



**Expresión de los Receptores de
Estrógenos y Progesterona en
tejido mamario canino normal**

Rafael Sauto Vinicio

**Tutora: Dra. Celia Tasende
Co-tutora: Dra. Claudia Della Cella**

**Tesis de Grado para obtener el título Licenciatura en Bioquímica,
Facultad de Ciencias**

**Área Bioquímica, Departamento de Biología Molecular y Celular,
Facultad de Veterinaria, Universidad de la República**

**MONTEVIDEO
URUGUAY**

2013

"Hablaís del fuego del genio. Más de una bendita mujer, muerta sin gloria y sin ser recordada, ha brindado mas del verdadero calor vital que guarda la vida en las almas humanas, sin una chispa que pase fugaz por su humilde chimenea para controlar al mundo, del que haría humear a una docena de teorías, o arder a un centenar de odas, en las mentes de tantos hombres de genio"

Oliver Wendel Holmes

A mi familia y amigos,
que siempre estuvieron y están conmigo.

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis de Grado se realizó en el marco de la Tesis de Maestría de la **Dra. Claudia Della Cella** (Expresión de los Receptores de Estrógenos y Receptores de Progesterona en tejido mamario canino normal y tumoral), quien me brindó la posibilidad de llevar a cabo este trabajo. A mi jefa y tutora de tesis, **Dra. Celia Tasende**, quien me brindó su gran disposición y me permitió realizar los experimentos en el Área Bioquímica, Facultad de Veterinaria. Los reactivos fueron aportados por el apoyo a DT de la CIDEC y CSIC.

Al **Dr. Mario Quintero**, que me ayudó muchísimo en la obtención de muestras. A la Técnica en Anatomía Patológica **María Jesús Sabalsagaray**, por brindarme su ayuda en el procesamiento de las muestras. Al **Dr. Danilo Fila**, por su gran ayuda en la técnica de citología vaginal y clasificación de grupos de las perras. A todos los que contribuyeron directa o indirectamente en esta tesis: **Preparadora Perla Rubianes, Dra. Mariana Amoedo, Dra. Aline Freitas, Dr. Juan Pablo Damián, Dr. Marcelo Rodríguez-Piñón, Dr. Alejandro Bielli, Preparadora Isabel Sartore y Dra. Ana Meikle**, quienes colaboraron en parte del trabajo de laboratorio y ayudaron brindándome información así como en el aprendizaje de distintas técnicas.

A mi querida compañera, amiga y novia **Cecilia**, quien me supo orientar, escuchar y tolerar para hacer este trabajo, haciendo junto a mí con una panza importante de embarazo “viajecitos” para buscar las muestras de glándula mamaria de perras, incontables veces de ayuda en el laboratorio en la centrifugación de las muestras, tinciones con azul de metileno, horas de microscopio, las inmunohistoquímicas y los análisis estadísticos. A mi primer bebé **Vicente**, que antes en la pancita me daba mucha fuerza, aliento y voluntad, una energía que no se encuentra todos los días y después afuera me dio el regalo más lindo: una sonrisa sin igual y carcajadas que me alentaron y alientan muchísimo para seguir adelante. A mis padres, **Martha** y **Daniel**, que me apoyaron y pusieron su gran cuota de respaldo eterno de todos los días. A mi hermana, **Romina**, que me siguió toda la carrera apoyándome y dándome para adelante con este trabajo. A mi abuelo, **Ciro**, que como siempre me escuchó desde el vamos hasta el final, dándome un gran aliento y transmitiéndome mucha paciencia. A mi abuela, **Beatriz**, que siempre me alentó hasta el final de la carrera. A mis suegros, **Juanita** y **Miguel**, que han sabido escucharme y transmitirme una gran confianza desde San José para poder sobrellevar este trabajo. A mi tocayo y amigo **Rafael González**, que supo darme armas para manejarme en este trabajo así como recorrer juntos lo que ha sido esta carrera científica que nos impulsa a poder cambiar la manera de pensar y nos abre la mente para poder “innovar”. A mi amiga **Pilar Hernández**, por su gran apoyo moral en la tesis.

RESUMEN

A diferencia de la mayoría de los animales domésticos, la perra se distingue por tener intervalos prolongados de actividad e inactividad sexual, de acuerdo a su ciclo reproductivo. En este trabajo se estudió la concentración, localización y distribución de los receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP) en tejido mamario canino normal durante el ciclo reproductivo y antes de la pubertad y los niveles circulantes de progesterona. La concentración de ambos receptores se estudió por la técnica bioquímica de múltiples puntos y la localización y distribución por inmunohistoquímica. La concentración de progesterona sérica se midió por radioinmunoanálisis. Se utilizaron muestras de glándula mamaria en proestro (n=3), estro (n=2), diestro (n=4), anestro (n=3) y en prepúberes (n=4). La intensidad de tinción a RE α y RP se evaluó en tejido conjuntivo, tejido epitelial alveolar y epitelio de conductos mamarios. La concentración de RE y RP se analizó por el modelo de Scatchard inverso. Los resultados se expresaron como $\bar{X} \pm$ pooled s.e. y se analizaron por ANOVA, se incluyó los efectos de observador, compartimiento histológico y etapa del ciclo. La concentración (ng/mL) de progesterona circulante fue mayor (p=0,03) en perras en diestro que en proestro, estro, anestro y prepúberes (52 \pm 11; 0,93 \pm 13; 2,81 \pm 15; 0,25 \pm 13 y 0,48 \pm 11 respectivamente). Se observó tinción a RE α y RP en el tejido conjuntivo, tejido epitelial alveolar y epitelio de conductos en todas las muestras de perras adultas pero no en prepúberes. La intensidad de tinción a RE α y RP fue afectada por el estadio del ciclo y compartimiento histológico y hubo interacción entre ambos solo para el RE α . En proestro y anestro, la tinción a RE α en tejido epitelial alveolar fue mayor (p<0,006) que en tejido conjuntivo y epitelio de conductos, mientras que en estro y diestro no hubo diferencias. La tinción a RP en tejido epitelial alveolar y conjuntivo fue mayor (p<0,04) en proestro y estro en relación al diestro y anestro. La concentración (fmol/mg de proteína) de RE fue menor (p<0,0003) en diestro que en proestro, estro y anestro (19 \pm 3,2; 63 \pm 3,7; 61 \pm 4,5 y 52 \pm 3,7 respectivamente) y la de RP fue menor (p=0,05) en diestro que en proestro y estro (19 \pm 2,6; 28 \pm 2,9 y 43 \pm 3,6 respectivamente) y similar en anestro (14 \pm 2,9). La concentración (fmol/mg de tejido) de RE y RP en perras prepúberes fue menor (0,33 \pm 0,29 y 0,34 \pm 0,10 respectivamente) que en las adultas (1,12 \pm 0,29 en diestro; 0,41 \pm 0,12 en anestro RE y RP respectivamente). La menor intensidad de tinción a RE α y RP en diestro concuerda con lo reportado en roedores, sin embargo, en mujeres y cabras no se encontraron diferencias en la tinción a RP entre la fase folicular y luteal. En conclusión, las diferencias en la localización y distribución tisular de RE α y RP, así como la concentración de ambos receptores en las diferentes etapas del ciclo reproductivo sugieren diferencias en la sensibilidad a los estrógenos y la progesterona en los distintos compartimientos histológicos y en las distintas etapas del ciclo.

ÍNDICE

I) INTRODUCCIÓN

La hembra canina	1
Ciclo reproductivo de la perra	1
Cambios histológicos en la glándula mamaria de la hembra canina durante el ciclo reproductivo	3
Hormonas esteroides ováricas y mecanismo de acción	4
Receptores de estrógenos y progesterona en la glándula mamaria	5

II) OBJETIVOS ESPECÍFICOS 6

III) MATERIALES Y MÉTODOS

Animales	7
Procesamiento de las muestras	7
Clasificación de los animales	7
Determinación de la concentración de progesterona sérica	9
Distribución de RE α y RP por inmunohistoquímica	10
Análisis de imagen	11
Determinación de la concentración de RE y RP	12
Análisis estadístico	13

IV) RESULTADOS

Concentraciones de progesterona sérica	13
Distribución de RE α por inmunohistoquímica	13
Distribución de RP por inmunohistoquímica	16
Concentración de RE y RP	18
RE y RP en perras prepúberes en relación a las adultas	20

V) DISCUSIÓN 20

VI) CONCLUSIONES 22

VII) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 23

I) INTRODUCCIÓN

La hembra canina

La hembra canina por naturaleza vive dentro de una estructura familiar o de manada, lo que le proporciona apoyo físico y protección. La perra doméstica (*Canis familiaris*) tiene un rol fundamental como animal de compañía (Evans & White, 1997).

A diferencia de la mayoría de los animales domésticos, la perra se distingue por tener intervalos prolongados de actividad e inactividad sexual, de acuerdo a su ciclo reproductivo (Feldman & Nelson, 2007).

Ciclo reproductivo de la perra

La perra es monoéstrica no estacional. Llega a la pubertad cuando alcanza su tamaño corporal de adulto, lo que sucede entre los 6 y 12 meses de edad, normalmente esto ocurre sin relación con la época del año. El intervalo del ciclo es en promedio 7,5 meses, con un rango de 5 a 12 meses (Stabenfeldt & Edqvist, 1999; Concannon, 2011). La raza tiene un efecto significativo sobre el intervalo del ciclo reproductivo, por ejemplo el Basenji cicla cada 12 meses, mientras que el Pastor Alemán y el Rottweiler lo hacen cada 4-5 meses (Edens & Health, 2005; Feldman & Nelson, 2007). El ciclo reproductivo de la perra puede dividirse en cuatro estadios: proestro, estro, diestro y una etapa de inactividad sexual o anestro (Wanke & Gobello, 2006; Feldman & Nelson, 2007).

El proestro tiene una duración promedio de 9 días y se define clínicamente como el momento en que comienza la descarga vulvar hemorrágica hasta la primera aceptación del macho (Wanke & Gobello, 2006; Concannon, 2011). Se caracteriza por una intensa actividad folicular ovárica que precede al estro. La perra en proestro se encuentra bajo la influencia estrogénica. Los estrógenos (E) son responsables de la secreción vaginal, atracción de los machos por acción de las feromonas y preparación uterina para la gestación (Feldman & Nelson, 2007). Los niveles de E séricos aumentan de 5 a 15 pg/mL, alcanzando valores máximos de 40 a 120 pg/mL (figura 1) (Concannon, 2011). La concentración de progesterona (P) durante el proestro es baja (0,2-0,8 ng/mL) (Concannon et al., 2009). La citología vaginal se caracteriza por presentar numerosas células parabasales e intermedias pequeñas y grandes. Los neutrófilos y glóbulos rojos son habituales en cantidades variables y pueden presentarse bacterias. El proestro finaliza cuando la concentración de P sérica comienza a elevarse y la hembra permite el apareamiento (Edens & Health, 2005; Feldman & Nelson, 2007).

El estro tiene una duración promedio de 9 días y el comportamiento de la perra cambia de la agresividad a la pasividad (Concannon, 1983; Concannon, 2011). La descarga vulvar sanguinolenta

disminuye y se torna de un color más claro. La vagina se vuelve blanda y flácida para favorecer la penetración del macho (Wanke & Gobello, 2006; Feldman & Nelson, 2007). El inicio del estro está marcado por un aumento de P sérica, alcanzando valores mayores de 1 ng/mL hasta 3 ng/mL, durante el pico preovulatorio de hormona luteinizante (considerado día cero) (figura 1). Después del día 3, la concentración de P sérica alcanza valores de 10 a 25 ng/mL. La concentración de E disminuye a valores de 10-20 pg/mL (Concannon, 2011). La citología vaginal de una perra en estro se caracteriza por presentar más del 80 % de células superficiales y anucleares y ausencia de neutrófilos. Puede o no haber glóbulos rojos. El estro finaliza cuando la hembra no acepta el apareamiento (Feldman & Nelson, 2007).

El diestro tiene una duración promedio de 60 a 100 días. La vulva retoma su tamaño normal y ya no se observa agrandada o flácida (Feldman & Nelson, 2007). La concentración de E varía entre 15 a 30 pg/mL (figura 1). En esta fase hay un predominio de la P sobre los E. Los niveles de P sérica alcanzan valores de 15 a 90 ng/mL durante los primeros 30 días, luego se mantienen constantes 1 a 2 semanas y finalmente disminuyen a niveles basales 70 a 90 días después del pico preovulatorio de hormona luteinizante (Wanke & Gobello, 2006; Concannon, 2011). En diestro, la vagina presenta bajo número de células superficiales y alto número de células intermedias pequeñas y parabasales. Se pueden observar neutrófilos y detritos. A veces se pueden visualizar células “metaestrales” (células parabasales con un neutrófilo en el citoplasma) específicas asociadas con la etapa de diestro. Este estadio finaliza cuando las concentraciones séricas de P regresan a niveles basales (<1 ng/mL) (figura 1) (Edens & Health, 2005; Feldman & Nelson, 2007).

El anestro es el intervalo entre el final del diestro y el inicio del proestro (Jeffcoate, 2000). Tiene una duración entre 7-20 semanas y se caracteriza por la ausencia de actividad ovárica (Concannon, 2011). La perra no manifiesta cambios físicos característicos ni conducta sexual alguna. La vulva se encuentra pequeña y sin descargas (Wanke & Gobello, 2006). La vagina presenta células parabasales e intermedias. No hay glóbulos rojos. Pueden haber o no neutrófilos (Edens & Health, 2005).

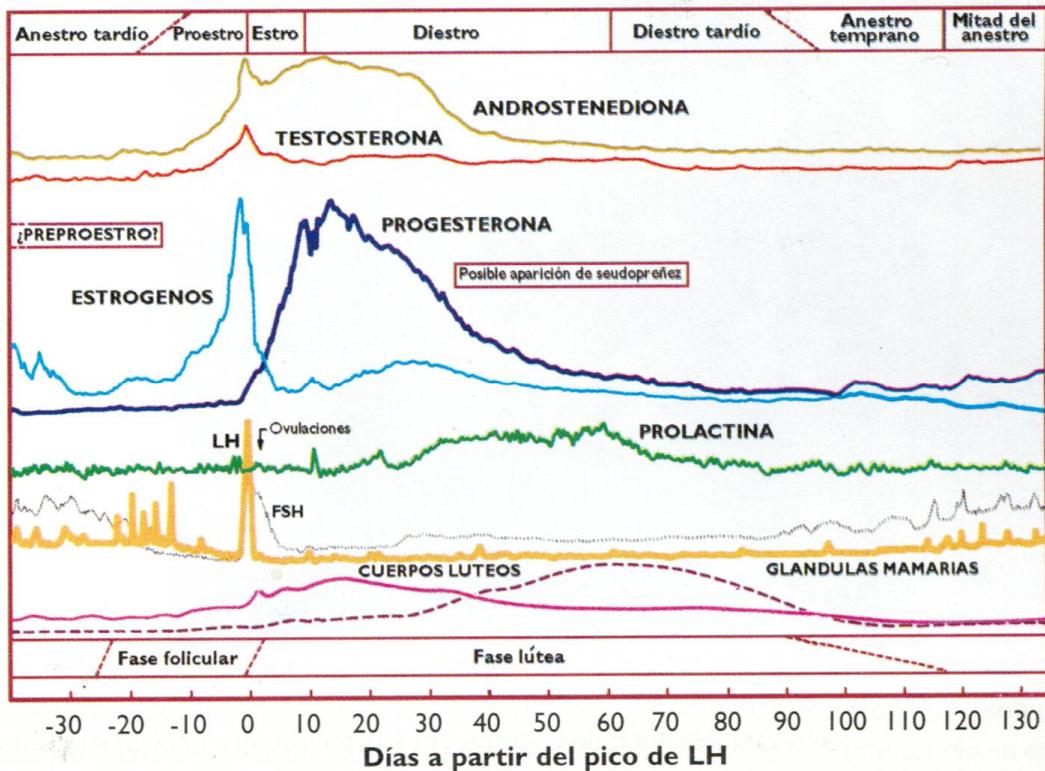


Figura 1. Representación esquemática de los cambios endócrinos típicos que se producen en el ciclo reproductivo de la hembra canina (Concannon, 2011).

Cambios histológicos en la glándula mamaria de la hembra canina durante el ciclo reproductivo

La hembra canina posee entre 4 y 6 pares de glándulas mamarias, distribuidas a lo largo del tórax y el abdomen. Los dos pares craneales se denominan torácicos, los dos siguientes abdominales y el par caudal inguinal (Argyle, 2000). En la perra pre-púber, la glándula mamaria es rudimentaria con estructuras de conductos que se extienden desde la superficie hasta la dermis en la base del pezón. Estos conductos están pobremente diferenciados y están rodeados por una o más capas de células epiteliales quiescentes. Después de la pubertad, en proestro, el epitelio de los conductos prolifera para formar estructuras alargadas y dilatadas. En estro, los conductos y alvéolos mamarios proliferan en la dermis del pezón y se observa crecimiento de tejido conjuntivo y capilares con extravasación de glóbulos rojos e infiltración de células inflamatorias. En diestro, la glándula mamaria presenta un desarrollo lóbulo-alveolar completo y en anestro, los bajos niveles de esteroides ováricos resultan en una involución de las mamas, observándose pocos grupos alveolares rodeando los conductos colapsados, que aún contienen secreciones (Nelson & Kelly, 1974; Wanke & Gobello, 2006; Rehm et al., 2007; Santos et al., 2010). Los cambios mencionados anteriormente están bajo la influencia de las hormonas esteroides ováricas.

Hormonas esteroides ováricas y mecanismo de acción

Las hormonas esteroides ováricas, E y P, son sintetizadas a partir del colesterol, bajo el control de las gonadotrofinas. Los E y P circulan en sangre unidas a la albúmina sérica, o a globulinas específicas. Debido a su naturaleza lipídica, estas hormonas atraviesan las membranas celulares por difusión pasiva (Clark & Mani, 1994). Los E condicionan el instinto sexual y las manifestaciones estrales. Producen edema, hiperemia y crecimiento celular a nivel del tracto reproductivo. Intervienen en el metabolismo fosfo-cálcico, en el crecimiento óseo y estimulan el crecimiento y desarrollo del sistema de conductos mamarios. La P es la principal hormona para el mantenimiento de la gestación. Estimula la actividad secretora del endometrio, disminuye el tono del miometrio y su sensibilidad a la oxitocina y estimula el desarrollo completo de la glándula mamaria (Derivaux & Ectors, 1984).

Los E y P ejercen sus acciones en los tejidos blanco a través de sus proteínas receptoras específicas (RE y RP, respectivamente). Los RE y RP son miembros de una súper familia de receptores nucleares que actúan como factores de transcripción activados por la hormona correspondiente y regulan la síntesis de ARNs específicos, proteínas y ADN. Comparten una estructura molecular básica formada por distintos dominios organizados en regiones funcionales: un dominio de unión al ligando capaz de reconocer la hormona correspondiente, un dominio de unión al ADN que interactúa con secuencias específicas de ADN (elementos de respuesta esteroide o SRE) y los dominios implicados en funciones activadoras de transcripción (Clark & Mani, 1994; Kuiper et al., 1996).

Se ha reportado en ratas que el RE es producto de dos genes diferentes. El RE α es el receptor clásico y predominante en el tracto reproductivo y el RE β predomina en el ovario. Ambos receptores presentan alta homología en los dominios de unión al ADN, homología parcial en los dominios de unión a la hormona y escasa homología en los dominios de activación de la transcripción (Kuiper et al., 1996; Conneely, 2001). Por otro lado, se ha sugerido que el RE α sintetizado en diferentes sistemas de traducción eucariotas puede adoptar diferentes conformaciones y propiedades funcionales (Horjales et al., 2007).

Dos isoformas de RP han sido descritas en humanos y ratas: A y B. Los RP-A y RP-B son expresados por diferentes promotores sobre el mismo gen y ambos se unen a la P con similar afinidad e interactúan con los mismos SRE (Conneely, 2001).

Las hormonas esteroides ováricas (E y P) son importantes moduladores de sus propios receptores y dicha regulación puede ser a nivel de la transcripción y post-transcripcional. Los E aumentan la concentración del ARNm de RE y RP y los RE y RP, es decir ejercen una regulación positiva, mientras que la P disminuye la concentración del ARNm de ambos receptores y de las

proteínas de ambos receptores, es decir ejerce una regulación negativa (Ing et al., 1993; Clark & Mani, 1994). En ovejas ovariectomizadas tratadas con estradiol se demostró un aumento en la concentración de ARNm de RP y RE α . La regulación en más del ARNm de RE α es a nivel post-transcripcional (Ing et al., 1996), dicho tratamiento aumentó la estabilidad (vida media) del ARNm de este receptor de 9 a 24 horas (Ing & Ott, 1999; Ing, 2005). El aumento de la vida media del ARNm de RE α podría deberse a que los E inducen proteínas, como la AUF1p45, que se unen al ARNm del receptor contribuyendo a su estabilización (Ing et al., 2008).

En relación a las proteínas receptoras, se ha demostrado que la P regula en menos los niveles de RE en útero de rata, tracto reproductivo de gato, endometrio de ovino, útero de hámster y oviducto de gallina (Katzenellenbogen, 1980; Selcer & Leavitt, 1988).

Estos mecanismos de regulación concuerdan con lo que se ha reportado durante el ciclo estral en diferentes especies. En general, se reportaron altos niveles de RE y RP en la fase folicular cuando predominan los E, mientras que en la fase luteal cuando predomina la P los niveles de ambos receptores son bajos (Clark & Mani, 1994; Meikle et al., 2004). En acuerdo con esto, en el endometrio de humano y oviducto y endometrio de primate no humano se encontró que los niveles de RE son mayores en la fase folicular (Katzenellenbogen, 1980). Niveles mayores de RE y RP en la fase folicular que en la luteal también se encontraron en útero, hipófisis y cérvix de la oveja (Miller et al., 1977; Rexroad, 1981; Tasende et al., 2005; Rodriguez-Piñón et al., 2008). Los RE y RP también se han estudiado en glándula mamaria en distintas especies.

Receptores de estrógenos y progesterona en la glándula mamaria

La localización de RE y RP se ha estudiado por inmunohistoquímica en tejido mamario en diferentes especies. Esta técnica permite identificar, localizar y estimar la intensidad de tinción de los receptores en un determinado tejido (no los cuantifica). En la mujer, se encontró en el núcleo de células epiteliales mayor porcentaje de RE en la fase folicular que en la fase luteal y porcentajes similares de RP en ambas fases (Soderqvist et al., 1993; Anderson, 2002). En primates no humanos, en células epiteliales también se reportó mayor inmunomarcado a RE α en la fase folicular que en la fase luteal, contrariamente al trabajo de Soderqvist et al. (1993) la mayor intensidad de tinción a RP se observó en la fase luteal (Cheng et al., 2005). En vacas no gestadas, en células epiteliales se reportó inmunomarcado a RE α y RP (Schams et al., 2003). En terneras prepúberes también en células epiteliales se detectó inmunomarcado a RE α y RP (Connor et al., 2005). En cabras en células epiteliales se identificó mayor inmunomarcado a RE α al día 1 del estro que al día 10 (fase luteal), pero no se observaron diferencias entre el día 1 y 10 para RP (Moroni et al., 2007). En roedores, el

inmunomarcado a ambos receptores se detectó en el epitelio y tejido conjuntivo y fue menor en la fase luteal que en la fase folicular (Shyamala et al., 2002).

En la hembra canina, Manee-in et al. (2010) reportaron la inmunolocalización a RE α y RP en los núcleos celulares de alvéolos y conductos pero no en las células del tejido conjuntivo. Estos autores no reportaron cómo se distribuyen las diferentes tinciones a ambos receptores en cada compartimiento histológico. Globalmente encontraron que la intensidad de tinción a RE α fue mayor en proestro, estro y anestro que en diestro, mientras que para RP fue mayor en anestro que en proestro, estro y diestro. Millanta et al. (2005) encontraron tinción a ambos receptores en tejido conjuntivo, tejido epitelial alveolar y epitelio de conductos en perras normales y tumorales, pero tampoco reportaron cómo se distribuyen la tinción a ambos receptores en los tres compartimientos mencionados.

Por otro lado, sólo encontramos un trabajo realizado por Donnay et al. (1995) que estudia la concentración de RE y RP por la técnica bioquímica de múltiples puntos en la glándula mamaria durante el ciclo reproductivo de la perra. Estos autores reportaron que la concentración de RE fue mayor en la fase luteal media que en proestro, estro, fase luteal temprana y anestro y la concentración de RP fue mayor en la fase luteal media y anestro que en la fase luteal temprana. Donnay et al. (1995) no observaron un aumento de RE y RP en proestro y estro, a diferencia de lo reportado por los mismos autores en útero de perra.

Este trabajo tiene como objetivo general contribuir al conocimiento de la endocrinología de la reproducción en la hembra canina mediante el estudio de la concentración, localización y distribución de los receptores de estrógenos y progesterona en tejido mamario canino normal durante el ciclo reproductivo y antes de la pubertad.

II) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Medir la concentración de P sérica en perras durante el ciclo reproductivo y antes de la pubertad.
- 2) Determinar la distribución tisular de RE α y RP por inmunohistoquímica en tejido conjuntivo, tejido epitelial alveolar y epitelio de conductos en las muestras de tejido mamario de los mismos animales.
- 3) Determinar la concentración de RE y RP y la afinidad de unión a E y P en las muestras de tejido mamario de los mismos animales.

III) MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

En una clínica veterinaria particular ubicada en el barrio Manga de la ciudad de Montevideo se obtuvieron muestras de tejido mamario canino en el momento de la ovariectomía por línea media. Los animales utilizados fueron 12 hembras caninas entre 9 meses a 8 años de edad y 4 de 5 a 8 meses, todas cruzas. Las muestras se extrajeron de la glándula mamaria inguinal de cada perra y se dividieron en dos partes similares. Todos los animales fueron evaluados por el médico veterinario que realizó la cirugía, sometidos a una exhaustiva anamnesis remota y próxima, así como un examen objetivo general y particular para poder determinar el estado de salud de cada animal. Se registraron los datos proporcionados por el dueño de cada mascota (raza, edad, último celo y número de partos).

Antes de anestesiarse cada animal, se tomaron muestras de sangre de la vena safena y se observó la vagina para evaluar su aspecto macroscópico, turgencia, grado de congestión y presencia de corrimientos. Luego de anestesiarse el animal, se obtuvieron muestras del interior de la vagina con hisopos a lo largo del borde superior de los labios vulvares, se rotaron sobre portaobjetos y se cubrieron con otros portaobjetos para proteger las muestras hasta llegar al laboratorio.

Procesamiento de las muestras

Al llegar al laboratorio de Bioquímica, una parte de las muestras se almacenó a -80°C para determinar la concentración de RE y RP. La otra parte de las muestras se fijó en paraformaldehído al 4 % ($\text{pH}=7,4$) durante 72 horas y posteriormente se incluyeron en bloques de parafina que fueron cortados con un espesor de 5 micrómetros. Los cortes se montaron en portaobjetos silanizados para estudiar la distribución de RE α y RP por inmunohistoquímica. Los portaobjetos también fueron teñidos con hematoxilina y eosina para analizar la histología del tejido mamario canino.

Se retiraron los portaobjetos que cubrían las muestras vaginales y se tiñeron con azul de metileno al 1% para estudiar la citología vaginal. Las muestras de sangre se centrifugaron durante 10 minutos a 1000g y se almacenaron a -20°C para determinar la concentración de P sérica.

Clasificación de los animales

Para clasificar los animales en los distintos estadios del ciclo reproductivo de la hembra canina se estudió la citología vaginal y se analizó la histología del tejido mamario en microscopio óptico Olympus BX41 con aumento de 100x.

Las perras que presentaron predominio de células intermedias y parabasales, pocas células superficiales con cantidad moderada de neutrófilos y que las mamas presentaron proliferación de conductos dilatados y lobulillos pequeños, se clasificaron en proestro (n=3). Cuando se observaron muchas células superficiales y anucleares y poca cantidad de células intermedias, el tejido mamario con pocos conductos y vasos con extravasación de glóbulos rojos, se clasificaron en estro (n=2). Las que contenían células intermedias y parabasales pequeñas, con pocas células superficiales y el tejido mamario con gran desarrollo de conductos y lobulillos, se clasificaron en diestro (n=4). Las perras con menor cantidad de células parabasales e intermedias y con alvéolos mamaros reducidos en tamaño y escasa secreción, se clasificaron en anestro (n=3) (Edens & Health, 2005; Wanke & Gobello, 2006; Feldman & Nelson, 2007; Rehm et al., 2007). En las figuras 2 y 3 se muestra a modo de ejemplo la citología vaginal y la histología del tejido mamario en diferentes estadios del ciclo reproductivo de la hembra canina.

En las perras de 5 a 8 meses de edad se observó un tejido mamario rudimentario (Santos et al., 2010). Esto fue consistente con la información aportada por los propietarios, que dichos animales nunca habían manifestado síntomas de actividad reproductiva, por lo tanto se clasificaron en prepúberes (n=4). En la citología vaginal de estos animales se evidenciaron muy pocas células parabasales e intermedias.

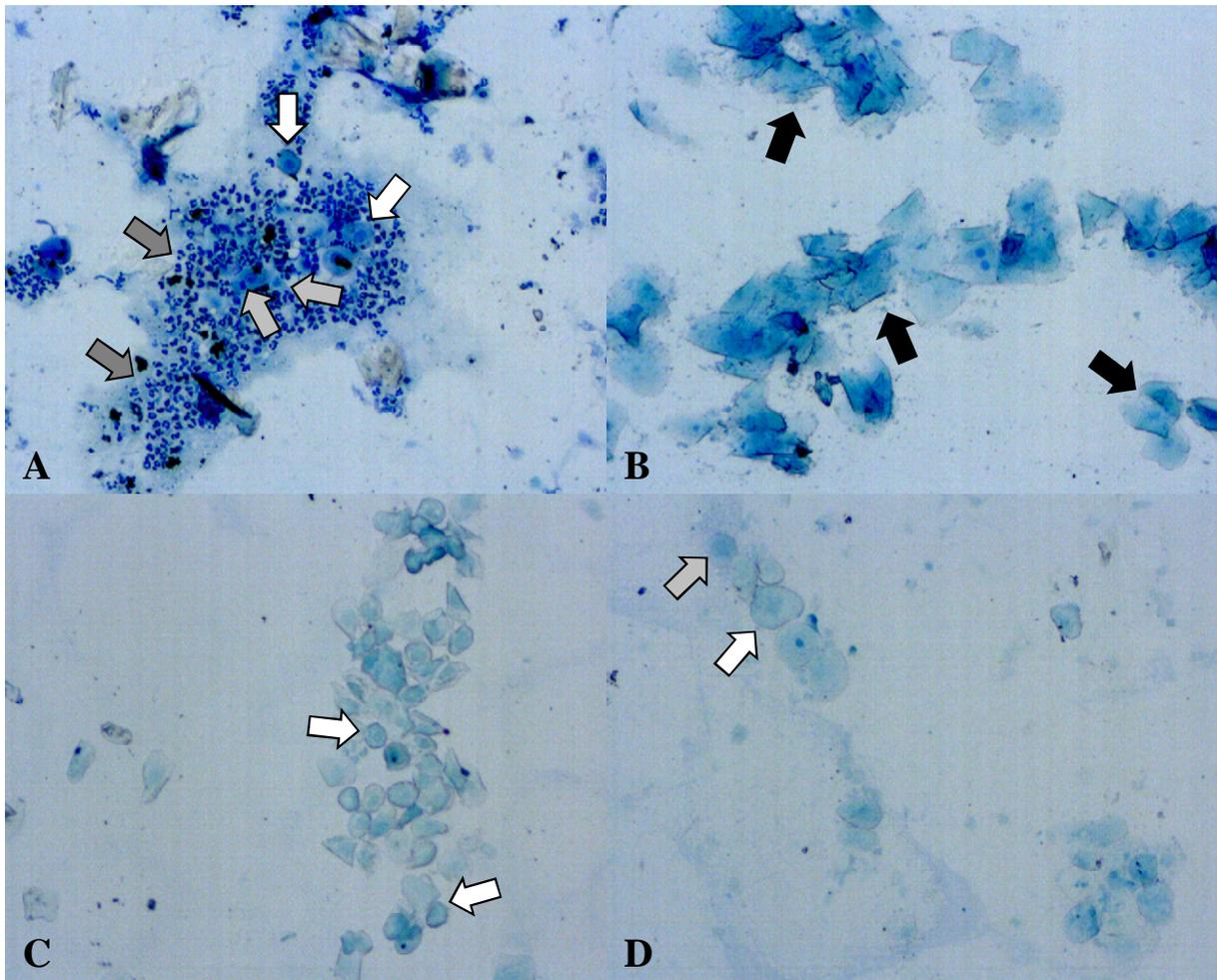


Figura 2. Citología vaginal de perras en diferentes estadios del ciclo reproductivo, tinción con azul de metileno, 100x. A. Proestro: células intermedias (flechas blancas), parabasales (flechas gris claro) y neutrófilos (flechas gris oscuro). B. Estro: células superficiales (flechas negras). C. Diestro: células intermedias pequeñas (flechas blancas). D. Anestro: células parabasales (flecha gris claro) e intermedias (flecha blanca).

Determinación de la concentración de progesterona sérica

Los niveles de P sérica se midieron por radioinmunoanálisis (RIA) en fase sólida usando el kit Coat-A-Count TKPG1 2033 cat # 326516. Todas las muestras se determinaron por duplicado en el mismo ensayo, siguiendo el protocolo del fabricante. La sensibilidad fue 0,077 ng/mL y para los controles (bajo, medio y alto) los coeficientes de variación intraensayo fueron menores a 10%.

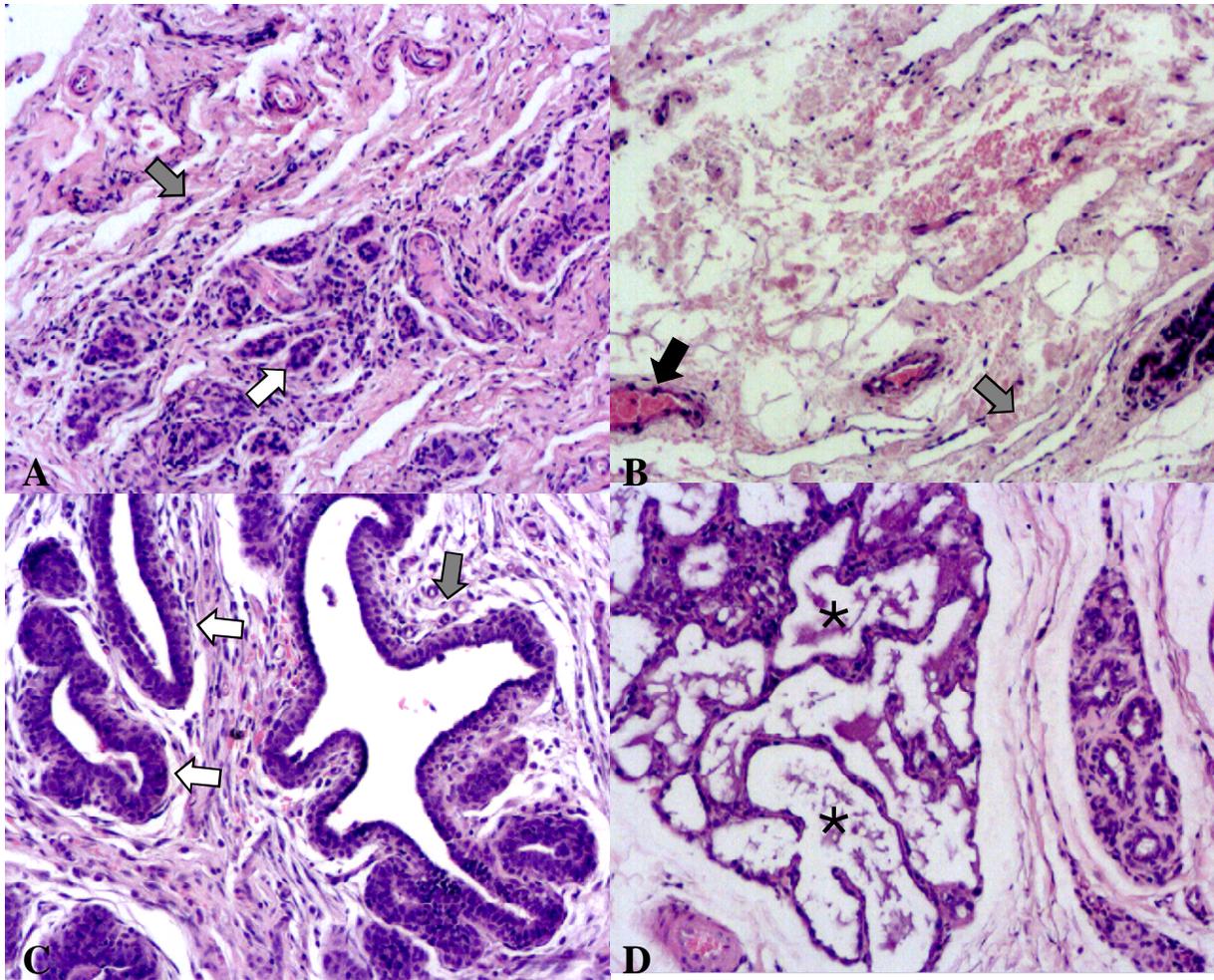


Figura 3. Histología del tejido mamario canino en distintos estadios del ciclo reproductivo, tinción con hematoxilina y eosina, 100x. A. Proestro: conductos dilatados (flecha gris oscuro) y pequeños lobulillos (flecha blanca). B. Estro: pocos conductos (flecha gris oscuro) rodeados de adipocitos, con presencia de vasos y extravasación de glóbulos rojos (flecha negra). C. Diestro: gran desarrollo de conductos (flecha gris oscuro) y formación de lobulillos (flechas blancas). D. Anestro: grupos alveolares con poca secreción (asteriscos).

Distribución de RE α y RP por inmunohistoquímica

La distribución de RE α y RP se realizó por la técnica inmunohistoquímica avidina-biotina-peroxidasa en todas las muestras de tejido mamario canino (Meikle et al., 2000). Las láminas fueron desparafinadas con xilol durante 20 minutos y rehidratadas con etanol 100%, 95% y 70% durante 5 minutos. Posteriormente fueron pre tratadas en microondas con citrato de sodio 0.01 M pH=6 por 10 minutos y se dejaron enfriar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron en buffer PBS

0.01 M pH=7,4 y Tritón 0,1 % durante 10 minutos. La actividad inespecífica de las peroxidasas endógenas fue bloqueada con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol por 10 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron nuevamente en buffer PBS 0.01 M pH=7,4 y Tritón 0,1 % durante 10 minutos. Las láminas fueron incubadas por 30 minutos en una cámara húmeda a oscuras a temperatura ambiente con suero de caballo normal (NHS: Vectastain ABC-KIT, Elite, cat # PK-6102) diluido en PBS 0.01 M pH=7,4.

Se utilizó anticuerpo primario anti-RE α (anticuerpo monoclonal de ratón IgG2a producido contra los aminoácidos 495-595 de RE α de origen bovino; c-311 cat # sc-787; Santa Cruz, CA, USA) diluido 1/25 en PBS. El anticuerpo primario anti-RP (anticuerpo monoclonal de ratón clon PR-2C5 IgG1-kappa producido contra la región N-terminal de RP humano, conjugado a proteína transportadora; Zymed, South San Francisco, CA, USA) fue diluido 1/100 en PBS. Los controles negativos se obtuvieron reemplazando el anticuerpo primario por suero inespecífico de ratón (IgG de ratón cat#sc-2025, Santa Cruz, California, USA). Se realizó la incubación de las muestras con anticuerpo secundario (IgG biotinilado, equino anti-ratón, Vectastain ABC-KIT) diluido en NHS para RE α y RP. A continuación los tejidos se incubaron con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC) (Vectastain Elite; Vector Lab). La unión del complejo enzimático fue visualizado con 3,3'-diaminobenzidina (DAB cat#4100, Vector Lab), un cromógeno que produce un precipitado marrón insoluble cuando se incuba junto con la peroxidasa. Las muestras de tejido fueron contra coloreadas con hematoxilina, deshidratadas con etanol 70%, 95%, 100% durante 5 minutos y colocadas en xilol durante 20 minutos antes de ser montadas con Pertex.

Análisis de imagen

La distribución de RE α y RP se estudió en todos los animales en tejido conjuntivo (TC), tejido epitelial alveolar (TA) y epitelio de conductos (C) de la glándula mamaria, mediante obtención de imágenes con el software Infinity Capture en microscopio óptico Olympus BX41. La intensidad de tinción a RE α y RP fue evaluada por dos observadores independientes que no sabían qué muestras se estaban evaluando. Se analizaron diez campos para cada compartimiento celular con aumento de 400x. La intensidad de tinción se evaluó de acuerdo a la siguiente escala: negativo (-), leve (+), moderado (++) o intenso (+++) y fue calculada (score) como: $1 \times n1 + 2 \times n2 + 3 \times n3$, donde n es la proporción de células por campo que exhiben tinción: leve (n1), moderado (n2) e intenso (n3) (Boos et al., 1996).

Determinación de la concentración de RE y RP

La concentración de RE y RP fue determinada utilizando la técnica bioquímica de múltiples puntos y el modelo de Scatchard inverso (Braunsberg, 1984; Garófalo & Tasende, 1996). Las muestras de tejido (400 - 600 mg) se laminaron congeladas, se homogeneizaron en un homogeneizador Polytron Kinematica PT 10-35 a 27000 rpm en buffer de ensayo (TRIS 50 mM, EDTA 1,5 mM, DTT 1 mM, Na₂MoO₄ 16,5 mM y Glicerol 10% v/v de Sigma, pH=7,4) 3 veces durante 5 segundos con intervalos de 1 minuto entre cada homogeneización. La homogeneización así como todos los procedimientos posteriores se realizaron entre 0-4 °C. Los homogeneizados se centrifugaron a 1100g durante 10 minutos en centrífuga Sorvall Evolution RC y los sobrenadantes se centrifugaron a 50000g durante 1 hora obteniéndose la fracción citosólica.

La unión total se determinó incubando por duplicado alícuotas de la fracción citosólica con 5-6 concentraciones crecientes de (2,4,6,7-³H)-estradiol-17β, 86 Ci/mmol (³H-E, 0,15 a 15 nM) para RE y de ³H-ORG 2058 (16α-ethyl-21-hydroxy-19-nor[6,7,3H]pregn4en-3,20-dione), 40 Ci/mmol (0,25 a 30 nM) para RP. En paralelo, las mismas muestras se incubaron por duplicado, con un exceso de 200 veces de los ligandos no marcados dietilestilbestrol (DES) y ORG 2058 para RE y RP respectivamente, para determinar la unión no específica. Luego de 18 horas de incubación, los esteroides libres fueron separados por el método de carbón-dextrano (carbón 1% p/v, dextrano 0,1% p/v de Sigma en buffer de ensayo). La radioactividad del sobrenadante se midió por centellografía líquida. La unión específica se obtuvo por la diferencia entre la unión no específica y la unión total. Los resultados se analizaron por el modelo de Scatchard inverso, estimando la constante de disociación aparente (Kd, nM) y la concentración de receptores en femtomoles por miligramo (fmol/mg) de proteína y de tejido.

La expresión “fracción citosólica” en la que se realizaron los ensayos de unión se refiere a la fracción obtenida después de la homogeneización y centrifugación diferencial de las muestras, no se refiere a la localización celular de los receptores.

La concentración de proteínas de la fracción citosólica se midió por el método de Lowry usando Albúmina Sérica Bovina (BSA, fracción V de Sigma) como estándar (Lowry et al., 1951). Todas las muestras se corrieron por duplicado. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm.

La concentración de proteínas y la cantidad de tejido utilizado en los ensayos se correlacionaron positivamente (n=16; r=0,75; p=0,005), indicando que la extracción de proteínas de la fracción citosólica fue similar en todas las muestras.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados por ANOVA utilizando el procedimiento mixto de Statistical Analysis System (SAS Institute inc., Cary, NC, USA). En el modelo estadístico se incluyeron los efectos de observador, compartimiento histológico, situación fisiológica e interacción entre ambos. Se realizaron test de correlación de Pearson para estudiar la relación entre RE y RP, la concentración de RE y RP y la concentración de P y la cantidad de tejido y la concentración de proteínas de la fracción citosólica. Los resultados fueron expresados como $\bar{X} \pm$ pooled s.e. El nivel de significancia fue $p < 0,05$.

IV) RESULTADOS

Concentraciones de progesterona sérica

La concentración de P se midió en las muestras de suero de 12 perras adultas y 4 perras prepúberes por RIA, como se mencionó en materiales y métodos.

Se encontró efecto de la etapa del ciclo reproductivo sobre la concentración de P sérica ($p=0,03$). La concentración de P sérica fue mayor en diestro que en proestro, estro, anestro y en la prepubertad (tabla 1).

Situación fisiológica	Concentración de P sérica (ng/mL, $\bar{x} \pm$ pooled s.e.)
Proestro	$0,93 \pm 13$ (a)
Estro	$2,81 \pm 15$ (a)
Diestro	$52,00 \pm 11$ (b)
Anestro	$0,25 \pm 13$ (a)
Prepubertad	$0,48 \pm 11$ (a)

Tabla 1. Concentraciones (ng/mL, $\bar{x} \pm$ pooled s.e.) de P sérica en perras en proestro (n=3), estro (n=2), diestro (n=4), anestro (n=3) y en prepúberes (n=4). a,b indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las diferentes situaciones fisiológicas.

Distribución de RE α por inmunohistoquímica

La distribución de RE α en el tejido mamario se estudió en 12 perras adultas y 4 perras prepúberes por la técnica de inmunohistoquímica, descrita en materiales y métodos utilizando un anticuerpo primario específico. Esta técnica nos permitió estimar la intensidad de tinción a RE α en

tejido conjuntivo, tejido epitelial alveolar y epitelio de conductos. En la tabla 2 se muestra un ejemplo de cómo se realizó la evaluación en una muestra de tejido mamario en 10 campos de imágenes obtenidas mediante microscopio óptico.

Tejido conjuntivo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Promedio	Score
Negativos	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	1	0,02
Leve (+)	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0,2	
Moderado (++)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Intenso (+++)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Alvéolos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Promedio	Score
Negativos	40	60	47	18	40	50	30	50	65	30	43	0,14
Leve (+)	0	0	1	0	4	0	1	0	1	2	0,9	
Moderado (++)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,1	
Intenso (+++)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,1	
Conductos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Promedio	Score
Negativos	43	0	41	14	47	20	36	8	9	19	23,7	0,07
Leve (+)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0,1	
Moderado (++)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Intenso (+++)	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0,2	

Tabla 2. Cantidad de núcleos negativos y positivos a RE α (leves, moderados e intensos) en tejido conjuntivo, tejido epitelial alveolar y epitelio de conductos de una muestra de glándula mamaria. Score: $(1x n_1 + 2x n_2 + 3x n_3)/10$; n es la proporción de células con núcleos positivos en cada campo con tinción leve (n1), moderada (n2) o intensa (n3).

Se detectó tinción a este receptor en todas las muestras de glándula mamaria de perras en proestro, estro, diestro y anestro, y en los tres compartimientos histológicos mencionados. Los controles negativos (sin anticuerpo primario específico) no presentaron tinción a RE α (figura 4). Se encontró efecto de estadio del ciclo reproductivo ($p=0,004$), de compartimiento histológico ($p=0,0002$) e interacción ($p=0,023$) entre ambos en la intensidad de tinción a RE α y no se encontró efecto entre los observadores que evaluaron las muestras.

En proestro, la intensidad de tinción a RE α fue mayor en tejido epitelial alveolar que en tejido conjuntivo ($p=0,0004$) y epitelio de conductos ($p=0,005$) y fue similar en estos dos últimos (figura 5). En anestro, también fue mayor en tejido epitelial alveolar que en tejido conjuntivo ($p<0,0001$) y epitelio de conductos ($p=0,03$), siendo mayor en epitelio de conductos que en tejido conjuntivo ($p=0,03$). En estro y diestro, no se observaron diferencias entre compartimientos histológicos.

La intensidad de tinción a RE α en tejido epitelial alveolar fue mayor en proestro y anestro que en estro y diestro, tendiendo a ser mayor en proestro que en estro ($p=0,088$). En epitelio de conductos fue mayor en anestro que en proestro, estro y diestro. En tejido conjuntivo no se observaron diferencias en la intensidad de tinción a RE α durante el ciclo reproductivo. No se detectó tinción a

RE α en las muestras de tejido mamario de perras prepúberes, utilizando un anticuerpo primario específico descrito en materiales y métodos.

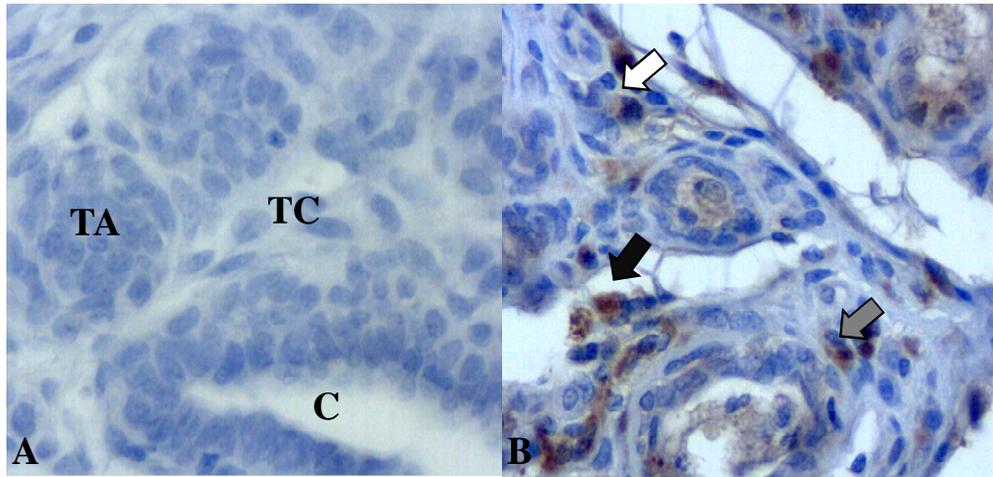


Figura 4. Intensidad de tinción a RE α en tejido conjuntivo (TC), tejido epitelial alveolar (TA) y epitelio de conductos (C) de la glándula mamaria canina, 400x. A. Control negativo (núcleos de coloración azul). B. Tinción a RE α (coloración marrón) en el núcleo celular del tejido mamario: leve (flecha blanca), moderada (flecha gris) e intensa (flecha negra).

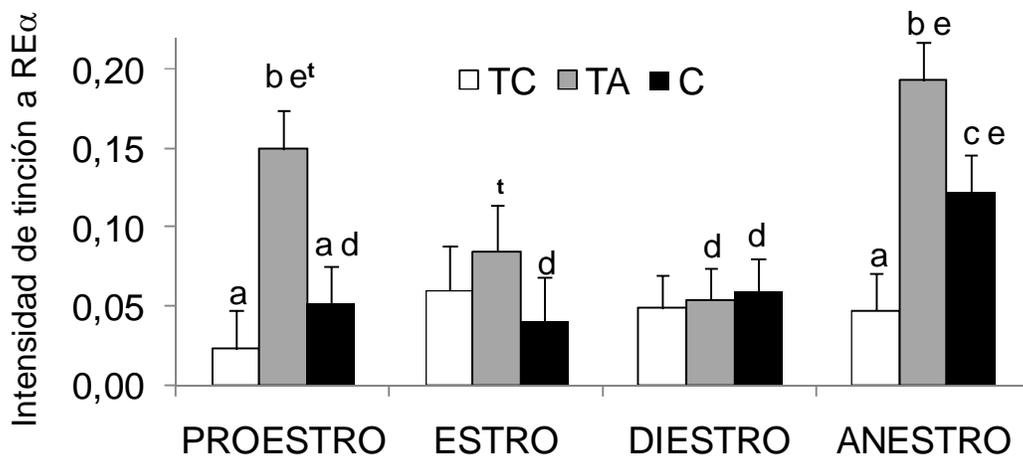


Figura 5. Intensidad de tinción a RE α ($\bar{x} \pm$ pooled s.e.) en tejido conjuntivo (TC), tejido epitelial alveolar (TA) y epitelio de conductos (C) de la glándula mamaria canina en proestro (n=3), estro (n=2), diestro (n=4) y anestro (n=3). a, b, c indican diferencias para un mismo estadio y distinto compartimiento histológico. d, e indican diferencias para un mismo compartimiento histológico y distinto estadio ($p < 0,05$). (t) indica tendencia para un mismo compartimiento histológico y distinto estadio ($p = 0,088$).

Distribución de RP por inmunohistoquímica

La distribución de RP en el tejido mamario se estudió en 12 perras adultas y 4 perras prepúberes por la técnica de inmunohistoquímica, descrita en materiales y métodos utilizando un anticuerpo primario específico. Esta técnica nos permitió estimar la intensidad de tinción a RP en tejido conjuntivo, tejido epitelial alveolar y epitelio de conductos. En la tabla 3 se muestra un ejemplo de cómo se realizó la evaluación en una muestra de tejido mamario en 10 campos de imágenes obtenidas mediante microscopio óptico.

Tejido conjuntivo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Promedio	Score
Negativos	50	42	50	46	28	31	42	46	38	51	42,4	0,16
Leve (+)	3	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0,8	
Moderado (++)	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0,4	
Intenso (+++)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Alvéolos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Promedio	Score
Negativos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,04
Leve (+)	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	
Moderado (++)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Intenso (+++)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Conductos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Promedio	Score
Negativos	0	0	0	0	23	16	0	0	0	0	3,9	0,04
Leve (+)	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0,4	
Moderado (++)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Intenso (+++)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Tabla 3. Cantidad de núcleos negativos y positivos a RP (leves, moderados e intensos) en tejido conjuntivo, tejido epitelial alveolar y epitelio de conductos de una muestra de glándula mamaria. Score: $(1x n1 + 2x n2 + 3x n3)/10$; n es la proporción de células con núcleos positivos en cada campo con tinción leve (n1), moderada (n2) o intensa (n3).

Se detectó tinción a este receptor en todas las muestras de glándula mamaria de perras en proestro, estro, diestro y anestro, y en los tres compartimientos histológicos mencionados. Los controles negativos (sin anticuerpo primario específico) no presentaron tinción a RP (figura 6). Se encontró efecto de estadío del ciclo reproductivo ($p=0,003$) y de compartimiento histológico ($p=0,004$) en la intensidad de tinción a RP y no se encontró efecto entre los observadores que evaluaron las muestras.

En proestro, la intensidad de tinción a RP fue mayor en tejido epitelial alveolar que en epitelio de conductos ($p=0,026$) (figura 7). En estro, fue mayor en tejido conjuntivo ($p=0,01$) y tejido epitelial alveolar ($p=0,03$) que en epitelio de conductos. En diestro, la intensidad de tinción a RP en tejido epitelial alveolar tendió a ser mayor que en tejido conjuntivo ($p=0,07$) y en anestro no se encontraron diferencias significativas entre los compartimientos histológicos.

La intensidad de tinción a RP en tejido conjuntivo fue mayor en estro que en proestro, diestro y anestro. En tejido epitelial alveolar fue mayor en proestro y estro que en diestro y anestro. En epitelio de conductos no se observaron diferencias significativas durante el ciclo reproductivo. No se detectó tinción a RP en las muestras de tejido mamario en perras prepúberes, utilizando un anticuerpo primario específico descrito en materiales y métodos.

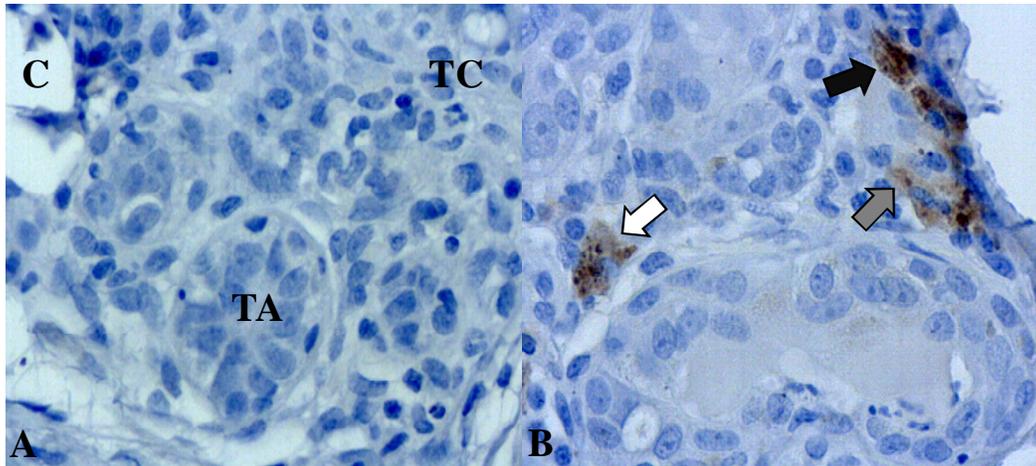


Figura 6. Intensidad de tinción a RP en tejido conjuntivo (TC), tejido epitelial alveolar (TA) y epitelio de conductos (C) de la glándula mamaria canina, 400x. A. Control negativo (núcleos de coloración azul). B. Tinción a RP (coloración marrón) en el núcleo celular del tejido mamario: leve (flecha blanca), moderada (flecha gris) e intensa (flecha negra).

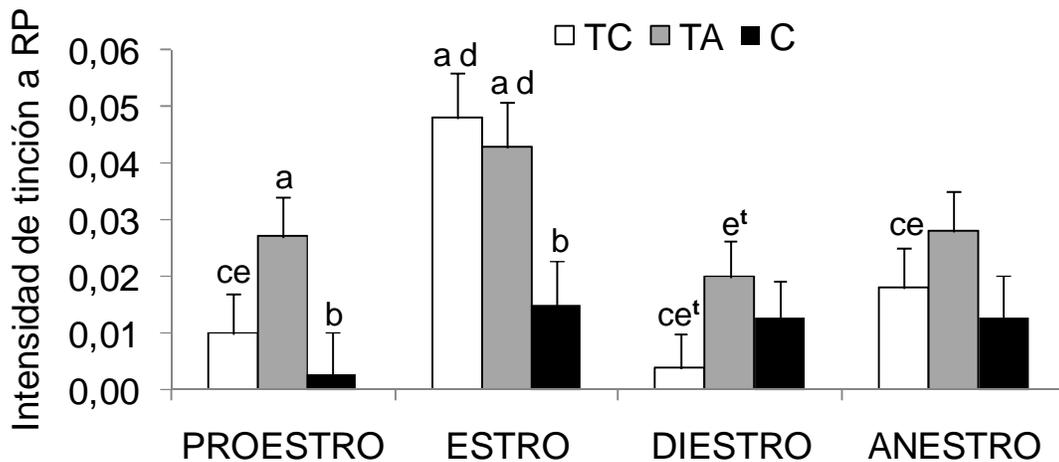


Figura 7. Intensidad de tinción a RP ($\bar{x} \pm$ pooled s.e.) en tejido conjuntivo (TC), tejido epitelial alveolar (TA) y epitelio de conductos (C) de la glándula mamaria canina en proestro (n=3), estro (n=2), diestro (n=4) y anestro (n=3). a,b indican diferencias para un mismo estadio y distinto compartimiento histológico ($p < 0,05$). (t) indica tendencia para un mismo estadio y distinto compartimiento histológico ($p = 0,07$). c, d, e indican diferencias para un mismo compartimiento histológico y distinto estadio ($p < 0,05$).

Concentración de RE y RP

La concentración de RE y RP en el tejido mamario se determinó en 12 perras adultas y 4 perras prepúberes por la técnica bioquímica de múltiples puntos descrita en materiales y métodos. Esta técnica nos permitió cuantificar la concentración tisular de ambos receptores en fentomoles/mg de proteína y tejido mediante el modelo de Scatchard inverso.

En todas las muestras de tejido mamario se detectó un sitio de unión único, saturable y de alta afinidad para E (figura 8) y para P (figura 9). Se encontró efecto de estadio del ciclo reproductivo sobre la concentración de RE ($p < 0,0001$) y RP ($p = 0,001$). Todos los valores de K_d (nM) en ambos receptores fueron del mismo orden. En la tabla 5 se muestra el promedio de estos valores en cada situación fisiológica de la hembra canina.

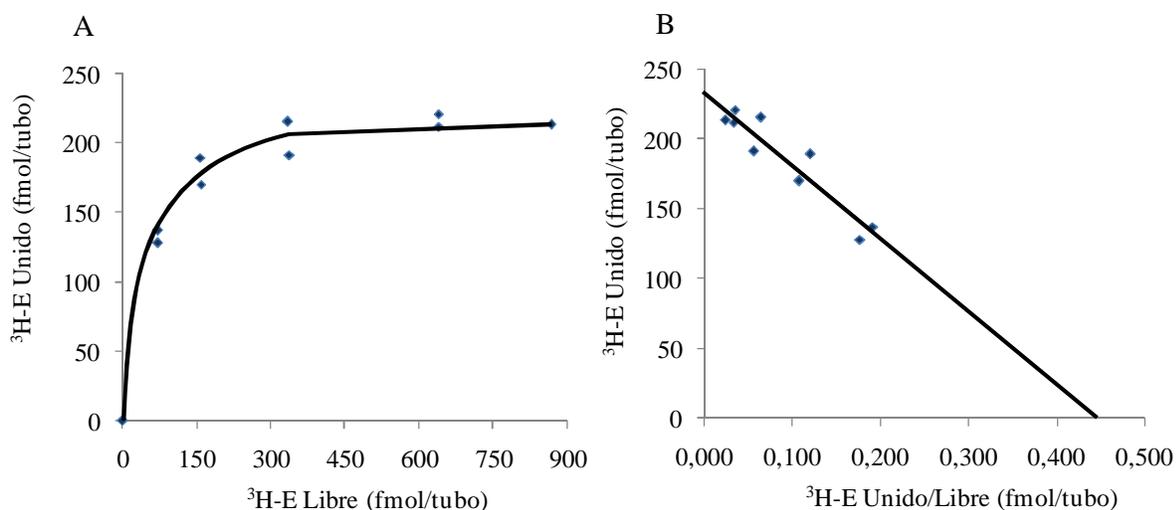


Figura 8. A. Curva de saturación de RE. B. Modelo de Scatchard inverso de RE.

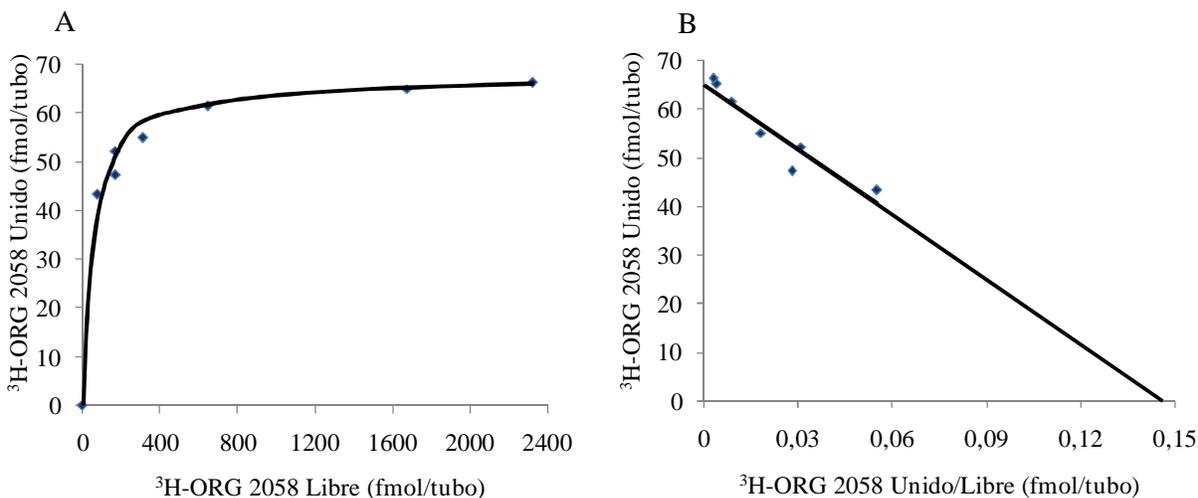


Figura 9. A. Curva de saturación de RP. B. Modelo de Scatchard inverso de RP.

Situación fisiológica de la hembra canina	Kd RE (nM)	Kd RP (nM)
Proestro	1,89	0,51
Estro	1,22	0,93
Diestro	0,37	0,86
Anestro	0,76	0,56
Prepubertad	0,49	0,52

Tabla 5. Valores de Kd (nM, \bar{x}) de RE y RP de perras en proestro (n=3), estro (n=2), diestro (n=4), anestro (n=3) y durante la prepubertad (n=4).

La concentración (fmol/mg de proteína) de RE fue menor ($p < 0,0003$) en diestro que en proestro, estro y anestro, tendió a ser mayor en proestro que en anestro ($p = 0,07$) (figura 10). La concentración (fmol/mg de proteína) de RP fue mayor ($p < 0,02$) en estro que en proestro, diestro y anestro y mayor ($p < 0,05$) en proestro que en diestro y anestro. Los resultados expresados en fmol/mg de tejido fueron similares a los expresados en fmol/mg de proteína.

No se encontró correlación entre los niveles de concentración de RE y RP durante el ciclo reproductivo de la hembra canina ($n = 12$; $r = 0,40$; $p = 0,19$). La concentración de P sérica se correlacionó negativamente con los niveles de RE ($n = 12$; $r = -0,70$; $p = 0,01$) pero no con los niveles de RP ($n = 12$; $r = -0,27$; $p = 0,39$).

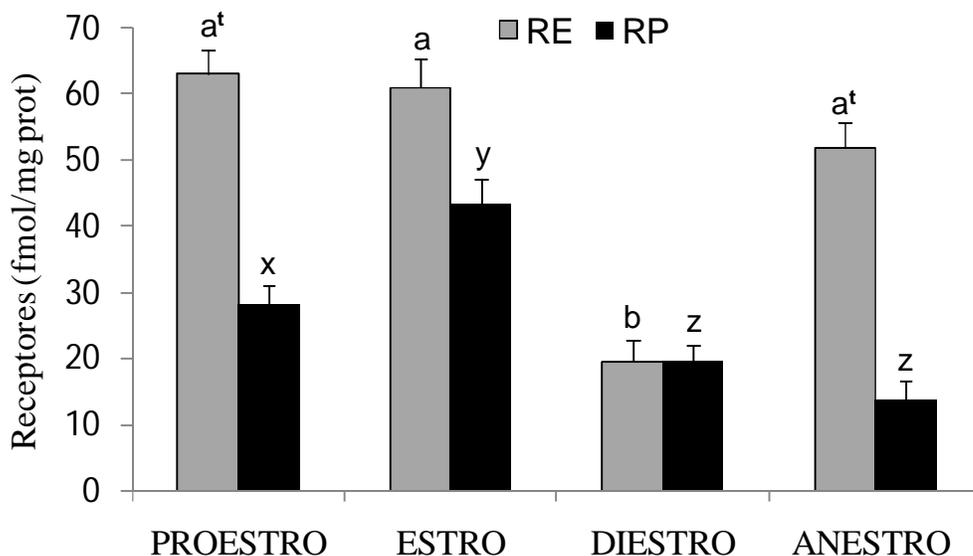


Figura 10. Concentración (fmol/mg de proteína, $\bar{x} \pm$ pooled s.e.) de RE y RP en tejido mamario canino en proestro (n=3), estro (n=2), diestro (n=4) y anestro (n=3). Para un mismo receptor y distinto estadio, diferentes letras indican diferencias ($p < 0,05$), (t) indica tendencia para RE ($p = 0,07$).

RE y RP en perras prepúberes en relación a las adultas

En las muestras de glándula mamaria de perras prepúberes se detectó unión específica de RE y RP a E y P. Dado el poco desarrollo mamario que presentaron estos animales y que la concentración de proteínas de la fracción citosólica fue muy baja ($< 1 \text{ mg/mL}$), la concentración de RE y RP expresada en fmol/mg de proteína resultó en valores mayores o similares que las perras adultas. Esto se debe a que dado un valor de femtomoles de hormona marcada unidos, si se divide por un valor de proteínas menor de 1 (prepúberes) o mayor de 1 (adultas) el valor de la concentración de receptores expresado en fmol/mg de proteína da valores muy diferentes, que no reflejan lo que se une de hormona marcada. En apoyo de esto, se encontró que la concentración de receptores expresada en fmol/mg de proteína no concuerda con la concentración de receptores expresada en fmol/mg de tejido, los cuales fueron en prepúberes menores que los de las perras adultas. Por lo tanto, en las perras prepúberes los resultados se muestran expresados en fmol/mg de tejido, lo que permitió compararlos con los de las perras adultas (figura 11).

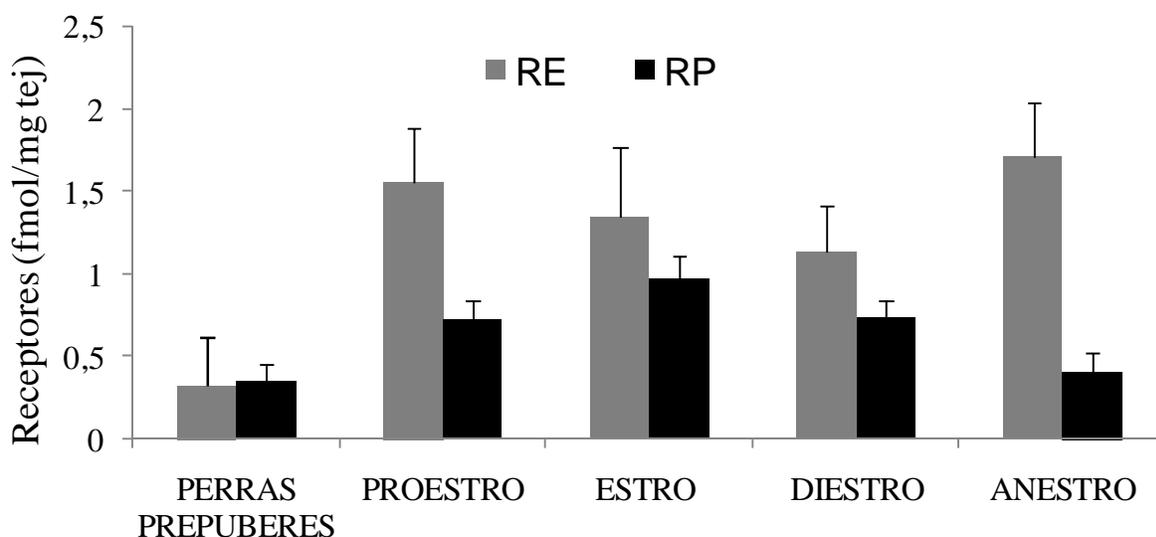


Figura 11. Concentración (fmol/mg de tejido, $\bar{x} \pm$ pooled s.e.) de RE y RP en tejido mamario en perras prepúberes (n=4) en relación a perras en proestro (n=3), estro (n=2), diestro (n=4) y anestro (n=3).

V) DISCUSIÓN

La concentración de P circulante en las diferentes etapas del ciclo reproductivo estudiadas concuerda con lo reportado por Concannon (2011) y los valores están de acuerdo a la actividad ovárica en proestro, estro y diestro y con la inactividad ovárica en anestro y prepubertad.

En las muestras de glándula mamaria de perras prepúberes no encontramos tinción a RE α y RP en ninguno de los tres compartimientos estudiados. Esto puede ser debido a que la expresión de ambos receptores antes de la pubertad sea tan baja que no sea posible detectarla por inmunohistoquímica. Sin embargo, Connor et al. (2005) detectaron tinción a ambos receptores en terneras prepúberes utilizando el mismo anticuerpo primario. Estas diferencias podrían ser debidas a que las terneras prepúberes tengan un mayor desarrollo de tejido mamario o mayor cantidad de receptores.

Se observó intensidad de tinción a RE α y RP en el núcleo de células del tejido conjuntivo, tejido epitelial alveolar y epitelio de conductos en todas las muestras de tejido mamario de la hembra canina, en los diferentes estadios del ciclo reproductivo; sugiriendo que los tres compartimientos son blanco de acción de las hormonas esteroides ováricas. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Millanta et al. (2005) que también detectaron tinción a ambos receptores en los tres compartimientos mencionados en perras normales y tumorales. También se reportó tinción a RE α y RP en los tres compartimientos en la glándula mamaria de roedores (Shyamala et al., 2002). Por el contrario, Manee-in et al. (2010) no encontraron tinción a RE α y RP en tejido conjuntivo en perras normales durante el ciclo reproductivo y sugieren que las células del tejido conjuntivo no serían blanco de acción de las hormonas esteroides ováricas. Tampoco se encontró tinción a RE α y RP en tejido conjuntivo en la glándula mamaria de mujeres (Anderson, 2002), primates no humanos (Cheng et al., 2005), bovinos (Schams et al., 2003) y cabras (Moroni et al., 2007).

La distribución de RE α en los tejidos conjuntivo, epitelial alveolar y epitelio de conductos varió en los estadios del ciclo reproductivo estudiados. La intensidad de tinción a RE α en tejido epitelial alveolar fue mayor que en tejido conjuntivo y epitelio de conductos en proestro y anestro, mientras que en estro y diestro no hubo diferencias. Esto sugiere que la concentración de este receptor en tejido epitelial alveolar es hormono-dependiente. En apoyo de esta hipótesis encontramos que los niveles de RE α en proestro son altos (cuando predominan los E), tienden a disminuir en estro, disminuyen en diestro (cuando predomina la P) y se recuperan en anestro a niveles similares a los de proestro. Las diferencias que encontramos en la distribución de RP en tejido epitelial alveolar y conjuntivo en proestro y estro en relación al diestro y anestro también sugiere una expresión hormono-dependiente de este receptor, similar a lo que encontramos para RE α . La intensidad de tinción a RP fue mayor en estro cuando predominan los E y disminuye en diestro coincidiendo con elevados niveles circulantes de P. Nuestros resultados de RE α y RP concuerdan parcialmente con los de Manee-in et al. (2010), quienes encontraron similar expresión de ambos receptores en proestro, estro y diestro temprano, sin embargo reportaron en anestro la menor expresión a RE α y la mayor de

RP, mientras que nosotros encontramos en este estadio la mayor expresión de RE α (similar a la de proestro) y la menor de RP (similar a la de diestro).

Por otro lado, en la glándula mamaria de roedores Shyamala et al. (2002) reportaron que la tinción a RE α y RP fue menor en la fase luteal que en la fase folicular, en acuerdo con nuestros resultados. En mujeres, primates no humanos y cabras se reportó mayor tinción a RE α en la fase folicular que en la fase luteal consistente con nuestros resultados (Soderqvist et al., 1993; Cheng et al., 2005, Moroni et al., 2007). Sin embargo, en mujeres y cabras no se encontraron diferencias en la tinción a RP entre la fase folicular y luteal (Soderqvist et al., 1993; Moroni et al., 2007).

Se detectaron RE y RP específicos y de alta afinidad en todas las muestras de tejido mamario canino estudiadas. Los valores de Kd fueron similares en todos los estadios del ciclo reproductivo incluidas las perras prepúberes y también fueron similares a los reportados en ovinos (Miller et al., 1977; Rexroad, 1981; Meikle et al., 2004; Tasende et al., 2005; Rodriguez-Piñón et al., 2008) y en la perra (Donnay et al., 1995) en diferentes tejidos. Los bajos niveles de concentración de RE y RP en perras prepúberes concuerdan con el escaso desarrollo mamario de estos animales y explican en parte que no hayamos detectado tinción a ninguno de los dos receptores. No encontramos trabajos en tejido mamario de perras prepúberes con quien comparar nuestros datos. Los mayores niveles de RE y RP en proestro y estro en relación al diestro y anestro se acompañan por los menores niveles de P circulantes y los mayores niveles de E circulantes. Esto concuerda con la regulación de la expresión de RE y RP, se acepta que los E estimulan la síntesis de ambos receptores y que la P la inhibe (Clark & Mani, 1994). El perfil de concentración de RE y RP en nuestro trabajo concuerda con lo reportado por Donnay et al. (1995) en tejido uterino de perras durante el ciclo reproductivo. Pero no concuerda con lo reportado por estos autores en glándula mamaria ya que no encuentran diferencias en la concentración de RE y RP entre proestro, estro y la fase luteal temprana, a pesar de que reportaron la mayor concentración de P en esta fase.

VI) CONCLUSIONES

El RE α y RP se localizaron en el tejido conjuntivo, tejido epitelial alveolar y epitelio de conductos de glándula mamaria en perras adultas y su distribución varió en los diferentes tejidos estudiados y en las diferentes etapas del ciclo reproductivo. Sugiriendo diferencias en la sensibilidad a los estrógenos y la progesterona de los diferentes compartimientos histológicos.

En perras prepúberes no se detectó tinción a RE α y RP, pero se demostró capacidad de unión para RE y RP con valores de Kd similares a los de perras adultas pero con concentraciones menores que las adultas y en acuerdo al escaso desarrollo del tejido mamario.

Las constantes de disociación aparentes de RE y RP fueron del mismo orden en las diferentes etapas del ciclo reproductivo estudiadas. La concentración de RE y RP en glándula mamaria de perras adultas varió de acuerdo a los niveles circulantes de progesterona.

Estos resultados contribuyen al conocimiento de la dinámica de los receptores de estrógenos y progesterona en el tejido mamario normal de la hembra canina y su vínculo con las fluctuaciones de la progesterona sérica en los distintos estadios del ciclo reproductivo. Además, el conocimiento de la expresión de RE y RP en el tejido mamario canino normal es una referencia fundamental para los tumores mamaros caninos, en cuya especie son los tumores más frecuentes.

VII) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, E. (2002). The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Res.* Vol.4.197-201 pp.
- Argyle, D. J. (2000). La glándula mamaria. En: Simpson, G.M., England, G.C.W. y Harvey, H. *Manual de Reproducción y Neonatología en Pequeños Animales*. Ed. S. 1ª ed. España. Cap.5. 69-71 pp.
- Boos, A., Meyer, W., Schwarz, R., Grunert, E. (1996). Immunohistochemical assessment of estrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* Vol.44.11-21 pp.
- Braunsberg, H. (1984). Mathematical analysis of data from receptor assay. Clinical interest of steroid hormone receptors. *Breast cancer. Recent results in cancer research*. Eds: Leclerq, G., Toma, S., Paridaens, R., Heuson, J.C. Berlin: Springer-Verlag. Vol.91. 18-31 pp.
- Cheng, G., Li, Y., Omoto, Y., Wang, Y., Berg, T., Nord, M., Vihko, P., Warner, M., Piao, Y-S, Gustafsson, J-A (2005). Differential regulation of estrogen receptor ER α and ER β in primate mammary gland. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* Vol.90. 435–444 pp.
- Clark, J.H. & Mani, S.K. (1994). Actions of ovarian steroid hormones. En: *The Physiology of Reproduction*. Eds: Knobil, E. & Neill, J.D. Raven Press, New York, USA. Vol.2. Cap.17. 1011–1059 pp.
- Concannon, P.W. (1983). Reproductive physiology and endocrine patterns of the bitch. En: *Current Veterinary therapy VIII*. Eds: Kirk, R.W. WB Saunders Co, Ph, EEUU. 886-893 pp.
- Concannon, P.W., Castracane, V.D., Temple, M. y Montanez, A. (2009). Endocrine control of ovarian function in dogs and other carnivores. *Anim. Reprod.* Vol.6. 172-193 pp.

- Concannon, P.W. (2011). Reproductive cycles of the domestic bitch. *Anim. Reprod. Sci.* Vol.124. 200-210 pp.
- Conneely, O.M. (2001). Perspective: Female Steroid Hormone Action. *Endocrinol.* Vol.142. 2194-2199 pp.
- Connor, E.E., Wood, D.L., Sonstegard, T.S., da Mota, A.F., Bennett, G.L., Williams, J.L. y Capuco, A.V. (2005). Chromosomal mapping and quantitative analysis of estrogen-related receptor alpha-1, estrogen receptors alpha and beta and progesterone receptor in the bovine mammary gland. *J. Endocrinol.* Vol.185. 593-603 pp.
- Derivaux, J. & Ectors, F. (1984). Recuerdo fisiológico. En: *Fisiopatología de la gestación y obstetricia veterinaria*. Editorial Acribia. España. Cap.2. 15-23 pp.
- Donnay, I., Wouters-Ballman, P., Devleeschouwer, N., Leclercq, G. y Verstegen, J. (1995). Changes in oestrogen, progesterone and epidermal growth factor receptor concentrations and affinities during the oestrous cycle in the normal mammary gland and uterus of dogs. *Vet. Res. Commun.* Vol.19 (2). 101-113 pp.
- Edens, M.S.D. & Health, A.M. (2005). Manejo de la reproducción en la perra y la gata. En: Root Kustritz, M.V. *Manual de reproducción del perro y del gato*. Ed. Multi-médica. Barcelona, España. Cap.2.15-22 pp.
- Evans, J.M. & White, K. (1997). Motivación e inteligencia. En: *Guía completa de la salud y cuidados del perro*. Ed. Hispanoamericana. Barcelona, España. Cap.2. 45-47 pp.
- Feldman, E. & Nelson, R. (2007). Ciclo ovárico y citología vaginal. En: *Endocrinología y reproducción canina y felina*. Ed. Inter-médica. 3^a ed. Buenos Aires, Argentina. Cap.19. 834-854 pp.
- Garófalo, E. G. & Tasende, C. (1996). Uterine Estrogen and Progesterone Receptors in Prepubertal Ewes: distributions in myometrium, endometrium and caruncles. *Vet. Res.* Vol.27.177-183 pp.
- Horjales, S., Cota, G., Señorale-Pose, M., Rovira, C., Román, E., Artagaveytia, N., Ehrlich, R., Marin, M. (2007). Translational machinery and protein folding: Evidence of conformational variants of the estrogen receptor alpha. *Archiv. Biochem. Biophys.* Vol. 467. 139-143 pp.
- Ing, N.H., Tsai, S.Y. & Tsai, M.J. (1993). Progesterone and estrogen. *Genes in mammalian reproduction*. Ed: Gwatkin, R. B. L. Wiley-Liss Inc.: New York, NY. 271-291 pp.
- Ing, N.H., Spencer, T.E. & Bazer, F.W. (1996). Estrogen enhances endometrial estrogen receptor gene expression by a posttranscriptional mechanism in the ovariectomized ewe. *Biol. Reprod.* Vol. 54. 591-599 pp.
- Ing, N.H. & Ott, T.L. (1999). Estradiol up-regulates estrogen receptor- α messenger ribonucleic acid in sheep endometrium by increasing its stability. *Biol. Reprod.* Vol. 60. 134-139 pp.

- Ing, N.H. (2005). Steroid hormones regulate gene expression posttranscriptionally by altering the stabilities of messenger RNAs. *Biol. Reprod.* Vol. 72. 1290-1296 pp.
- Ing, N.H., Massuto, D.A. y Jaeger, L.A. (2008). Estradiol up-regulates AUF1p45 binding to stabilizing regions within the 3'-Untranslated region of estrogen receptor α mRNA. *J. Biol. Chem.* Vol. 283. 1764-1772 pp.
- Jeffcoate, I. (2000). Fisiología y endocrinología de la reproducción en la perra. En: Simpson, G.M., England, G.C.W., Harvey, M. *Manual de Reproducción y Neonatología en Pequeños Animales*. Ed. S. 1^a ed. España. Cap.1. 1-13 pp.
- Katzenellenbogen, B.S. (1980). Dynamics of steroid hormone receptor action. *Ann. Rev. Physiol.* Vol. 42. 17-35 pp.
- Kuiper, G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., Gustafsson, J.A. (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *PNAS*. Vol.93. 5925-5930 pp.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* Vol.193. 265-275 pp.
- Manee-in, S., Srisuwatanasagul, S., Lohachit, C., Suwimonteerabutr, J. y Sirivaidyapong, S. (2010). Estrogen receptor alpha (ER α) and progesterone receptor (PR) in the mammary gland of bitches during different stages of estrous cycle. *Comp. Clin. Pathol.* Vol.19. 173-178 pp.
- Meikle, A., Bielli, A., Masironi, B., Pedrana, G., Wang, H., Forsberg, M., Sahlin, L. (2000). An immunohistochemical study on the regulation of estrogen receptor alpha by estradiol in the endometrium of the immature ewe. *Reprod. Nutr. Dev.* Vol.40. 587-596 pp.
- Meikle, A., Tasende, C., Sosa, C y Garófalo, E G. (2004). The role of sex steroid receptors in sheep female reproductive physiology. *Reprod. Fertil. Dev.* Vol.16. 385-394 pp.
- Millanta, F., Calandrella, M., Bari, G., Niccolini, M., Vannozzi, I., Poli, A. (2005). Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Vet. Sci.* Vol.79. 225-232 pp.
- Miller, B.G., Murphy, L. & Stone G.M. (1977). Hormone receptor levels and hormone, RNA and protein metabolism in the genital tract during the oestrous cycle of the ewe. *J. Endocrinol.* Vol.73. 91-98 pp.
- Moroni, P., Pisoni, G., Savoini, G., van Lier, E., Acuña, S., Damián, J.P. y Meikle, A. (2007). Influence of Estrus of Dairy Goats on Somatic Cell Count, Milk Traits and Sex Steroid Receptors in the Mammary Gland. *J. Dairy Sci.* Vol.90. 790-797 pp.
- Nelson, L.W. & Kelly, W.A. (1974). Changes in Canine Mammary Gland Histology during the Estrous Cycle. *Tox. applied pharmacol.* Vol.27. 113-122 pp.
- Rehm, S., Stanislaus, D.J. y Williams, A.M. (2007). Estrous Cycle-Dependent Histology and Review of Sex Steroid Receptor Expression in Dog Reproductive Tissues and Mammary Gland and

- Associated Hormone Levels. *Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.* Vol.80. 233-245 pp.
- Rexroad C.E. Jr. (1981). Estrogen and progesterone binding in the myometrium of the ewe. II. Regulation by estradiol and progesterone. *J. Anim. Sci.* Vol.53. 1070–1076 pp.
- Rodríguez-Piñón, M., Tasende, C., Puime, P., Garófalo, E.G. (2008). Oestrogen and progesterone receptor binding capacity and oestrogen receptor alpha expression (ERalpha mRNA) along the cervix of cycling ewes. *Reprod. Fertil. Dev.* Vol. 20 (3). 350–356 pp.
- Santos, M., Marcos, R. y Faustino, A.M.R. (2010). Histological study of canine mammary gland during the oestrous cycle. *Reprod. Dom. Anim.* Vol.45. 46-54 pp.
- Schams, D., Kohlenberg, S., Amserlgruber, W., Berisha, B. y Pfaffl, M.W. (2003). Expression and localisation of oestrogen and progesterone receptors in the bovine mammary gland during development, function and involution. *J. Endocrinol.* Vol.177. 305-317 pp.
- Selcer, K.W. & Leavitt, W.W. (1988). Progesterone down-regulation of nuclear estrogen receptor: a fundamental mechanism in birds and mammals. *Gen. Comp. Endocrinol.* Vol. 72. 443-452 pp.
- Shyamala, G., Chou, Y.C., Louie, S.G., Guzman, R.C., Smith, G.H., Nandi, S. (2002). Cellular expression of estrogen and progesterone receptors in mammary glands: regulation by hormones, development and aging. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* Vol.80 (2). 137–148 pp.
- Soderqvist, G., von Schoultz, B., Tani, E. y Skoog, L. (1993). Estrogen and progesterone receptor content in breast epithelial cells from healthy women during the menstrual cycle. *Am. J. Obstet. Gynecol.* Vol.168. 874-879 pp.
- Stabenfeldt, G.H. & Edqvist, L.E. (1999). Procesos de la reproducción de la hembra. En: Swenson M.J. y Reece W.O. *Fisiología de los animales domésticos de Dukes*. Tomo 2. Ed. Noriega. 5ªed. México. Cap36. 694-696 pp.
- Tasende, C., Rodríguez-Piñón, M., Acuña, S., Garófalo, E.G. y Forsberg, M. (2005). Corpus luteum life span and pituitary oestrogen and progesterone receptors in cyclic and GnRH-treated anoestrous ewes. *Reprod. Fertil. Dev.* Vol.17 (7). 721–726 pp.
- Wanke, M. & Gobello, C. (2006). Ciclo estral canino. En: *Reproducción en caninos y felinos domésticos*. Eds: Wanke, M & Gobello, C. Ed. Inter-médica. Buenos Aires, Argentina. Cap.1. 1-11 pp.