
	B1172/95	Cruzado	6 años	¿?	Tubular	Complejo	I	+	+
Período libre de enfermedad largo	B148/95	Pastor Belga	7 años	Mama 5D	Patrón combinado (Túbulo-papilar)	Complejo	I	+	-
	B826/97	Cruzado	13 años	Mama 3D y 4D	Papilar intraquistico	Complejo	II	-	+
	B948/95	Cocker Spaniel	8 años	¿?	Tubular	Complejo	II	-	+
	B1221/95	Yorkshire Terrier	8 años	Mama 11	Patrón combinado (Tubular y sólido)	Simple	III	-	-
	B226/96	Foxterrier	10 años	¿?	Tumor mixto maligno	Mixto	I	+	+
	B284/97	Rough Collie	11 años	Mama 5I	Tubular	Complejo	I	+	-
	B703/97	Cocker Spaniel	9 años	¿?	Tubular	Simple	II	-	+
	B918/97	Cruzado	13 años	Mama 2I	Tubular	Simple	II	-	-
	B40/98	Cocker Spaniel	10 años	Mamas 3, 4, 5D y 1, 2, 3, 5I	Sólido	Complejo	I	+	-
	B866/96	Caniche	8 años	Mama 1I	Patrón combinado (Túbulo-papilar y sólido)	Simple	III	-	-
	B616/97	Caniche	9 años	Mama 1I	Sólido	Simple	II	-	-
	B88/97	Caniche	6 años	Mama 4I	Tumor mixto maligno	Mixto	II	+	+
	B1034/96	Caniche	9 años	Mama 5I	Tubular	Simple	II	-	-



comprobar que en estos tejidos que carecen de RE y RP no había reacción).

### 2.3. Evaluación del valor pronóstico de las presencia o ausencia de receptores hormonales.

La evaluación del valor pronóstico de la presencia de receptores de estrógenos y/o progesterona en los tumores malignos de mama de perra se ha realizado mediante estudios de correlación (prueba de la probabilidad exacta de Fisher) (23) entre la expresión de receptores hormonales y la evolución postquirúrgica de los animales. La evolución postquirúrgica se analizó mediante revisiones cada 3-4 meses hasta un máximo de 18 meses. En cada revisión se evaluaron la presencia o ausencia de recidivas (exploración clínica), la presencia o ausencia de metástasis (radiografía de tórax) y la muerte relacionada con la enfermedad neoplásica (evaluación clínica y necropsia). Los casos objeto de estudio se dividieron en tres grupos en función de su período libre de enfermedad (grupo 1=0-6 meses; grupo 2=7-12 meses y grupo 3=13-18 meses) (Tabla I).

Como control de la población objeto de estudio se evaluó la relación entre el grado histológico de malignidad de las neoplasias, que es un factor pronóstico de valor probado (11), y la evolución postquirúrgica de los animales utilizando la misma prueba estadística.

## RESULTADOS

### Detección de receptores de estrógenos y progesterona.

#### 1.1. Controles.

**A. Controles positivos y negativos.** en las muestras de útero (control positivo), el anticuerpo anti-receptores de estrógenos (anti-RE) reaccionó de forma intensa y uniforme con los núcleos de los leiomioцитos del miometrio, con los núcleos de los fibroblastos del estroma endometrial y con las células del epitelio glandular y del epitelio de superficie del endometrio (Fig. 1). La reacción con el anticuerpo anti-receptores de progesterona (anti-RP) fue similar, con la única excepción de las células epiteliales de la mucosa, que no reaccionaron. El tejido mamario normal adyacente a los tumores también reaccionó con ambos anticuerpos en todos los casos en que se identificó (14 en los cortes con el anticuerpo anti-RE y 15 en los casos con el anticuerpo anti-RP) (Fig. 2).

En las muestras de útero en las que no se aplicaron

los anticuerpos específicos, y en las de bazo y pulmón (controles negativos) no se obtuvo inmunoreactividad con ninguno de los anticuerpos utilizados.

#### 1.2 Tumores

**A. Receptores de estrógenos:** de los 21 casos estudiados, 6 (28.5%) fueron positivos. Los productos inmunoreactivos se observaron en los núcleos de las células epiteliales y en la mayoría de los casos, en las secreciones presentes en la luz de los túbulos neoplásicos (Fig. 3). La inmunoreacción se observó en la mayoría de las células neoplásicas en el 10% de los casos, aproximadamente, (Fig. 3) mientras que los restantes presentaban cantidades bajas (Fig. 4) o medias de células positivas en porcentajes similares. Al analizar la estirpe celular de los tumores, observamos que ninguno de los 11 de tipo simple presentaba RE, siendo todos los positivos o complejos (4) o mixtos (2).

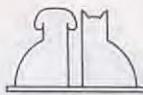
**B. Receptores de progesterona:** de los 21 casos estudiados, 9 (43%) fueron positivos. Los productos inmunoreactivos se observaron en los núcleos de las células epiteliales tumorales (Fig. 5). La cantidad de células positivas en cada tumor fue baja en la mayoría de los casos (65%). Algunas células fusiformes y localizadas, por lo general, cerca de los nidos de células epiteliales tumorales (Fig. 5), fueron positivas en 5 de los 21 casos (24%). Los tumores complejos y mixtos presentaban RP (6 de 10) con mayor frecuencia que los simples (3 de 11).

**C. Receptores de estrógenos y receptores de progesterona:** de los 21 tumores analizados, 12 (57%) presentaban RE, RP o ambos. De estos 12 casos, 3 eran simples y 9 complejos (7) o mixtos (2). La relación entre estirpe celular y expresión de receptores hormonales fue estadísticamente significativa ( $p = 0,01$ ).

## VALOR PRONÓSTICO DE LA HORMONODEPENDENCIA EN LOS TUMORES MALIGNOS DE PERRA.

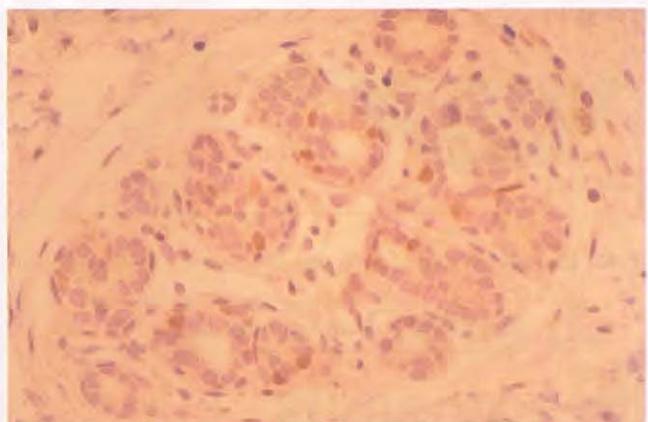
#### 2.1. Control de la población objeto de estudio (relación entre el grado histológico de malignidad y la evolución postquirúrgica).

De los 21 tumores evaluados, 5 tuvieron un período de evolución postquirúrgica corto, y 4 de estos

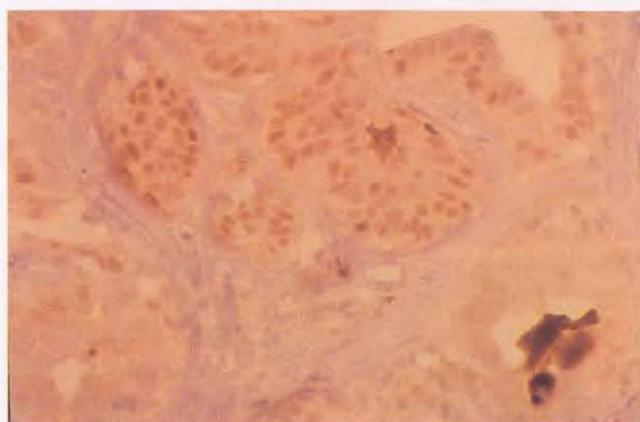




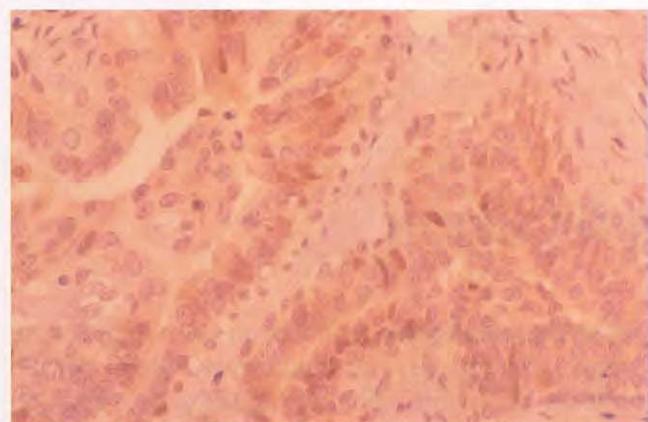
**Fig. 1.** Útero canino (control positivo). En la imagen se observan numerosos núcleos de color marrón, tanto en el miometrio como en el estroma y el epitelio glandular del endometrio. El color marrón es el resultado del coloreado de la reacción antigeno-anticuerpo, mientras que los núcleos azules son negativos. Anticuerpos anti-RE, técnica del ABC, 20X.



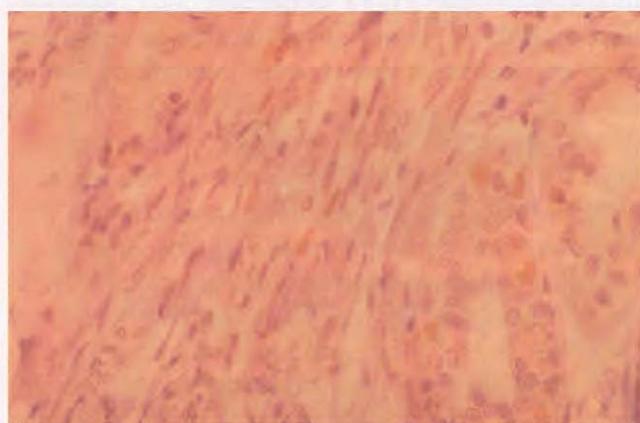
**Fig. 2.** Lobulillo mamario (control positivo). En la imagen se observa un lobulillo mamario con algunas células epiteliales (núcleos redondeados) y mioepiteliales (núcleos alargados) positivos (núcleos de color marrón). Anticuerpos anti-RP, técnica del ABC, 20X.



**Fig. 3.** Tumor mixto maligno grado II (B88/97). En la imagen se observa el componente epitelial del tumor, de arquitectura tubular, y con la mayoría de las células neoplásicas positivas (núcleos marrones). Anticuerpo anti-RE, técnica del ABC 40X.



**Fig. 4.** Adenocarcinoma túbulo-papilar complejo de grado I (B148/95). En la imagen se observa el componente epitelial de la neoplasia con algunas células positivas (núcleos marrones). Anticuerpo anti-RE, técnica del ABC, 40X.



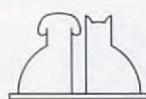
**Fig. 5.** Adenocarcinoma tubular complejo grado I (B1172/95). En la imagen se observaron tanto el elemento epitelial (tubular) como el mioepitelial (fascicular) de la neoplasia y en ambos hay algunos núcleos positivos (color marrón). Anticuerpo, técnica del ABC, 40X.

eran de grado III, mientras que 16 tuvieron períodos de evolución postquirúrgica medios y largos, y solo 2 eran de grado III ( $p= 0.01$ ) (Tabla II).

## 2.2. Valor pronóstico de la expresión de receptores hormonales.

**A.** Relación entre la expresión de receptores de estrógenos y progesterona y el grado histológico de malignidad: Los 5 tumores de grado I presentaban receptores hormonales (RE y/o RP), mientras que todos los tumores de grado III fueron RE(-) y RP(-) (Tabla III).

b) Relación entre la expresión de receptores de estrógenos y progesterona y el período libre de enfermedad: El 57% de los tumores analizados presentaban receptores hormonales (RE y/o RP) y el período libre de enfermedad fue corto (6 meses) en 1 caso, medio (12 meses) en 2 casos y largo (18 meses) en 9 casos ( $p= 0.04$ ) (Tabla IV).



**Tabla II.** Relación entre el grado histológico de malignidad y el periodo libre de enfermedad.

	Corto	Medio	Largo
Grado I	0	1	4
Grado 2	1	2	7
Grado 3	5	0	2

**Tabla III.** Relación entre la expresión de receptores hormonales y el grado histológico de malignidad.

	Con receptores	Sin receptores
Grado I	5	0
Grado 2	7	3
Grado 3	0	7

**Tabla IV.** Relación la expresión de receptores hormonales y el periodo libre de enfermedad.

	Con receptores	Sin receptores
Corto	1	5
Medio	2	1
Largo	9	4

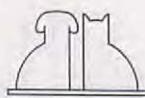
## DISCUSIÓN

Nuestros resultados demuestran, primero, que se puede analizar la hormonodependencia de los tumores de mama caninos mediante la detección inmunohistoquímica de receptores de estrógenos y receptores de progesterona en las mismas muestras que sirven para hacer el diagnóstico histopatológico de la neoplasia, y segundo, que los tumores que son hormonodependientes tienen períodos libres de enfermedad tras la cirugía más largos que los tumores que carecen de receptores.

Las técnicas inmunohistoquímicas son una importante herramienta tanto en el diagnóstico anatomo-patológico como en los estudios de investigación, siendo la técnica del complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC) una de las más utilizadas por su elevada sensibilidad, por la versatilidad del método (ya que se basa en la unión no inmunológica de la avidina a la biotina y, por tanto, puede aplicarse con independencia de la especie), y por la gran cantidad de reactivos disponibles comercialmente, de manera que la única variable a la hora de utilizarla es el anticuerpo específico frente al antígeno que se desea buscar (10, 17). Cada día son más los anticuerpos comerciales que se desarrollan frente a gran variedad de antígenos y la patología veterinaria se ha visto beneficiada de este auge, al comprobarse que gran cantidad de anticuerpos desarrollados frente a antígenos humanos presentan reacciones cru-

zadas con antígenos animales equivalentes (24). En nuestro estudio, los dos anticuerpos utilizados reaccionaron con los controles positivos de especie, tal y como ya habían comprobado otros autores (3, 25) que detectaron receptores hormonales en el miometrio y en los fibroblastos del estroma endometrial, así como en las células epiteliales endometriales utilizando, como nosotros, anticuerpos desarrollados frente a antígenos humanos. Algunos antígenos precisan métodos especiales de procesado de las muestras de tejido para poder ser detectados con técnicas IHQ (17), pero muchos de ellos se conservan bien en muestras procesadas rutinariamente, y entre ellos figuran los RE y los RP (3, 6, 8, 14, 16, 19, 25) (Martín de las Mulas *et al.*, 2000; Millán *et al.*, 2000) tal y como hemos observado en este estudio.

El 28,5% de los tumores malignos estudiados tenían receptores de estrógenos. Algunos autores ya habían estudiado la presencia de RE en tumores de mama caninos utilizando la técnica bioquímica del DCC (4, 5, 13, 18, 21). Sin embargo, se han publicado recientemente tres estudios 3 estudios inmunohistoquímicos de detección de receptores de estrógenos en tumores de mama caninos, y las cifras obtenidas con estas técnicas son similares a las nuestras (6, 8, 16). Así, (8) encontraron que el 33,3% de los tumores analizados tenían RE, y (6) solo en el 10% de los casos. La técnica del DCC se basa en la unión del ligando (la hormona) al receptor, y se usa sobre homogeneizados de tejido en los que no es posible distinguir si el contenido en receptores corresponde



a la masa tumoral o al tejido mamario normal circundante o invadido, de manera que, en este tipo de muestras, si la mama normal contiene RE y el tumor no, la técnica bioquímica será un falso positivo (1). Una de las mayores ventajas de las técnicas inmunohistoquímicas con respecto a las bioquímicas es que permiten identificar de manera precisa en qué estructuras tisulares hay receptores hormonales y de este modo, detectar si están en tejido mamario adyacente a las lesiones tumorales. Es posible que las cifras tan altas publicadas por otros autores en tumores caninos se deban al menos en parte, a la existencia de falsos positivos. De hecho, nosotros hemos encontrado RE y RP en todas las muestras de tejido glandular normal encontradas alrededor de los tumores.

El 43% de los tumores malignos analizados presentaban receptores de progesterona. En algunos estudios previos realizados con técnicas bioquímicas las cifras fueron similares a las nuestras (18, 21, 22), próximas al 50%, pero otros, como Martín *et al* (1984) encontraron que un 25% de los casos, aproximadamente, de los tumores malignos caninos expresaban RP. Sin embargo, si estos autores hubieran utilizado el mismo umbral de positividad que los anteriores (5 fmol/mg de proteína en vez de 10 fmol/mg) su porcentaje de casos con RP sería del 63%. Por último Donnay y colaboradores encontraron que el 80%, al menos, de los tumores malignos de su serie expresaban RP, cifras que podría incluir verdaderos y falsos positivos, tal y como hemos comentado anteriormente. El único estudio inmunohistoquímico realizado hasta la fecha sobre 10 tumores malignos reveló que el 60% de los casos tenían RP (6).

El 57% de los tumores analizados tenían receptores (RE y/o RP). Ahora bien, sólo el 15% de estos tumores expresaban ambos receptores. Esta cifra es inferior a las publicadas en algunos estudios bioquímicos, como el de Rutteman *et al* y el de Parodi *et al*, realizados con tumores caninos en los que observaron que el 40% de los casos expresaban ambos receptores, pero más similar a la obtenida por

Martín *et al* (1984), que utilizando un umbral de positividad mayor que Rutteman *et al* (1988), encontraron que el 20% de los casos analizados contenían ambos receptores. Es posible que las técnicas inmunohistoquímicas solo sean sensibles, en general, para umbrales superiores a los 10 fmol/mg de proteína. El resto de los grupos, que incluye los RE (+) RP (-), los RE (-) RP (+) y los RE (-) RP (-) representa en nuestra serie porcentajes similares a los publicados por Parodi *et al* (1984) en una serie de 144 tumores malignos caninos. Estos autores son los únicos que han publicado, hasta la fecha, un estudio de este tipo pero con métodos bioquímicos.

En cuanto al valor pronóstico de la expresión de receptores hormonales observamos que los tumores con receptores hormonales tienen períodos libres de enfermedad más largos, y por tanto tienen mejor pronóstico que los que carecen de receptores. Este hecho es ampliamente conocido en la mujer (2, 20) y también ha sido comprobado en alguna serie de tumores caninos pero utilizando métodos bioquímicos (13, 22). La validez de nuestros resultados descansa, a su vez, en la comprobación, en la misma población, de la relación directa que existe entre los grados histológicos de malignidad más bajos y los pronósticos más favorables (11, 15). De igual modo, hemos podido comprobar que los tumores simples se asocian a períodos libres de enfermedad más cortos que los complejos y mixtos (7, 15).

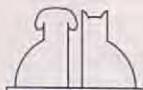
En conclusión, nuestros resultados demuestran la accesibilidad de los estudios de hormonodependencia en los tumores de mama caninos y su valor como indicador pronóstico favorable, y, sobre todo, proporcionan una herramienta básica para la realización de ensayos clínicos de tratamiento endocrino postquirúrgico.

## AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado con el Proyecto PM98-0164 de la DGESIC del MEC.

## BIBLIOGRAFÍA.

1. Baulieu E-E, Mester J. Steroid hormone receptors. En: De Groot L.J. (Ed): Endocrinology Vol 1, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1989: 16-39.
2. Brooks SC y Singhakowinta A. Steroid hormones in breast cancer. En: Brooks S.C., Singhakowinta A. (Ed): Special topics in endocrinology and metabolism, 1982: 4: 29-67.
3. Dhaliwal GK, England GC, Noakes DE. Immunocytochemical localization of oestrogen and progesterone receptors in the uterus of the normal bitch during oestrus and metoestrus. *J Reprod Fertil Suppl* 1997; 51: 167-176.
4. Donnay I., Rauls J., Versteegen J., Ectors F. Epidemiologie et hormonodépendance des tumeurs mammaires du chien. *Ann Méd Vét* 1989; 133: 491-503.
5. Donnay I., Rauts J., Wouters-Ballman P. Receptors for oestrogen, progesterone and epidermal growth factors in normal and tumourous canine mammary tissues. *J Rep Fert Suppl* 1993; 47: 501-512.
6. Geraldes M., Gartner F., Schmitt F. Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary



- glands and spontaneous mammary tumours. *The Vet Record* 2000; 146:403-406.
- 7. Gilbertson SR, Kurzman ID, Zachrau RE, Hurvitz AI, Black MM. Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Vet Pathol* 1983; 20: 127-142.
  - 8. Graham JC, O'Keefe DA, Gelberg HB. Immunohistochemical assay for detecting estrogen receptors in canine mammary tumors. *Am J Vet Res* 1999; 60: 627-630.
  - 9. Hampe JF, Misdorp W. Tumours and dysplasias of the mammary gland. En: World Health Organization (Ed): International Histological Classification of Tumours of Domestic Animals, Ginebra, 1974: 111-134.
  - 10. Hsu SM, Raine L, Farner H. The use of anti-avidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase techniques. *Am J Clin Pathol* 1981; 75: 816-821.
  - 11. Lagadis M, Estrada M. Tumeurs mammaires de la chienne: critères du prognostic histologique et intérêt d'un grading. *Rec Méd Vét* 1990; 166: 1035-1042.
  - 12. MacEwen EG, Withrow SJ. Tumors of the Mammary gland. En: Withrow S.J., MacEwen B.R. (Ed): Small Animal Clinical Oncology, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1996: 356-372.
  - 13. Martin PM, Cotard M, Mialot JP, Andre F, Raynaud J-P. Animal models for hormone-dependent human breast cancer. Relationship between steroid receptor profiles in canine and feline mammary tumors and survival rate. *Cancer Chemother Pharmacol* 1984; 12: 13-70.
  - 14. Masood S, Supranee DEE, Jefrey D, Goldstein. Immunocytochemical Analysis of Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Am J Clinical Path* 1991; 96: 59-63.
  - 15. Misdorp W, Else RW, Hellmen E, Lipscomb TP. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. Second series, volume VII. AFIP. Washington, D.C. 1.999.
  - 16. Nieto A, Peña L, Pérez-Alenza MD, Sánchez MA, Flores JM, Castaño M. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet Pathol* 2000; 37:239-247.
  - 17. Palacín A. Técnicas inmunohistoquímicas. Aspectos teórico-prácticos. ATOM S.A. (Ed), Barcelona, 1.984.
  - 18. Parodi AL, Mialot J.P., Martin PM, Cotard M, Raynaud JP. Canine and feline mammary cancers as animal models for hormone-dependent human breast tumors. Relationships between steroid receptor profiles and survival rates. *Prog Cancer Res Ther* 1984; 31: 357-365.
  - 19. Pertschuk LP, Kim DS, Nayer K, Feldman JG, Eisenberg KB, Carter AC. Immunocytochemical estrogen and progestin receptor assays in breast cancer with monoclonal antibodies. Histopathologic, demographic, and biochemical correlations and relationship to endocrine response and survival. *Cancer* 1990; 66: 1663-1670.
  - 20. Rosai J. Ackerman's Surgical Pathology. vol 2. 8th ed. Mosby, St Louis, 1996: 1565-1660.
  - 21. Rutteman GR, Misdorp W, Blankenstein MA, Brown WE. Oestrogen (ER), and progestin receptors (PR) in mammary tissue of the female dog: different receptor profile in non-malignant and malignant states. *Br J Cancer* 1988; 58: 594-599.
  - 22. Sartin EA, Barnes S, Kwapien RP, Wolfe L.G. Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs. *Am J Vet Res* 1992; 53: 2196-2200.
  - 23. Siegel S. Non-parametric statistics for the behavioral sciences. Book Company. McGraw-Hill, New York, 1956: 121-130.
  - 24. Smith RA. Evaluation of cross-species reactivity of antibodies to human antigens in animal models using immunoperoxidase techniques. *J Histotechnol* 1990, 13: 255-269.
  - 25. Vermeirsch H, Simoens P, Lauwers H, Coryn M. Immunohistochemical detection of estrogen receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormonal levels. *Theriogenology* 1999; 51: 729-743.

# "Me llamo Roco y soy adicto"



Comencé a comer Kilina a los ocho meses de edad y desde entonces no puedo pasar sin él. No sé si es su sabor o la energía que me da, pero no he probado nada igual. Mi novia dice que por qué no pruebo otras cosas, que está harta de correr detrás de mí...

Pero yo nunca me he sentido mejor que cuando como Kilina.

**NUTRAL**  
N PET LINE

**Kilina**

**Expertos en Nutrición Animal**

NUTRAL S.A. Apdo. de correos 58. Colmenar Viejo (Madrid).  
Tel. 91 845 88 20 / Fax 91 845 48 68 / E-mail: kilina@nutral.com

