

Caracterización biológica de tumores mamarios inducidos con N-nitrosometilurea en ratas.

Universidad de la República, Facultad de Ciencias

Licenciatura en Bioquímica

Agosto 2013

Natalia Mazza Miranda

Orientador: Dra. María Gabriela Kramer

Co-orientador: Dra. Patricia Berasain

Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Unidad de Reactivos y
Biomodelos de Experimentación, Facultad de Medicina.

Unidad de Biología Parasitaria, Departamento de Biología Celular y Molecular,
Instituto de Higiene, Facultad de Ciencias.

Agradecimientos

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación que financio la totalidad de este trabajo.

A Alejandro, por sus consejos y el lugar que me brindo en el laboratorio.

A Gabriela, que me dio lugar en su grupo de trabajo, me enseñó y confió en mí para trabajar en conjunto.

A Patricia, por sus enseñanzas y orientación a lo largo de la tesina.

Al Dr. Pacheco de Facultad de Veterinaria.

A Teresa Freire.

A las personas que colaboraron del URBE.

A todos mis compañeros del LVR que ya no están y los que están, que me ayudaron en algún momento en este trayecto.

A los compañeros de la UBP que supieron formar parte de esta etapa.

A mis padres y hermana, que me bancaron a lo largo de la carrera y apoyaron en los cambios que se presentaron a lo largo de estos años.

A las larvas y amigos/as de la facu con los cuales compartí estos años y siguen estando en todo momento.

A mi novio, por su apoyo y ayuda incondicional.

Índice General

Abreviaturas	4
Resumen	5
Introducción	6
Cáncer de mama	6
Clasificación, Diagnóstico y Marcadores.....	6
Tratamientos.....	8
• Terapia local.....	8
• Terapia sistémica	9
Modelos experimentales para el cáncer de mama.....	10
Modelo Murino.....	10
Modelo en Ratas.....	11
Objetivos generales y específicos	14
Objetivo general.....	14
Objetivos específicos	14
Materiales y métodos	15
Animales.....	15
Preparación de NMU e inducción de tumores en ratas.....	15
Control de aparición de tumores y cálculo de volumen tumoral	15
Análisis estadístico	16
Obtención de tumores y necropsia.....	16
Preparación de solución fijadora de PFA	16
Fijación de tejidos en PFA	17
Preparación de bloques de parafina de tumores mamarios	17
Recubrimiento de vidrios portaobjetos con Silano.....	18
Obtención de cortes histológicos.....	18

Desparafinización e hidratación de cortes histológicos.....	18
Tinción con hematoxilina de Mayer y eosina	19
Análisis y toma de imágenes de cortes histológicos	19
Resultados	20
1. Determinación de la cantidad de tumores mamarios por animal.	20
2. Localización y frecuencia de aparición de tumores a lo largo del tiempo.	22
3. Análisis de cinética de crecimiento de tumores más frecuentes.....	24
4. Estudio anatómo-patológico de tumores mamarios más frecuentes.....	26
Tumores de zona 2 (cervical).....	27
Tumores de zona 3 (toraxica)	30
Tumores de zona 5 (toraxica)	31
Tumores de zonas menos frecuentes.....	31
5. Evaluación de la existencia de metástasis en otros órganos.	34
Discusión	35
Conclusiones	42
Perspectivas	43
Citas bibliográficas	44

Abreviaturas

DMBA	-	7-12 dimetilbez(a) antraceno
EtOH	-	etanol
g	-	gramos
HCl	-	ácido clorhídrico
h	-	horas
i.p	-	intra peritoneal
i.v	-	intra venosa
kg	-	kilogramos
L	-	litro
M	-	molar
mg	-	miligramos
min	-	minutos
ml	-	mililitros
mm	-	milímetro
μl	-	microlitros
μm	-	micras
mM	-	milimolar
N	-	normal
NaOH	-	Hidróxido de sodio
NMU	-	N-nitrosometilurea
PBS	-	phosphate buffered saline
PFA	-	paraformaldheído

Resumen

El cáncer de mama es una de las enfermedades con mayor impacto clínico, social y económico en la actualidad. Aunque se han mejorado considerablemente las estrategias para su detección y tratamiento precoz, esta enfermedad continúa siendo una de las principales causas de muerte por cáncer en el mundo, y por lo tanto, es extremadamente necesaria la investigación dirigida al desarrollo de nuevas terapias antitumorales. Sin embargo, para poder validar estos tratamientos es igualmente importante poder contar con modelos animales que reflejen la patología mamaria en el humano. En trabajos previos se observó que los tumores mamarios inducidos en ratas con el carcinógeno químico N-nitrosometilurea (NMU) presentan distinciones histopatológicas, inmunológicas y genómicas similares a tumores mamarios aislados de pacientes. Sin embargo, al ser tumores espontáneos y de aparición heterogénea, resulta muy difícil su uso rutinario como modelo de trabajo. Con el fin de facilitar su empleo en investigación pre-clínica, y como parte de un proyecto de mayor envergadura financiado por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación, se inició el presente trabajo en donde se realizó la caracterización del modelo en detalle y a distintos niveles. Para ello, se indujeron tumores con 3 dosis de NMU administradas mensualmente a ratas Wistar de 55 semanas de vida, se determinó la frecuencia de aparición de tumores, se mapeo su localización en el animal y se caracterizó la cinética de crecimiento de los tumores más frecuentes a lo largo del tiempo. Los tumores fueron procesados histológicamente y teñidos con hematoxilina-eosina para su clasificación anatomo-patológica. Se relacionó la cinética de crecimiento con la clasificación de los tumores y además se evaluó si había metástasis en otros órganos. Los resultados mostraron que los tumores aparecían a partir de los 15 días desde la última dosis de NMU, en un promedio de 3 por animal, con mayor frecuencia en las zonas de las glándulas mamarias cervicales y torácicas. La cinética de crecimiento de los tumores difirió en función de las zonas de aparición. En general, los tumores fueron clasificados como adenocarcinoma quístico papilar, carcinoma ductal infiltrante y carcinoma lobulillar. También se registró la aparición poco frecuente de adenomas quísticos papilares. No se encontraron metástasis macroscópicas en órganos como hígado, bazo y pulmones. En suma, el estudio exhaustivo de este modelo de cáncer de mama y la clasificación de los tumores en función de su zona de aparición aporta información de utilidad para emplear este modelo en investigación pre-clínica y evaluar nuevos tratamientos en tumores de mama pre-caracterizados.

Introducción

Cáncer de mama

El cáncer de mama es una de las causas de muerte por cáncer más prevalentes en el mundo [1], y en nuestro país es la principal causa de mortandad por cáncer en la mujer [2]. Su nombre se debe al lugar de origen de las células tumorales, el tejido mamario, tanto en mujeres como en hombres, aunque el cáncer de mama masculino es raro. Para su detección son utilizadas pruebas tales como: mamografía (radiografía de mama), examen clínico del seno, ecografía mamaria y resonancia magnética nuclear [3]. Los médicos actualmente brindan tratamientos y predicen el pronóstico de cada paciente observando:

(a) el estadio del cáncer, el cual se determina según el tamaño del tumor original (primario), el número de tumores y la extensión a otras zonas del cuerpo; para describir la gravedad del cáncer el sistema más utilizado es el TNM [4]: extensión del tumor (T), diseminación a ganglios linfáticos (N) y presencia de metástasis distante (M), y

(b) el grado del tumor (clasificación de los tumores en función de las características que presentan las células cancerosas a diferencia de las células normales): determinado por un médico anatómico-patólogo, el cual observa al microscopio la estructura, el patrón de crecimiento celular y la diseminación del mismo y la presencia de marcadores tumorales, entre otras características [5, 6].

Clasificación, Diagnóstico y Marcadores

Actualmente la clasificación y diagnóstico del cáncer de mama se encuentra estandarizado por la American Society of Clinical Oncology, en donde a lo largo de los años se logró pautar condiciones y técnicas para que la forma de determinar los diferentes grados de cáncer sean iguales en todo el mundo. Mediante la técnica de histología se analiza la muestra y se clasifica según la morfología tisular. Los tumores de mama malignos se clasifican con el nombre de adenocarcinomas (carcinomas de glándula). Estos pueden ser del tipo *in situ* (las células cancerosas no invaden la membrana basal del epitelio), invasores (las células infiltran la membrana basal epitelial) o una combinación de ambos. A su vez, según el origen de las células

cancerosas en la glándula mamaria, los tumores pueden ser clasificados como ductales (**Fig. 1A**) o lobulillares (**Fig. 1B**). Además, existen tumores con características distintas a las anteriormente descritas como los carcinomas papilares, tubulares, mucinosos, metaplásicos, quístico adenoides, entre otros [5]. Los tipos más frecuentes de tumores mamarios humanos son los carcinomas ductales *in situ* e invasores, éstos últimos pudiendo generar metástasis en otros órganos debido a la diseminación de células tumorales por vía linfática y/o hemática [6]. Asimismo, existen tipos de cáncer que son menos comunes como: el cáncer inflamatorio de seno, la enfermedad de Paget del pezón, el cáncer de seno triple negativo, tumores filoides y angiosarcomas [4, 5].

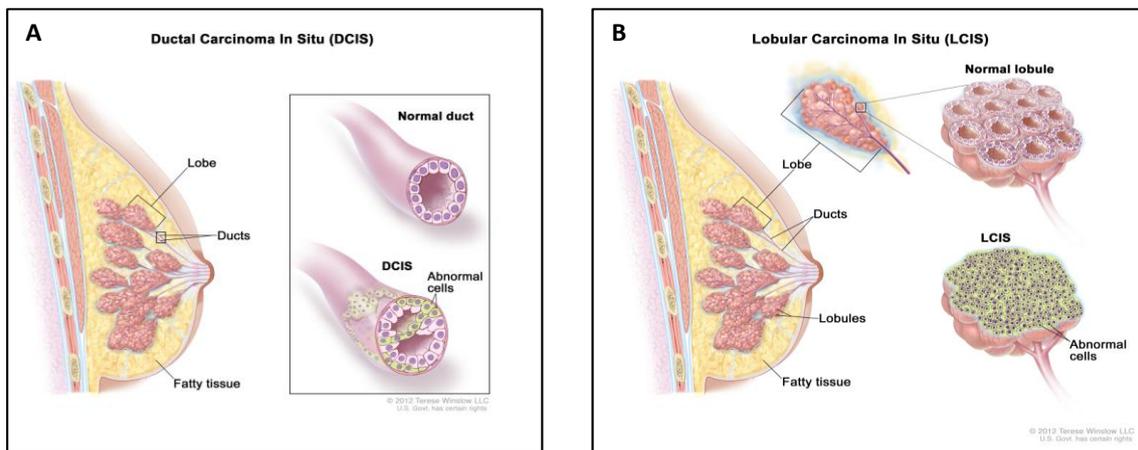


Figura 1: Estructura de glándula mamaria humana. A la izquierda de cada imagen se muestra la estructura de una glándula mamaria y su composición. A) Carcinoma ductal *in situ*, diferencias con el ducto de una glándula normal. B) Carcinoma lobulillar *in situ*, lóbulo de células normales y cancerosas. Imágen tomada de PubMed Health A.D.A.M. Medical Encyclopedia [3].

Luego de clasificar cada tumor de acuerdo con su histología, se determinan los marcadores tumorales. La mayor parte de los marcadores son proteínas producidas por células normales, sin embargo en enfermedades cancerosas se observan en altas concentraciones [4]. La técnica de inmunohistoquímica es utilizada regularmente para determinar la presencia de marcadores tumorales de mama; este procedimiento se encuentra estandarizado para que los ensayos sean igualmente reproducibles y los resultados se puedan interpretar de la misma forma [7]. Los marcadores utilizados normalmente para seguir la clasificación de los carcinomas son:

- Receptores de estrógenos: la unión del estrógeno con el receptor estimula la proliferación de células en glándula mamaria. Se encuentra sobre expresado en cáncer de mama.
- Receptores de progesterona: la unión de la progesterona con su receptor contribuye al desarrollo de las células mamarias. Puede estar sobre expresado en cancer de mama y junto con la determinación de los receptores de estrógenos son decisivos en la definición de terapia hormonal a los pacientes.
- HER2: es un receptor para el factor de crecimiento epidérmico humano. Esta glicoproteína es codificada por el oncogén *her2/neu* o *erbB2* y es clave en el crecimiento y desarrollo normal de las células. Este gen en algunos casos se encuentra sobre expresado en cancer de mama, provocando un crecimiento anormal de las células cancerosas. Estos tumores suelen ser muy agresivos y resistentes a terapias hormonales [4]. Para obtener resultados más exactos de diagnóstico es utilizada la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH).

El diagnóstico concluyente para brindar un tratamiento adecuado a cada paciente se determina con los datos finales otorgados por el anatomo-patólogo y los de estadificación previamente realizados. Además, recientemente se ha empezado a analizar el patrón de expresión diferencial de genes (Oncotype DX) para profundizar en la relación entre los distintos tipos de tumores y la respuesta a los tratamientos actuales.

Tratamientos

De acuerdo a varios parámetros tenidos en cuenta por el médico, entre los que se incluyen la clasificación de cada carcinoma, se otorga un tratamiento específico para cada paciente:

- **Terapia local:** procedimientos realizados directamente en la zona de masa tumoral.

- Cirugía: operación para extirpar el cáncer. La cirugía conservadora consiste en eliminar la masa tumoral sin extirpar la glándula mamaria; pudiéndose extirpar el tumor y una pequeña cantidad de tejido normal de alrededor (lumpectomía), o la parte de la mama con cáncer y parte del tejido normal de alrededor (mastectomía parcial). Otros tipos de cirugías son: la mastectomía total, donde se quita toda la glándula mamaria pudiéndose extirpar algún ganglio linfático de la axila comprometido. Y la mastectomía radical modificada, donde se extirpa toda la mama, muchos ganglios linfáticos axilares, revestimiento de los músculos pectorales y a veces parte de los músculos de la pared torácica [3].
- Radioterapia: tratamiento basado en radiaciones ionizantes dirigidas a un tumor en un sitio específico, para destruir las células cancerosas o impedir su crecimiento.
- **Terapia sistémica:** medicamentos administrados por vía oral o directamente por vía sanguínea para llegar a las células cancerígenas de todo el cuerpo [5, 6].
 - Quimioterapia: tratamiento con uno varios compuestos que afectan la replicación del ADN o la división de las células en crecimiento.
 - Terapia hormonal: tratamiento que bloquea la acción de hormonas implicadas en el crecimiento de las células cancerosas, como el tamoxifeno que es una pro-droga inhibidora del receptor de estrógeno.
 - Terapias dirigidas: tratamiento con medicamentos que atacan directamente células cancerosas específicas. Como ejemplo, el Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal que bloquea el receptor HER2 e induce la muerte de células tumorales mediada por el sistema inmune [4].

A pesar de que se han mejorado las estrategias para la detección y tratamiento precoz del cáncer de mama, esta enfermedad continúa siendo una de las causas de muerte por cáncer más prevalentes en el mundo. Por esto, es sumamente necesaria la

investigación dirigida al desarrollo de nuevas terapias. No obstante, para poder validar estos tratamientos es fundamental contar con modelos animales que reflejen la patología mamaria en el humano.

Modelos experimentales para el cáncer de mama

Modelo Murino

El ratón ha sido elegido como modelo experimental por excelencia debido a un conjunto de características que facilitan su manipulación en el laboratorio, tales como su pequeña talla, su corto tiempo generacional, su fácil mantenimiento y su gran rendimiento reproductivo [8]. Los modelos murinos de cáncer de mama han servido tanto para estudiar la genética y patología de la enfermedad, como para evaluar nuevas terapias.

1. **IMPLANTES DE CELULAS TUMORALES EN RATONES SINGÉNICOS.** Es hoy en día uno de los modelos más utilizados, ya que reflejan en suficiente medida la progresión de tumores agresivos y permiten ensayar tratamientos en un contexto de inmunocompetencia [9]. Sin embargo, en este caso, las células implantadas originan tumores homogéneos con un tiempo de latencia corto (1 o 2 semanas), mientras que en humanos los tumores mamarios se caracterizan por ser heterogéneos y de crecimiento lento (meses o años).
2. **XENO INJERTOS.** Es otro modelo ampliamente desarrollado en ratones inmunocomprometidos. Éstos tienen como ventaja el poder establecer tumores mamarios humanos en ratón, pero la desventaja radica en la necesidad de emplear ratones inmunodeprimidos para que el tumor se desarrolle, lo que limita la evaluación de inmunoterapias.
3. **RATONES TRANSGÉNICOS.** Es el modelo que posiblemente refleja mejor la progresión tumoral en humanos. Los ratones genéticamente modificados (transgénicos) expresan oncogenes implicados en carcinogénesis mamaria, como *c-myc*, *h-ras*, *erbB2*, TGF-alfa [8]. Si bien estos animales consiguen generar tumores heterogéneos con una biología y latencia similar a tumores humanos, son bastante costosos de producir y mantener. Por otro lado, se sabe que aproximadamente el 50% de tumores mamarios humanos expresan

receptores para estrógenos (ER) y progesterona (PR) siendo dependientes de éstos para su desarrollo [10], mientras que en ratones transgénicos la gran mayoría son hormonalmente independientes [11, 12], lo cual podría representar una desventaja.

Modelo en Ratas

Los tumores mamarios en ratas pueden inducirse lenta y progresivamente con 7-12 dimetilbez(a) antraceno (DMBA) [13] o con N-nitroso-metilurea (NMU) [14]. Estos son carcinógenos específicos de glándula mamaria, sin embargo el DMBA requiere de activación metabólica para su acción [15], mientras que el NMU (**Fig. 2**) es un agente alquilante que transfiere su grupo metilo a bases de los ácidos nucleicos provocando mutaciones en el ADN. En el 90% de los casos reportados produce transiciones G35-A35 en el codón 12 del gen Harvey *ras* (*H-ras*) [16], el cual está encargado de producir una proteína de unión a GTP (*ras*) que actúa como interruptor transmitiendo señales desde la membrana plasmática al núcleo. Cuando *H-ras* se encuentra mutado, se ve disminuida la capacidad de *ras* para interactuar con su proteína activadora (GAP) dejando a *ras* siempre en posición “on” y así enviando continuamente señales de crecimiento y proliferación celular [17].

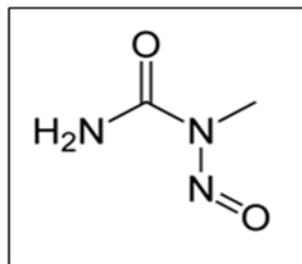


Figura 2: Estructura de la molécula de NMU. Grupo metilo se transfiere a bases del ADN.

Este modelo ha sido utilizado para evaluar terapias quimiopreventivas contra el cáncer de mama. Esto significa, que, previo a la administración del NMU se les da a los animales la sustancia que se desea evaluar su potencial preventivo y luego se observa la incidencia de tumores en respuesta al tratamiento [18]. También se ha utilizado este

modelo para ensayos pre-clínicos con tamoxifeno [19], droga utilizada hoy en día como terapia hormonal en cáncer de mama. Existen más trabajos donde se evalúa la prevención de la enfermedad [20, 21], pero hay pocos estudios que evalúen tratamientos contra tumores ya establecidos.

En nuestro país el modelo de cáncer de mama inducido con NMU en ratas es conocido y se ha utilizado en estudios tales como la evaluación de radiofármacos como agentes de diagnóstico tumoral [22] y la descripción del perfil inmuno-histológico de estos tumores en comparación con tumores de mama humanos [23].

Este modelo posee una serie de ventajas que lo hacen ser un buen modelo para representar el cáncer de mama en humanos:

- ✓ Los tumores generados con NMU son similares a los encontrados en pacientes, ya que se han clasificado tumores del tipo ductal y papilar [16, 24, 25]. Los de tipo papilar surgen en la yemas terminales de la glándula mamaria [26], estructura altamente proliferativa análoga a la unidad terminal ductal del lóbulo mamario en humanos [27] (**Fig. 1B**), el cual es uno de los sitios propuestos de origen de algunos carcinomas. Además, estos tumores son dependientes de hormonas (estrógeno y progesterona), como se observa habitualmente en cáncer de mama en humanos [28, 29].
- ✓ Presentan un perfil de expresión génica similar a tumores de mama humanos estrógenos positivos de intermedio y bajo grado [30].
- ✓ Además, se observó la presencia de citoquinas como la interleuquina 10, encontrada también en tumores de mama humanos [23].

Sin embargo, a pesar de ser un modelo bastante utilizado, el mismo presenta algunas dificultades para su uso rutinario, a saber:

- × Es difícil predecir cuando y donde los tumores aparecen en los animales, debido a la cantidad de mamas que tienen las ratas (**Fig. 3**).
- × Se desconoce si existe una relación entre la zona de aparición de los tumores y sus características anatómo-patológicas.

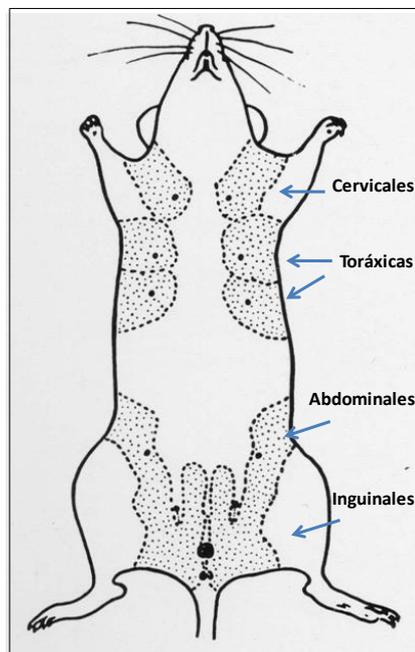


Figura 3: Anatomía de las glándulas mamarias de la rata. Ubicación de las doce glándulas mamarias y nombres correspondientes (flechas) [31].

Por estos motivos, se propuso ahondar en el estudio de este modelo, con el fin de poder contar con una herramienta de trabajo bien caracterizada que nos permita evaluar los múltiples tratamientos experimentales que se están desarrollando en el Uruguay contra el cáncer de mama.

Objetivos generales y específicos

Objetivo general

Ampliar la información experimental existente para el modelo de cáncer de mama en ratas inducido con NMU para facilitar su utilización posterior en la evaluación de nuevos tratamientos contra tumores establecidos.

Objetivos específicos

1. Determinar las zonas y tiempo de aparición de tumores mamarios inducidos con NMU en ratas.
2. Medir su cinética de crecimiento a lo largo del tiempo.
3. Evaluar la existencia de metástasis en otros órganos.
4. Clasificar anatómo-patológicamente los tumores obtenidos de diferentes zonas.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron 44 ratas hembras Wistar vírgenes jóvenes (de 50-55 días) de 100-200 g de peso, alimentadas con ración de Laucha (Vitaron S.A), agua *ad libitum* en una habitación con la temperatura mantenida a 20°C (± 2), 50-70 % de humedad y un ciclo de 12-h-luz/12-h-oscuridad. Las mismas fueron agrupadas de a 5 por caja sobre viruta, las cuales eran mantenidas por personal encargado del bioterio de la Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación (URBE), Facultad de Medicina, Universidad de la República.

Preparación de NMU e inducción de tumores en ratas

Se preparó para cada dosis una solución de 20 mg NMU (Sigma)/ml en ácido acético 3% y se administró vía i.v (50 mg/kg, vena caudal) a los 50, 80 y 110 días de nacidos los animales según el protocolo descrito por Gullino *et al.*, 1975 [28]. Los animales fueron anestesiados mediante inyección i.p con una solución de Ketamina (50 mg/ml) y Xilacina (20 mg/ml), un volumen correspondiente a 1 μ l/g de la rata. Para realizar este trabajo se contó con la colaboración de la Dra. Teresa Freire (Cátedra de Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República), del Dr. Martin Breijo y Marcelo Fernández (URBE, Facultad de Medicina, Universidad de la República). Protocolo aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), Exp. No. 071140-000435-10.

Control de aparición de tumores y cálculo de volumen tumoral

Se controló semanalmente la aparición de tumores mediante la palpación de las zonas corporales mostradas en la **Fig. 3**, además de la totalidad de la superficie de los animales. Este proceso fue realizado por dos personas en conjunto, ya que se necesitó de una persona para tomar el animal de la zona cervical del lomo, y la cola, y otra para palpar y medir correctamente los tumores. Se registró mediante planilla la fecha de aparición, la localización de cada tumor y sus medidas. Para ello se utilizó calibre milimetrado, tomando el largo (diámetro mayor) y ancho (diámetro menor), medidas

que fueron utilizadas para calcular el volumen de cada tumor según la siguiente fórmula:

$$(\text{largo} \times \text{ancho}^2) \times 0.5 \text{ [32]}$$

Además, se registró el estado general de las ratas (actividad locomotora y apariencia) durante el mismo período de tiempo. El estudio se extendió hasta 113 días luego de administrada la última dosis de NMU. Todos los datos se procesaron en tablas y gráficas (GraphPad Prism 5).

Análisis estadístico

Las diferencias entre la cinética de crecimiento tumoral en cada zona de aparición se analizaron con el programa GraphPad Prism 5. Para esto se realizó la prueba *t* de Student (prueba pareada) con un intervalo de confianza del 95%, comparando cada curva de crecimiento con otra, y observando si existían diferencias significativas o no.

Obtención de tumores y necropsia

Los tumores fueron obtenidos por cirugía y de animales que fueron sacrificados a lo largo del ensayo, cuando alguno de sus tumores alcanzó un tamaño de hasta 25 mm de largo y/o se encontraban con muy mal aspecto causado por la enfermedad (desnutrición, parálisis locomotora, estado general desahuciado). A todos los animales se les realizó necropsia para la verificación de metástasis en órganos distantes (pulmones, hígado, bazo, útero) mediante la observación de los mismos. Los tumores extraídos fueron conservados inmediatamente en solución de paraformaldeído (PFA) 4.5% para luego continuar su procesamiento. Las cirugías fueron realizadas por la Dra. Gabriela Kramer y el sacrificio y necropsias de las ratas fueron realizadas por Marcelo Fernández siguiendo el protocolo aprobado por la CHEA, Exp. No. 071140-000435-10.

Preparación de solución fijadora de PFA

Se preparó PFA 4.5% en PBS 10mM, pH 7.3. Bajo una campana de extracción de gases con filtro específico para p-formaldeído (CRUMA G.GS, España) se disolvió 9 g de PFA (Fluka) en 100 ml de agua destilada calentando la solución en plancha eléctrica a 60°C con agitación magnética constante. Luego se agregó unas gotas de NaOH 2N para ayudar la disolución completa. Se dejó enfriar a temperatura ambiente dentro de la

campana y se agregó 100 ml de PBS 20mM pH 7.3 (previo a llevar a volumen final se ajustó el pH de la solución con un pH-metro). Se alicuotó en tubos Falcon y se congeló inmediatamente a -20°C hasta su utilización. Esta solución se utilizó preferentemente fresca en el día o en algunos casos de un stock descongelado y utilizado inmediatamente según recomendaciones técnicas [33].

Fijación de tejidos en PFA

Luego de extraídos los tumores fueron inmediatamente fijados individualmente con PFA 4.5% en PBS toda la noche, en tubos Falcon a temperatura ambiente, siendo el volumen de PFA colocado al menos el doble del volumen de cada muestra.

Preparación de bloques de parafina de tumores mamarios

Luego de fijadas las muestras, se lavaron en 1 L de PBS 10mM, 24 hs. a 4°C con agitación. A continuación se siguió el protocolo de deshidratación del tejido para la inclusión en parafina, donde previamente se colocó cada muestra individualmente en bolsitas caladas. Entre pasajes se escurrió el preparado sobre papel de filtro para quitar el exceso de solución:

- EtOH 95% I: 2 h
- EtOH 95% II: 2 h
- EtOH 100% I: 2 h
- EtOH 100% II: 2 h
- Cloroformo o Xilol I: 2 h
- Cloroformo o Xilol II: 2 h
- Parafina (Histoplast, Biopack) I (en estufa a 60°C): 2 h
- Parafina II (en estufa a 60°C): 2 h
- Parafina III: armado del bloque. Para ello se colocó parafina III en un recipiente resistente al calor y se mantuvo a 60°C aproximadamente (sobre mechero). Cada muestra se retiró de la parafina II, y se pasó a la parafina III, a continuación se retiró de la bolsita que la contenía y se colocó la pieza en el fondo de una cubeta de plástico conteniendo una pequeña capa de parafina III fundida, procurando que no quede aire atrapado. Se incluyó una etiqueta en papel correctamente rotulado con lápiz de grafito (para evitar derrame de tinta

de bolígrafo en la parafina) y cada pocillo de la cubeta fue completado con parafina III, cubriendo correctamente cada muestra. Luego se dejaron sobre la mesada a temperatura ambiente hasta solidificar y se colocaron en la heladera por 24 h. Por último fueron desmoldadas y montadas sobre bases plásticas (TISSU-A-BLOCK). De esta manera se obtuvo cada muestra procesada en bloques de parafina para realizar los cortes histológicos.

Recubrimiento de vidrios portaobjetos con Silano

Para mejorar la adherencia de los tejidos al vidrio, los portaobjetos se colocaron en una canasta de acero inoxidable y se lavaron en HCl 1M 20 min por inmersión. Luego se enjuagaron con agua de la canilla y agua destilada. Se colocaron en EtOH 100% durante 5 min y luego 2 min en (3-Aminopropyl) triethoxysilane 2% (SIGMA) disuelto en acetona seca. Se lavaron 3-4 veces durante 5 min con agua destilada y por último se dejaron secando en estufa a 37°C toda la noche. Se guardaron protegidos del polvo hasta su utilización.

Obtención de cortes histológicos

A partir de los bloques de parafina se obtuvieron cortes de 4 o 5 μm de espesor con un micrótopo manual (Jamato KOHKI, Japón), los cuales fueron montados sobre vidrios portaobjetos silanizados, que fueron secados en estufa durante 2 h a 60°C y posteriormente guardados en cajas portaobjetos protegidas hasta su utilización. Los cortes se realizaron y montaron consecutivamente y se registraron con un número de lámina correlativo.

Desparafinización e hidratación de cortes histológicos

Para la tinción con hematoxilina de Mayer y eosina los cortes histológicos primero fueron desparafinados con Xilol e hidratados con alcoholes en concentraciones decrecientes hasta llevarlos a PBS 10mM pH 7.3:

- Xilol I: 20 min
- Xilol II: 5 min
- EtOH 100% I: 5 min
- EtOH 100% II: 5 min

- EtOH 95%: 5 min
- EtOH 90%: 5 min
- PBS 10mM

Tinción con hematoxilina de Mayer y eosina

Previamente desparafinados e hidratados, los cortes histológicos fueron colocados en hematoxilina de Mayer (SIGMA) 5 min y luego se enjuagaron con agua corriente 5 min para su fijación. Por último se tiñeron con eosina (0.5 g de Eosin Yellowish, Mallincrodt Chemical Work en 150 ml de agua) 5 min y se realizaron 3 enjuagues de 5 min cada uno con agua corriente. Posteriormente se realizó la deshidratación mediante el pasaje por alcoholes a porcentajes crecientes 70, 80, 90, 100% (5 pasadas en cada solución de pocos segundos) y luego por Xilol I y II. A continuación, se colocó sobre los tejidos la solución de montaje: bálsamo de Canadá (Biopack) o Entellan (MERCK), y por último, el cubreobjetos. Se controló que no quedaran burbujas de aire sobre los cortes, se dejó secar a temperatura ambiente, y se guardaron las láminas en las cajas portaobjetos.

Análisis y toma de imágenes de cortes histológicos

La clasificación de los tipos de carcinomas fue realizada por el anatómo-patólogo Dr. José Pedro Pacheco de la Cátedra de Patología de Facultad de Veterinaria, Universidad de la República. El registro de imágenes se realizó en conjunto con él y para el procesamiento de las mismas se utilizó un microscopio (Nikon 200746, Japan), el software NIS-elements y la cámara de dicho microscopio (Digital sight DS-FMC, Nikon, Japan) de la Cátedra de Histología de Facultad de Medicina, Universidad de la República.

Resultados

1. Determinación de la cantidad de tumores mamarios por animal.

El modelo de inducción de tumores de mama con NMU en ratas presenta mucha variabilidad, en cuanto a la cantidad de tumores que se generan por animal y los lugares en donde aparecen según la ubicación de las glándulas mamarias [34, 35]. Estas diferencias están asociadas a la especie de rata empleada, al protocolo de inducción tumoral y a variaciones entre los distintos bioterios [26, 35]. En este trabajo empleamos ratas Wistar de 55 semanas, las cuales recibieron tres dosis de NMU según el protocolo descrito por Gullino *et al.*, 1975 [28]. En primer lugar, se determinó la cantidad de tumores generados por cada rata al cabo del tiempo, ya que no existen actualmente registros de este dato en las condiciones experimentales empleadas. Se comenzó el estudio con 44 ratas Wistar, de las cuales 9 murieron antes de completadas las tres dosis de NMU, quedando 35 animales. Todos fueron chequeados semanalmente mediante palpación de las zonas donde están ubicadas las glándulas mamarias a los efectos de control de aparición de tumores, registrándose 31 animales con tumores al cabo de su vida. Teniendo en cuenta el total de ratas que recibieron tres dosis de NMU ($n = 35$) y los animales que generaron tumores ($n = 31$), se calculó la incidencia tumoral, la cual fue del 89%.

De las 31 ratas que generaron tumores, 10 fueron utilizadas para otro ensayo y no se tuvieron en cuenta en este trabajo, por lo que el número de animales empleado fue de 21. Se observó que estas 21 ratas generaron desde 1 hasta 9 tumores al cabo de seis meses de duración del estudio, siendo 3 el promedio de tumores por rata (**Fig. 4**).

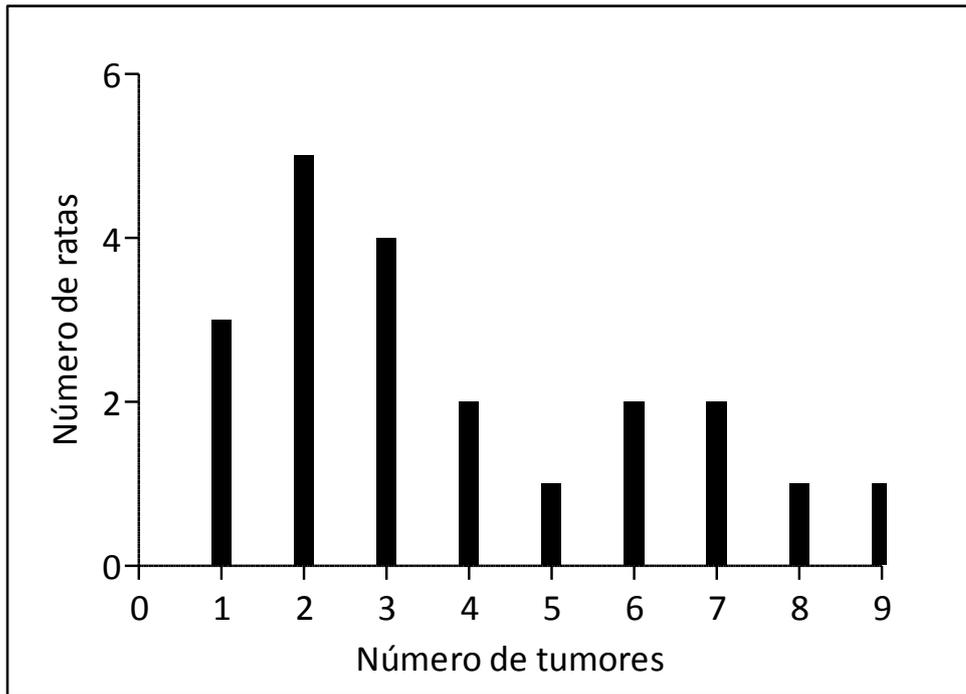


Figura 4: Cantidad de tumores por rata a lo largo de su vida. La figura muestra la cantidad de ratas que desarrollan desde 1 hasta 9 tumores. Ratas con tumor ($n = 21$). Tumores ($n = 81$).

2. Localización y frecuencia de aparición de tumores a lo largo del tiempo.

En estudios previos de este modelo se observó que hay zonas de aparición de tumores más frecuentes en relación a la ubicación de las glándulas mamarias [34, 35], pero no hay estudios que hagan referencia a su momento de aparición ni a los lugares de aparición de tumores menos frecuentes. Con el fin de realizar un estudio cronológico y posicional de los tumores, se establecieron siete zonas en el animal identificadas cada una con un número y color (Fig. 5). Estas zonas se correspondieron con la ubicación de las 12 glándulas mamarias que poseen las ratas: cervicales, torácicas, abdominales e inguinales (Fig.3).

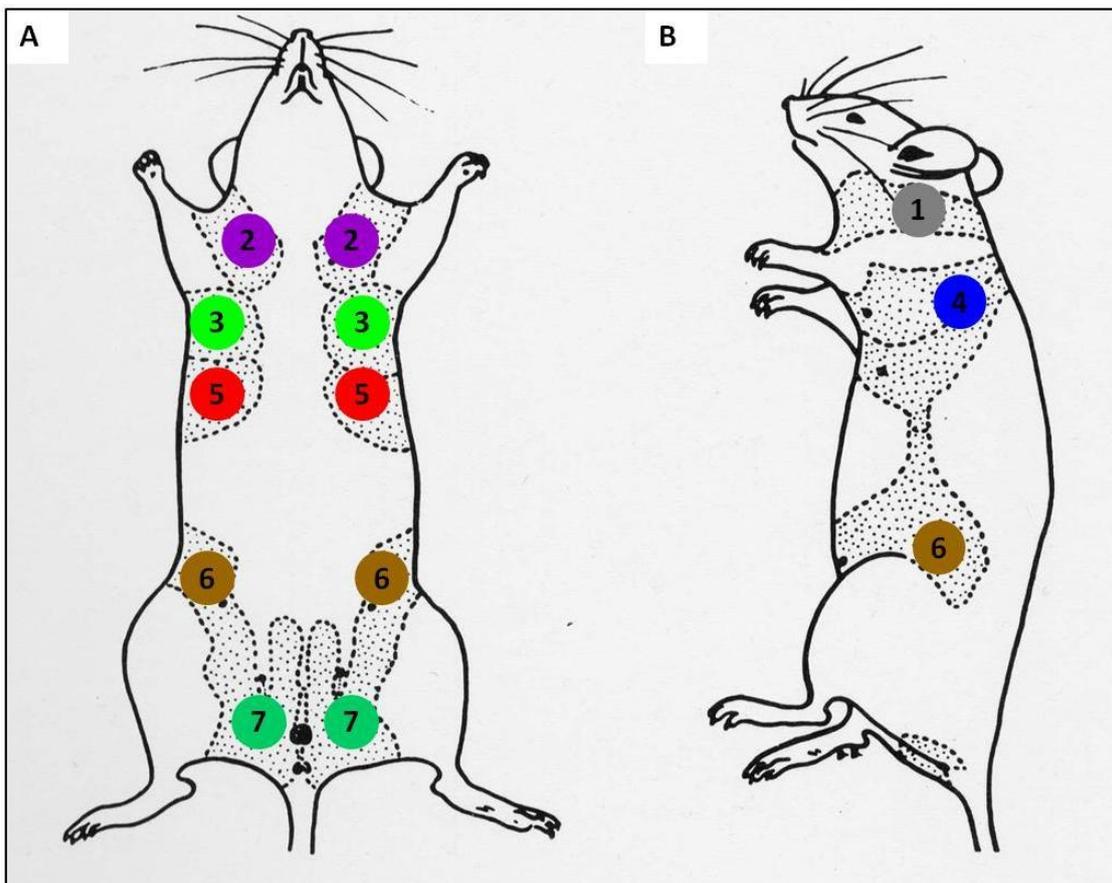


Figura 5: Zonas de aparición de tumores inducidos con NMU en ratas.

Se presenta el esquema de una rata y se indica con un número y color los lugares donde se detectaron tumores, tanto en la zona ventral (A), como lateral (B). Todas las zonas se corresponden con las glándulas mamarias de la rata: cervicales, torácicas, abdominales e inguinales. Ratas con tumor ($n = 21$). Tumores ($n = 81$).

Se llevó el registro de la cantidad y el momento en que aparecía cada tumor. Se observó que los tumores comenzaron a aparecer a los 15 días luego de administrada la última dosis de NMU (75 días luego de la primera dosis), encontrando dos picos de aparición a los 35 y 65 días luego de la última dosis. Los tumores dejaron de aparecer a los 113 días desde la última dosis (seis meses luego de comenzado el tratamiento con NMU) (**Fig. 6**). También se observó que hubo zonas de aparición más frecuentes que otras. El 80% de los tumores aparecieron en las zonas 2, 3 y 5 (región de glándula mamaria cervical y torácica), en menor frecuencia en 6 y 7 (región de glándula mamaria abdominal e inguinal), 4 y 1 (región lateral de glándula mamaria cervical y torácica) a lo largo de todo el ensayo.

Debido a que encontramos tumores en zonas de mayor frecuencia que otras, se centró el análisis en los mismos, ya que podrían ser un blanco útil para la evaluación de nuevas terapias contra cáncer de mama.

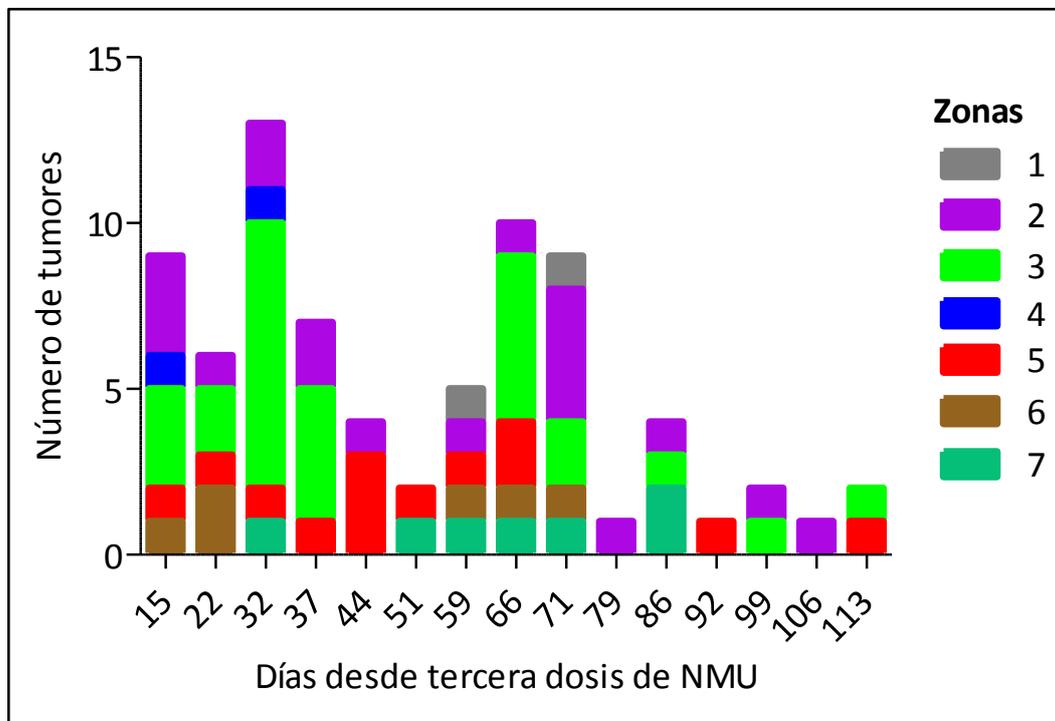


Figura 6: Número de tumores por zona y tiempo de aparición con respecto a la tercera dosis de NMU. Cantidad de tumores en función del momento en el cual aparecen. Los distintos colores hacen referencia a cada zona indicada en la Fig. 5. Ratas con tumor ($n = 21$). Tumores ($n = 81$).

3. Análisis de cinética de crecimiento de tumores más frecuentes.

Para conocer el comportamiento de los tumores a lo largo del tiempo, se realizó un seguimiento de la cinética de crecimiento individual. El objetivo fue saber si los tumores de las zonas distintas tenían una cinética de crecimiento igual o diferente. Se utilizó tumores que pudieron ser medidos durante un periodo de 30 días, dado que a partir del mes la sobrevivencia de las ratas fue disminuyendo (**Fig. 7**). Se midió el largo y ancho de los tumores semanalmente y posteriormente se calculó su volumen. Para comparar el crecimiento de los tumores se tomó como punto de inicio en el gráfico el momento de aparición de los mismos, ya que de esta forma se pudieron comparar tumores que aparecían en diferentes momentos a lo largo de todo el ensayo. Por último se realizó el promedio y desvío estándar de la cinética de crecimiento de los tumores de cada zona.

Con respecto a los tumores de zonas 3 y 5, se observó que todos tenían un crecimiento progresivo y similar (**Fig. 8**), no encontrándose diferencias significativas ($p = 0.0891, >0.05$), mientras que en la zona 2 encontramos dos comportamientos diferentes: tumores que tenían un crecimiento muy lento (2/12) (diferencia significativa: $p < 0.05$, **Fig. 8**) y tumores de crecimiento rápido (10/12) (diferencia significativa: $p < 0.05$, **Fig. 8**), lo que sugería que podían ser tumores más agresivos que el resto. Las similitudes y diferencias encontradas en la cinética de crecimiento de los tumores llevaron a plantear que los tumores de las zonas 3 y 5 podrían ser del mismo tipo histológico, mientras que los tumores de la zona 2 podrían ser diferentes, y también extender esta diferencia en el mismo grupo para los tumores de rápido o lento crecimiento. Para comprobarlo, se realizó la clasificación anatomo-patológica de estos tumores.

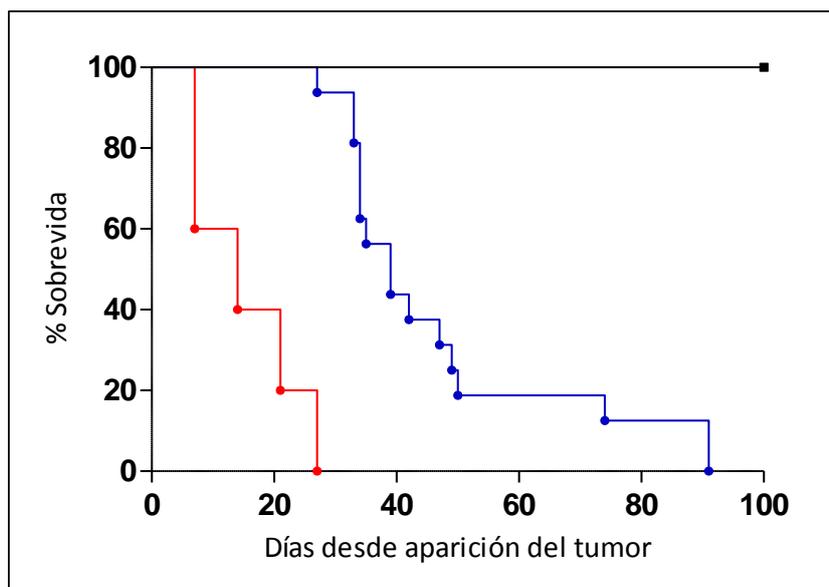


Figura 7: Sobrevivencia de ratas tratadas con NMU. Se muestran los animales que murieron antes del período de seguimiento de cinética de crecimiento tumoral (30 días, Fig. 8) (línea roja, $n = 5$). Animales que murieron o fueron sacrificados luego de los 30 días y se siguió la cinética de crecimiento tumoral (línea azul, $n = 16$). Ratas a las que se le administró NMU pero no generaron tumores (línea negra, $n = 4$).

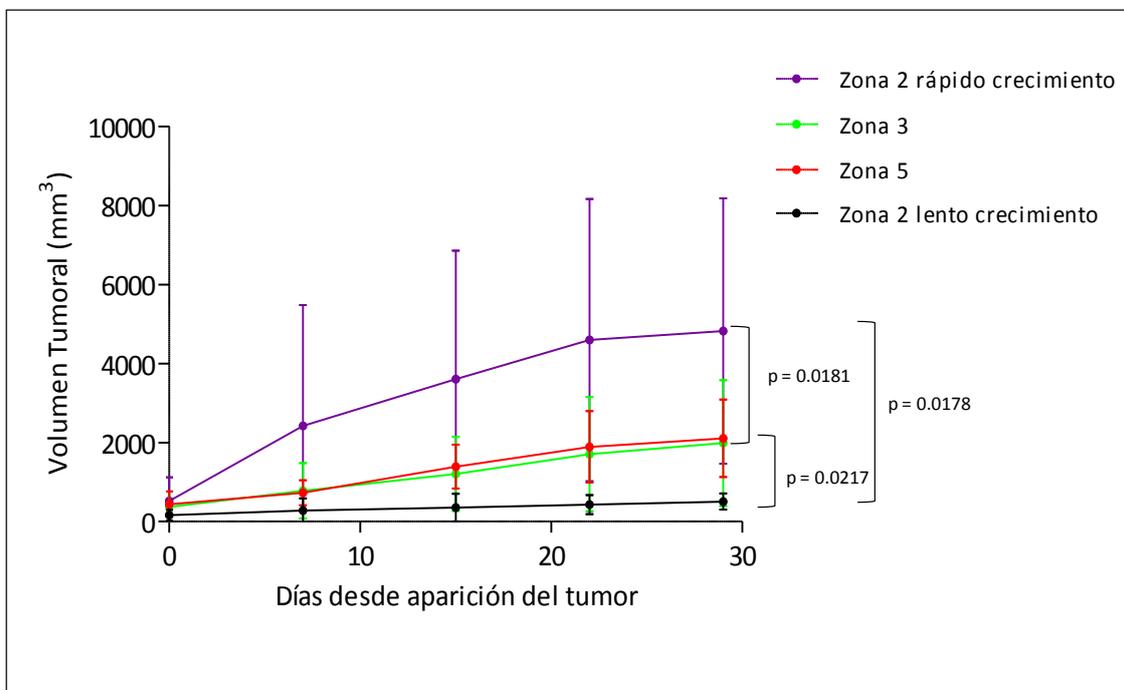


Figura 8: Cinética de crecimiento tumoral de zonas de mayor frecuencia de aparición. Zona 2 rápido crecimiento ($n = 10$), Zona 2 lento crecimiento ($n = 2$), Zona 3 ($n = 18$), Zona 5 ($n = 5$), Ratas con tumor ($n = 16$).

4. Estudio anatómico-patológico de tumores mamarios más frecuentes.

En trabajos realizados previamente se afirma que el modelo de inducción tumoral con NMU representa la enfermedad en humanos con respecto a la histo-patología de los tumores [16, 24, 25, 28]. Sin embargo, en estos trabajos se han clasificado los tumores sin tener en cuenta el lugar donde aparecen en la rata. Conocer este dato es importante para poder establecer si hay diferencias entre las zonas de aparición, ya que esto podría influir en la respuesta antitumoral frente a nuevos tratamientos. En este trabajo se analizaron por anatomía-patológica los tumores de las zonas más frecuentes de aparición (zonas 2, 3 y 5) y de algunas zonas menos frecuentes (zonas 1 y 4).

Inicialmente se analizó tejido glandular mamario normal, con el objetivo de visualizar la estructura normal del tejido. En la **Fig. 9A** se observa una imagen panorámica, en donde se vio la composición de esta glándula en su mayoría por tejido adiposo y se divisó la estructura de un lóbulo mamario. En la **Fig. 9B** (a mayor aumento) se observó un grupo de acinos mamarios (que representan la unidad secretora de la glándula) los cuales mediante los lobulillos se unen con el conducto galactóforo que tiene su fin en el pezón del animal, y en su conjunto conforman el lóbulo mamario.

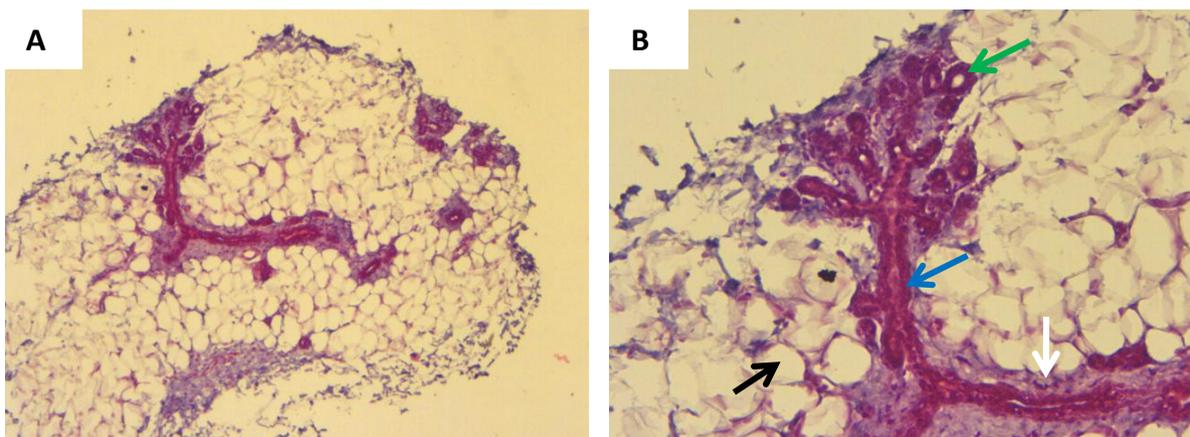


Figura 9: Estructura de mama normal de rata. Imágenes obtenidas por microscopía óptica de campo claro de cortes de 4 μm de espesor de tejido glandular mamario teñido con hematoxilina y eosina. A) Glándula mamaria de rata joven. 40x. B) A mayor aumento se muestra el lóbulo mamario: acinos glandulares (flecha verde) conectados por lobulillos con el ducto principal (flecha azul), rodeado por tejido conjuntivo (flecha blanca). Tejido adiposo (flecha negra). 100x.

Tumores de zona 2 (cervical)

De los tumores de zona 2, se analizaron por anatomía-patológica 8 muestras. Se encontraron 6 tumores malignos y 2 benignos. De los malignos, 3 tumores de distintos tamaños (pequeño y mediano, **Tabla 1**) fueron clasificados como adenocarcinoma quístico papilar (**Fig. 10A**). Este tipo de tumor tiene como característica la formación de papilas con células hipercromáticas y además la formación de cavidades quísticas con epitelio aplanado. Dos tumores (de tamaños grandes, **Tabla 1**) fueron clasificados como carcinoma ductal infiltrante (**Fig. 11B**). En este tumor se ve la formación de ductos de distintas morfologías y la invasión de los mismos hacia los tejidos circundantes (tejido conjuntivo) de la mama. El ultimo tumor maligno de esta zona (de tamaño grande, **Tabla 1**), se clasificó como carcinoma lobulillar *in situ*; se observaron las células tumorales contenidas dentro de la membrana basal de los lobulillos sin observarse rotura de la misma (**Fig. 11C**), lo que le dio la clasificación *in situ*. El tejido conjuntivo extra lobulillar se vio invadido por células inflamatorias, y también se encontró presencia de ductos con necrosis central. En todos los casos se encontró una relación núcleo citoplasma de 1:1 (mientras que esta misma relación en células normales es 5:1).

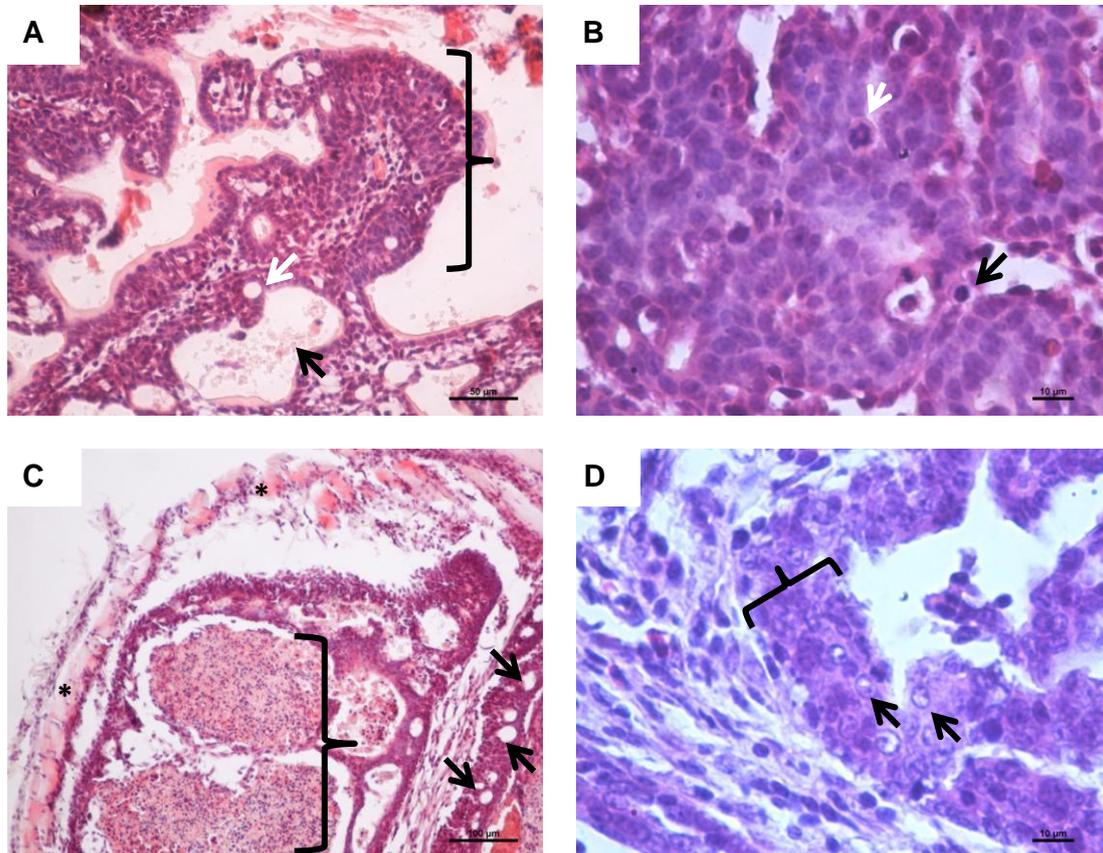


Figura 10: Características del adenocarcinoma quístico papilar infiltrante inducido con NMU. Imágenes obtenidas por microscopia óptica de campo claro de cortes de 4 μm de tumores obtenidos de las zonas 2 y 3, clasificados como adenocarcinoma quístico papilar infiltrante y, procesados y teñidos con HE como se indica en materiales y métodos. A) Se muestra una papila (llave) compuesta por células hiper cromáticas. Se observa ducto intra papilar (flecha blanca) y cavidad quística (flecha negra) compuesta de epitelio aplanado. B) A mayor aumento se señala una mitosis en estallido (flecha blanca) e infiltración de linfocitos (flecha negra). C) Se señala región comedónica (llave), infiltración en musculo estriado (asteriscos) y fenestraciones (flechas negras). D) Se observan células con núcleos esmerilados (flechas) y tejido epitelial pluriestratificado desorganizado (llave).

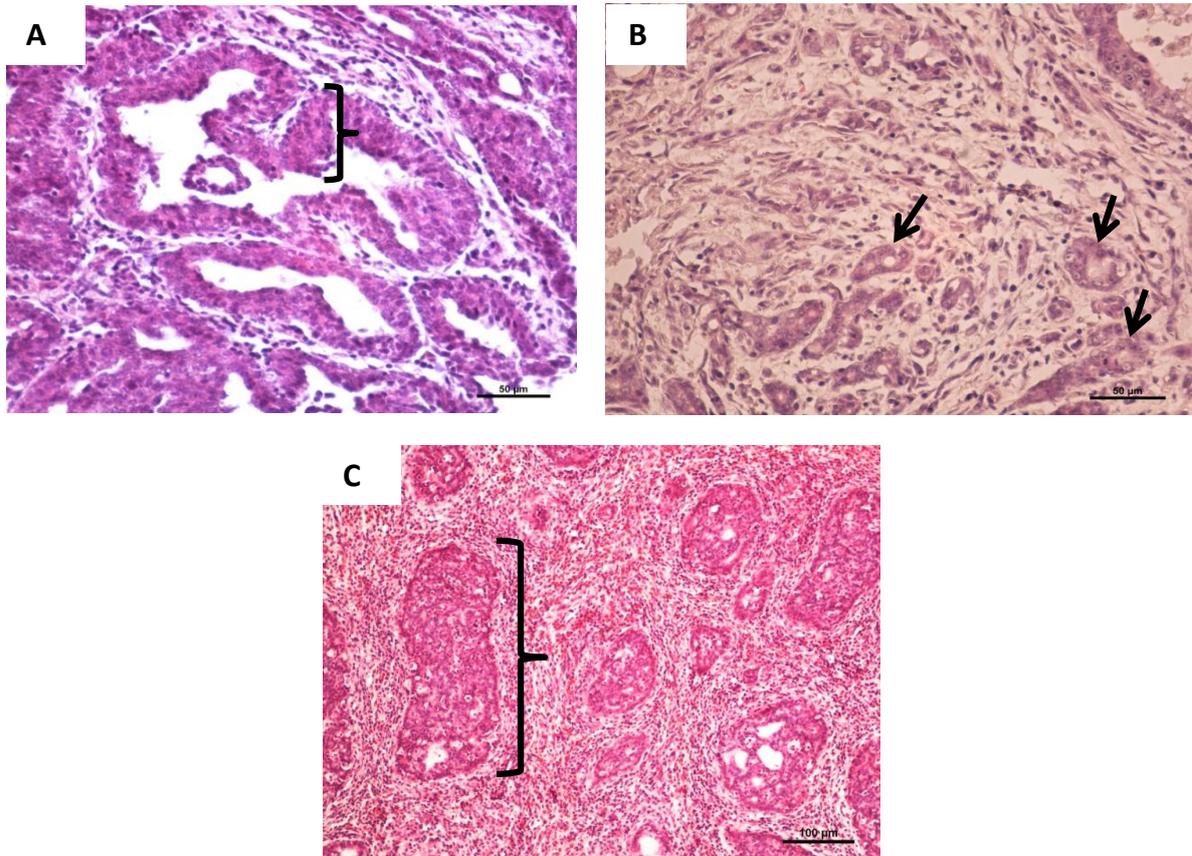


Figura 11: Tumores mamarios inducidos con NMU de diferentes zonas de aparición. Imágenes obtenidas por microscopía óptica de campo claro de cortes de 4 μm de espesor de tumores mamarios inducidos con NMU, procesados y teñidos con HE como se describe en materiales y métodos. A) Adenocarcinoma quístico papilar infiltrante de zona 3: formación de papila (llave) característica de este tipo de tumor. B) Carcinoma ductal infiltrante de zona 2: presencia de ductos (flechas) de distintas morfologías los cuales infiltran en el tejido conjuntivo. C) Carcinoma lobulillar in situ de zona 4: lobulillo (llave) contenido por membrana basal.

Los 2 tumores benignos encontrados (de tamaño mediano, **Tabla 1**) fueron clasificados como adenomas quísticos papilares con secreción de proteína. Estos se caracterizaron por la presencia de una capsula verdadera (**Fig. 12A**), la cual es una formación quística compuesta por un grupo de células organizadas. En el interior de los tumores los quistes estaban formados por epitelio basal, donde se observó que el citoplasma de las células era muy eosinófilo, evidenciando la relación núcleo citoplasma de 1:5 (**Fig. 12B**) observada en células normales.

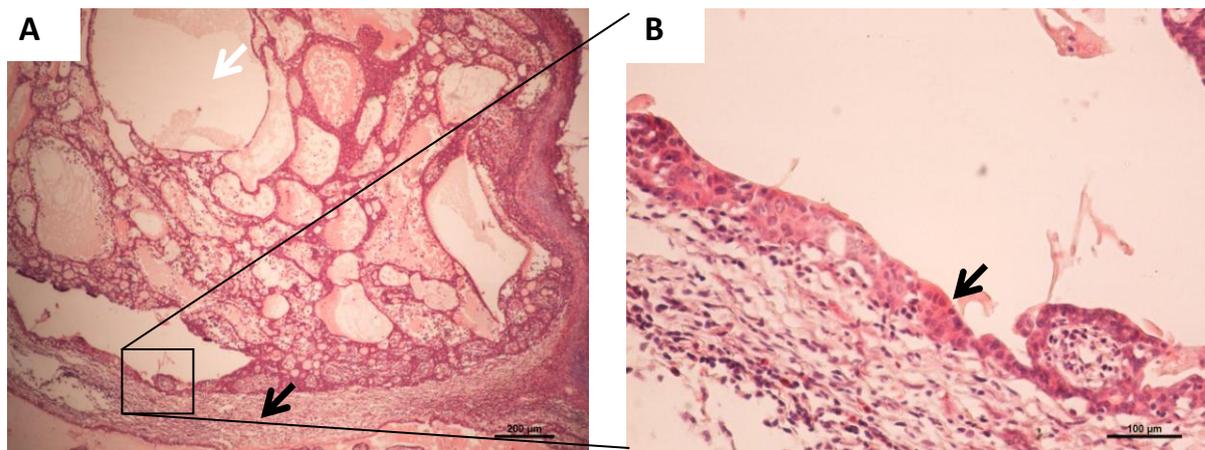


Figura 12: Adenoma quístico papilar de zona 2. Imágenes obtenidas por microscopia óptica de campo claro de cortes de 4 μm de tumor inducido con NMU, procesado y teñido con HE como se indica en materiales y métodos. A) Imágen panorámica donde se señala la capsula verdadera (flecha negra) y formación de quiste (flecha blanca) formado por una capa celular ordenada. B) Se señala la capa endotelial donde se observa la relación núcleo/citoplasma 1:5 (flecha) de dichas células, similares a células normales.

Se relacionó la clasificación con la cinética de crecimiento, encontrando que los tumores de crecimiento rápido se correspondieron con los tumores malignos y los de crecimiento lento con los benignos.

Tumores de zona 3 (torácica)

De los tumores de esta zona se analizaron 4 de distintos tamaños (pequeño, mediano y grande, **Tabla 1**), los cuales fueron clasificados todos como adenocarcinomas quísticos papilares (**Fig. 11A**). Se observó más características de este tipo de tumor como la formación de ductos intra papilares, lo cual es algo atípico en el tejido normal y afirma la patología. También se observaron características típicas de tumores anaplásicos (comportamiento maligno) como mitosis en estallido (**Fig. 10B**) y células con núcleos esmerilados (que contienen la cromatina ordenada en su periferia, **Fig. 10D**), lo cual no es un comportamiento común en células normales. Otra característica que mostró el rápido crecimiento fueron las zonas de necrosis, llamadas regiones comedónicas, donde las células al no tener vascularización y poseer un índice de duplicación rápido

entran en hipoxia y mueren (**Fig. 10C**). Esto es también indicativo de la malignidad del tumor. En este tumor además se encontró infiltración en el tejido muscular estriado.

Tumores de zona 5 (torácica)

Para esta zona se analizó una muestra de tejido tumoral (de tamaño mediano, **Tabla 1**), que resultó ser un adenocarcinoma quístico papilar, de similares características que los encontramos en zona 3. El mismo fue infiltrante, observándose la invasión de las células tumorales en el estroma (tejido conjuntivo) mamario.

Con respecto a la relación con la cinética de crecimiento e histología de las zonas 3 y 5, se confirmó que la similitud en el comportamiento de estos tumores en estas zonas se debía a que eran el mismo tipo de tumor maligno. No obstante, para comprobarlo se deben clasificar un mayor número de tumores.

Tumores de zonas menos frecuentes

Se analizaron 2 muestras de tumores (de tamaño mediano y grande, **Tabla 1**) de zona 4 (zona de glándula toraxica, región lateral, **Fig.5**) y los mismos fueron clasificados como carcinoma lobulillar *in situ* (**Fig. 11C**).

Además, se analizó un tumor de la zona 1 (zona de glándula cervical, región lateral, **Fig. 5**) de tamaño grande (**Tabla 1**) que fue clasificado como carcinoma espinocelular infiltrante con áreas comedónicas (**Fig. 13A**). Según lo descrito por el anatomopatólogo, este tumor podría ser de otro tipo de glándula, tal vez de la zona auditiva del animal (de acuerdo con la zona de aparición del tumor) y no de glándula mamaria. Algo típico del mismo es la formación de cebolletas córneas (**Fig. 13B**).

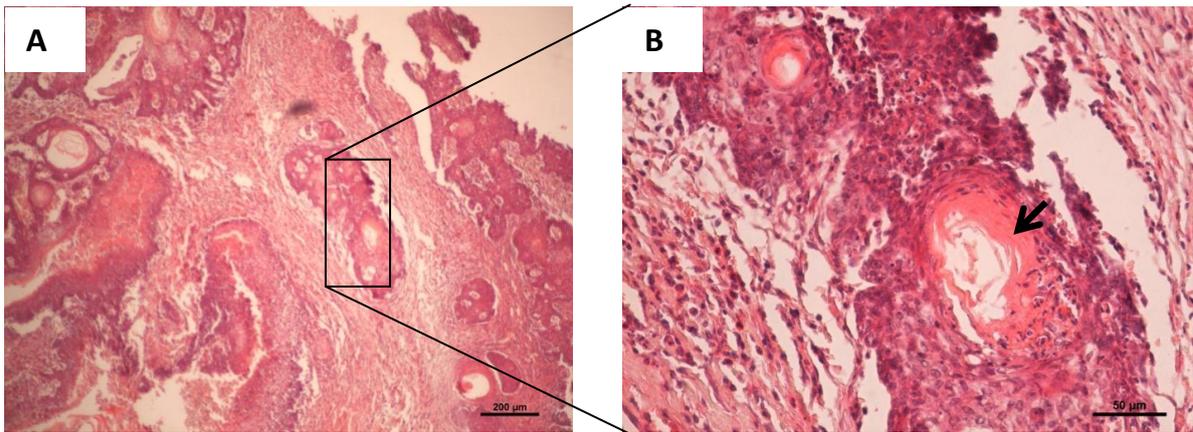


Figura 13: Carcinoma espinocelular infiltrante de zona 1. Imágenes obtenidas por microscopía óptica de campo claro de cortes de 4 µm de tumor inducido con NMU, procesados y teñidos con HE como se indica en materiales y métodos. A) Imagen panorámica del carcinoma espinocelular infiltrante. B) Se observa a mayor aumento cebolleta córnea (flecha negra) característica de este tipo de tumor.

Con respecto al tamaño de los tumores estudiados, vimos que éste no parecía ser un factor que determine el grado de malignidad del tumor, ya que la clasificación tanto de los tumores pequeños, como medianos y grandes, fue la misma (**Tabla 1**).

Zona	Tamaño*	Días de aparición*	Tipo de carcinoma
1	grande	21	Carcinoma espinocelular infiltrante
2	pequeño	10 (cirugía)	Adenocarcinoma quístico papilar
	pequeño	10 (cirugía)	Adenocarcinoma quístico papilar
	mediano	8 (cirugía)	Adenocarcinoma quístico papilar
	mediano	35	Adenoma quístico papilar
	mediano	34	Adenoma quístico papilar
	grande	27	Carcinoma ductal infiltrante
	grande	81	Carcinoma ductal infiltrante
	grande	20	Carcinoma lobulillar <i>in situ</i>
4	mediano	8 (cirugía)	Carcinoma lobulillar <i>in situ</i>
	grande	12	Carcinoma lobulillar <i>in situ</i>
3	pequeño	10 (cirugía)	Adenocarcinoma quístico papilar
	mediano	8 (cirugía)	Adenocarcinoma quístico papilar
	mediano	8	Adenocarcinoma quístico papilar
	grande	8	Adenocarcinoma quístico papilar
5	mediano	8 (cirugía)	Adenocarcinoma quístico papilar

Tabla 1: Tumores clasificados por anatomía-patológica. Se resumen todos los datos de cada muestra analizada. Tamaño grande: entre 15x15 y 20x20 mm. Tamaño mediano: entre 10x10 y 15x15mm. Tamaño pequeño: menor a 10x10mm.

*Tamaño y tiempo al momento de extracción del tumor desde su aparición en el animal.

5. Evaluación de la existencia de metástasis en otros órganos.

La diseminación de las células tumorales hacia otros órganos es algo a tener en cuenta al momento de caracterizar un modelo animal de cancer de mama, ya que se busca que el modelo represente la enfermedad en humanos. En este estudio, y tras la necropsia de las ratas que fueron sacrificadas por causa del tumor o agravamiento de la enfermedad, no se observaron metástasis macroscópicas en los órganos distantes (bazo, pulmones, hígado) estudiados. Estos resultados están en concordancia con el análisis de los cortes histológicos de los tumores, en los cuales no se encontraron embolizaciones de células tumorales en vasos linfáticos y hemáticos, indicadores de que las células tumorales no se habrían diseminado por vía sanguínea o linfática.

Discusión

Una forma de representar el cáncer de mama humano en animales de experimentación es mediante la inducción química de tumores mamarios con NMU en ratas. Con el fin de comprender y facilitar el empleo de este modelo para la evaluación de nuevas terapias, nos centramos en determinar parámetros como: la incidencia tumoral en los animales, el momento y lugar de aparición de los mismos, su cinética de crecimiento e histología. Consideramos importante saber estas características, ya que si existieran diferencias biológicas en los tumores de acuerdo a su localización, tiempo de aparición o cinética de crecimiento, se deberían contemplar al momento de realizar el protocolo de tratamiento y de interpretar los resultados de evaluación de respuesta al mismo.

Hay varios factores que pueden influir a la hora de obtener tumores inducidos con NMU. En trabajos previos se describió que la incidencia tumoral, con DMBA y NMU, así como también el número de tumores por rata y la latencia son influenciados por la edad de las ratas y su historia reproductiva, y además por la dieta y dosis administrada [25]. En ese sentido, Gullino *et al.*, 1975 [28] observó que la inducción tumoral en 3 cepas de ratas diferentes (BUF/N, Sprague-Dawley y F344) de 50 días de nacidas, mediante 3 dosis i.v de NMU 50mg/kg mostraron una incidencia de 89 (BUF/N), 73 (SD) y 89% (F344) en el total de animales (12 grupos de 20 ratas) y los tumores comenzaron a aparecer a los 77, 86 y 94 días, respectivamente desde la primera dosis del carcinógeno. Además en la cepa BUF/N se generó un promedio de 5,2 tumores por rata. Siguiendo con este mismo protocolo, pero con una dosis menor (35mg/kg), Huggins *et al.*, 1981 [14] realizaron dos ensayos: en el primero utilizaron una sola dosis i.v a los 28 días de nacidos los animales obteniendo una incidencia del 79% y aparición de los tumores a los 66-68 días de administrado el carcinógeno; y el segundo 5 dosis (administradas 2 veces por semana) a los 48 días de edad, donde la incidencia fue del 100% y los tumores aparecieron a los 62 días. Posteriormente Thompson *et al.*, 2000 [16] utilizaron ratas Wistar e igual método de administración, mediante una dosis de NMU de 30mg/kg a los 60 días de nacidos los animales; en este caso los tumores comenzaron a aparecer a los 168 días con un promedio de 0,91 tumores por animal

(no detallaron información sobre incidencia y zonas de aparición). Estos datos permiten concluir que, además de la cepa de rata utilizada y el protocolo de inducción con NMU empleado, existen variables como las condiciones de alojamiento de animales en cada bioterio que pueden determinar una mayor o menor incidencia y latencia tumoral. En general, se observó que en animales de más edad los tumores aparecen más tarde.

A lo largo de los años se buscó otra forma de administración del NMU, que no requiriera una persona experta para la inyección i.v en las ratas, y que permitiera realizar el procedimiento de inducción tumoral más fácilmente; por lo que se comenzó a suministrar vía intra peritoneal (i.p). Thompson y Adlakha, 1991 [34] administraron una sola dosis de 50 mg/kg vía i.p en ratas Sprague-Dawley de 50 días, obteniendo una incidencia del 100%, y una cantidad de 5 tumores por animal a los 27 días de la primer dosis de NMU. En cambio Thompson *et al.*, 1995 [36], mediante el mismo protocolo pero dando el carcinógeno a ratas más jóvenes (21 días de nacidas) obtuvieron un 60% de incidencia y los tumores aparecieron a los 30 días de administrado el NMU; no describen cuantos tumores genera cada animal. Posteriormente Liska *et al.*, 2000 [24] realizaron el mismo protocolo pero dando dos dosis de NMU con un intervalo de 60 días, y en sus resultados obtuvieron una incidencia del 60-76% y una cantidad de 2 tumores por rata. En cambio Perše *et al.*, 2009 [35] realizando el ensayo en las mismas condiciones observaron una incidencia del 93,7%, y los tumores comenzaron a aparecer a los 77 días con un promedio de 5 tumores por rata. Coincidiendo con lo mencionado anteriormente, en este trabajo se hace hincapié en las variaciones que existen entre los resultados obtenidos con respecto a los de Liska *et al.*, 2000 [24] y las atribuyen a las diferencias que puede haber entre laboratorios y entre distintos grupos de trabajo. Pero, en general, se puede proponer que utilizando más cantidad de dosis en mayor concentración se obtienen más tumores por animal y en un periodo de tiempo menor. Aunque no es menor establecer un máximo de dosis, ya que en el ensayo de Huggins *et al.*, 1981 [14] con 5 dosis observaron efectos de toxicidad y muerte en algunos animales (3/20), casos de leucemia (5/20), tumores en el ducto auditivo (3/20) y tumor renal (1/20).

En nuestro estudio elegimos administrar el carcinógeno de forma i.v para inducir los tumores con NMU de acuerdo a la experiencia de las personas que colaboraron con el trabajo y porque, a pesar de que encontramos más descripción de resultados cuando se administra el carcinógeno vía i.p, observamos que los resultados mediante vía i.v parecen ser más homogéneos (comparando datos de incidencia tumoral y el momento de aparición de los tumores), mientras que por vía i.p los resultados son más variables y existen mayores diferencias entre los protocolos utilizados (**Tabla 2**).

Utilizamos ratas Wistar de 50 días de nacidas (jóvenes) y se administraron tres dosis de NMU de 50mg/kg vía i.v, con un intervalo de 30 días. Los resultados mostraron una incidencia tumoral del 89%, en donde los tumores comenzaron a aparecer a los 75 días desde la primera administración del NMU (15 días luego de la última dosis, **Fig. 6**) con un promedio de 3 tumores por rata (**Fig. 4**), en su mayoría en las zonas 2, 3 y 5 (zonas cervical y torácica. **Fig. 6**). Nuestros resultados se asemejaron a los de Gullino *et al.*, 1975 [28] a pesar de que utilizaron ratas de diferente cepa (BUF/N, SD y F344) que en este trabajo. Observamos similitudes en la incidencia tumoral, (89% en ambos trabajos) y momento de aparición de los tumores (75 días en nuestro trabajo vs 77 días, con la cepa BUF/N), pero diferencia en el promedio de tumores por rata (nuestro trabajo 3 vs 5,2 en la cepa BUF/N) (**Tabla 2**). Con respecto a los trabajos donde se administró el carcinógeno vía i.p, mediante dos dosis y con otra cepa de rata (Sprague-Dawley), nuestros resultados fueron similares a los reportado por Liska *et al.*, 2000 [24] en cuanto a la cantidad de tumores generados por animal (3 en nuestro trabajo vs 2 tumores/rata), y distintos a los plateados por el resto de los autores (5 tumores/rata) (**Tabla 2**). Con respecto a la aparición de los tumores, nuestro resultado (75 días) se aproximó al reportado por Perše *et al.*, 2009 (77 días) [35]. En los trabajos que utilizan una dosis de NMU, no encontramos similitudes en los resultados.

Con respecto a las zonas en donde se generan los tumores, en los trabajos consultados se nombran según la ubicación de las glándulas mamarias (**Fig. 3**). Nosotros determinamos lo más precisamente posible el lugar de aparición de todos los tumores generados (**Fig. 5**), y nuestros resultados fueron similares a los de Thompson y Adlakha, 1991 [34] y Perše *et al.*, 2009 [35] donde a pesar de las diferencias en la

metodología empleada se generaron mayormente tumores en zonas cervical y torácica, que podrían corresponder a las zonas 2, 3 y 5 de nuestro estudio.

La cinética de crecimiento tumoral es otro parámetro que se describió en este trabajo y se relacionó con las zonas donde aparecían los tumores, ya que en la bibliografía no existen datos de este tipo. Encontramos diferencias en la velocidad de crecimiento en los tumores de las zonas más frecuentes (**Fig. 8**): mientras que los tumores de las zonas 3 y 5 presentaron una velocidad de crecimiento similar, en la zona 2 encontramos tumores que tenían un crecimiento más rápido y que alcanzaban tamaños mayores que los tumores de zonas 3 y 5. Dentro de la zona 2 observamos tumores que poseían un crecimiento lento comparado con el resto de los tumores. Esto nos llevó a cuestionarnos si estos tumores al tener diferentes comportamientos en su crecimiento eran también distintos en su histología. En el análisis anatómico-patológico se encontró que los tumores de las zonas 3 y 5 eran del mismo tipo (adenocarcinoma quístico papilar invasivo, **Fig. 11A**), confirmando que la similitud en el comportamiento de estos tumores se debía a que eran morfológicamente iguales. Sin embargo para afirmar esta observación se requerirá analizar un mayor número de tumores.

Con respecto a la zona 2 los tumores que tenían un crecimiento rápido se encontraron carcinomas del tipo quístico papilar (**Fig. 10A**), lobulillar (**Fig. 11C**) y ductal (**Fig. 11B**). Esta variabilidad podría dar explicación al gran desvío standard que se observó en la curva de cinética de crecimiento para esta zona, ya que posiblemente la variación en la morfología de estos tumores también determine su velocidad de crecimiento. Por otra parte los tumores que tuvieron un crecimiento lento fueron clasificados como adenomas (**Fig. 12**), lo cual tiene sentido por tratarse de tumores benignos.

Los resultados obtenidos en cuanto a la clasificación histológica coinciden con los trabajos publicados, donde clasifican a los tumores como adenocarcinomas, en su mayoría invasivos y del tipo papilar; además se han clasificado tumores del tipo cribiformes, comedocarcinomas, ductales y mixtos. Asimismo, se encontraron tumores benignos en el trabajo de Perše *et al.*, 2009 [35] (adenomas, 6/158 tumores totales), y en el de Thompson y Adlakha, 1991 [34] (fibroadenomas 12/159 tumores totales). De

acuerdo con esto observamos que no es frecuente encontrar tumores benignos, y que el tipo encontrado en nuestro trabajo coincide con lo reportado anteriormente. Concluimos que a pesar de las diferencias en los procesos para inducir tumores con NMU en los trabajos descritos y el nuestro, los resultados sobre la histología de los tumores fueron similares, y además observamos que en este modelo se generan distintos tipos de carcinomas los cuales podrían ser utilizados para evaluar terapias específicas para cada tipo de tumor.

Con respecto a la diseminación de la enfermedad hacia otros órganos, en Gullino *et al.*, 1975 [28] las metástasis encontradas fueron frecuentes en medula ósea y bazo. En otro trabajo donde se encontró metástasis en pulmones fue en Singh *et al.*, 2000 [37], en el cual indujeron tumores mamarios con NMU en ratas Sprague-Dawley de 21 días de nacidas mediante múltiples dosis i.p; también en Perše *et al.*, 2009 [35] (2/32 ratas) pero utilizando 2 dosis de NMU en la misma cepa de rata a los 50 días de nacidas. Aquí realizaron un estudio macro y microscópico y encontraron metástasis en hígado, bazo y ganglios linfáticos. En cambio en Liska *et al.*, 2000 [24] utilizando el mismo procedimiento en la inducción de los tumores no encontraron metástasis macroscópicas. Atribuyen, nuevamente las variaciones entre sus resultados a las diferencias que puede haber entre laboratorios, ya que se utilizó en ambos casos el mismo procedimiento para la inducción de tumores mamarios. En Clement *et al.*, 1996 [38] se discutió que en los estudios a lo largo de los años no se ha logrado afirmar que el modelo sea metastásico o no, y en Thompson *et al.*, 1992 [39] relacionaron la edad de los animales con este hecho y afirman que la misma al momento de la administración del carcinógeno tiene su peso en la aparición de la metástasis, ya que ellos encontraron focos metastásicos en pulmones, bazo e hígado en animales de 35 y 42 días de nacidos, y no en animales más jóvenes. En nuestro caso realizando el mismo procedimiento que Gullino *et al.*, 1975 [28] en un total de 44 animales no encontramos metástasis macroscópicas al momento de muerte o sacrificio de los animales, y puede deberse a la cepa de rata utilizada y que además solo realizamos un estudio macroscópico al momento de la necropsia de los animales.

En resumen, administrando tres dosis de NMU (50mg/kg) i.v a ratas Wistar, se obtuvo una incidencia tumoral del 89% (promedio de 3 tumores por rata) y los tumores comenzaron a aparecer a los 15 días de administrada la tercera dosis del carcinógeno NMU, mayoritariamente en las zonas que denominamos 2, 3 y 5 (cervical y torácica). Se estableció una relación entre la cinética de crecimiento e histología de los tumores con respecto a las zonas donde aparecían los mismos, encontrando dos comportamientos diferentes para la zona 2: tumores de crecimiento rápido que fueron malignos y tumores de crecimiento lento que fueron benignos. Además, entre las zonas 3 y 5 se encontró similar cinética de crecimiento, siendo estos tumores malignos del mismo tipo. Sin embargo, para validar esta afirmación se deben clasificar un mayor número de tumores por zona.

Creemos de gran importancia conocer la mayor cantidad de características posibles sobre el modelo de carcinogénesis inducida con NMU para así poder predecir cómo va ser el desarrollo y aparición de los tumores en este modelo y utilizarlo convenientemente en ensayos de nuevas terapias contra el cáncer de mama. Además, las características de los tumores son igualmente importantes ya que para evaluar terapias en tumores ya establecidos se debe saber qué tipo de tumor se está tratando y conocer su comportamiento cinético. Asimismo, sería de muy buen aporte poder ampliar esta clasificación con marcadores tumorales y estudios genéticos para completar la tipificación de estos tumores inducidos con NMU.

Autores	Protocolo de inducción de tumores de mama con NMU en ratas							Resultados				
	Vía de administración de NMU	Cantidad de Dosis	Intervalo entre dosis (días)	Dosis (mg/kg)	Cepa de rata	Edad	Aparición de tumores (días primera dosis de NMU)	Incidencia (%)	Tumores /rata	Zonas	Metástasis	
Gullino <i>et al.</i> , 1975 [28]	i.v.	3	30	50	BUF/N	50	77	89	5,2	n/d	Si	
		3	30	50	SD	50	86	73	n/d	n/d	n/d	
		3	30	50	F344	50	94	89	n/d	n/d	n/d	
Huggins <i>et al.</i> , 1981 [14]	i.v.	1	-	35	SD	28	66-68	79	n/d	n/d	n/d	
		5	2 dosis x semana	35	SD	48	62	100	n/d	n/d	n/d	
Thompson <i>et al.</i> , 2000 [16]	i.v.	1	-	30	Wistar	60	168	n/d	0,91	n/d	n/d	
Nuestro estudio 2013	i.v.	3	30	50	Wistar	50	75	89	3	cerv-torax	No	
Thompson y Adlaka 1991 [34]	i.p.	1	-	50	SD	50	27	100	5	cerv-torax	n/d	
Thompson <i>et al.</i> , 1995 [36]	i.p.	1	-	50	SD	21	30	60	n/d	n/d	n/d	
Liska <i>et al.</i> , 2000 [24]	i.p.	2	60	50	SD	50	n/d	60-76	2	n/d	No	
Perse <i>et al.</i> , 2009 [35]	i.p.	2	63	50	SD	50	77	93,7	5	cerv-torax	Si	

Tabla 2: Comparación de protocolos y resultados obtenidos en trabajos anteriores con NMU. Se detallan los protocolos utilizados por cada autor, y sus resultados. Además se muestra el protocolo utilizado en nuestro trabajo junto con los resultados generados. SD: Sprague-Dawley. F344: Fisher 344. BUF/N: Buffalo female. n/d: no determinado.

Conclusiones

- ✓ Se obtuvo una incidencia tumoral del 89% en el total de animales tratados con 3 dosis de NMU vía i.v.
- ✓ En promedio aparecieron 3 tumores por animal, sobre todo entre los 30-70 días desde la 3ª dosis de NMU.
- ✓ Se establecieron 7 zonas de aparición de tumores, y el 80% del total de los tumores fueron encontrados en zonas 2, 3 y 5 correspondientes a las mamas de la zona cervical y torácica del animal.
- ✓ Para la zona 2 se encontró dos tipos de comportamientos para los tumores analizados, tumores de crecimiento rápido y lento. Los de rápido crecimiento se clasificaron como: adenocarcinoma quístico papilar infiltrante, carcinoma ductal infiltrante, carcinoma lobulillar *in situ* y adenoma quístico papilar infiltrante. Los de lento crecimiento se clasificaron como adenoma quístico papilar infiltrante.
- ✓ En zonas 3 y 5 los tumores tuvieron un crecimiento progresivo y similar a lo largo del tiempo y se clasificaron como adenocarcinoma quístico papilar infiltrante.
- ✓ Relacionamos la cinética de crecimiento de los tumores con la histología de los tumores analizados, observando que los tumores de crecimiento rápido (zona 2 de rápido crecimiento y zonas 3 y 5) fueron malignos y los tumores de crecimiento lento (zona 2 de lento crecimiento) fueron benignos.
- ✓ No se encontraron metástasis macroscópicas en los animales analizados.

Perspectivas

- ❖ Realizar la clasificación de los tumores que aún quedan por clasificar, para poder relacionar la cinética de crecimiento de tumores individuales con la histología de cada uno de ellos.

- ❖ Clasificar estos tumores con marcadores utilizados en la clínica mediante inmunohistoquímica:
 - receptor de estrógeno y progesterona (marcadores hormonales).
 - Her2 y Ki67 (marcadores de malignidad y proliferación celular).

Citas bibliográficas

- [1] **Vázquez T.**, Krygier G., Barrios E., Cataldi S., Vázquez Á., Alonso I.R., Estellano D.F. (2005). Análisis de supervivencia de una población con cáncer de mama y su relación con factores pronósticos : estudio de 1.311 pacientes seguidas durante 230 meses. *Revista Médica Uruguaya*, 21: 107–121.
- [2] **Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer (CHLCC)**. Incidencia mortalidad-principales causas 2005-2009. [Web en línea] Programa Vigilancia Epidemiológica. Registro Nacional de Cáncer. [Consulta: 10/05/2013] Disponible en: http://www.comisioncancer.org.uy/uc_209_1.html.
- [3] **PubMed Health, Breast Cancer Treatment (PDQ®)** [Web en línea] Última actualización: 15/05/2013. [Consulta 05/05/2013]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032825/>.
- [4] **Instituto Nacional del Cáncer**, EE.UU. Cáncer de seno. [Web en línea] Última actualización 03/05/2013. [Consulta 05/05/2013]. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno>.
- [5] **Breast Cancer.org**, EE.UU. [Web en línea] Última actualización 06/05/2013. [Consulta 10/05/2013]. Disponible en: <http://www.breastcancer.org>.
- [6] **American Cancer Society**, Inc. EE.UU. Breast Cancer [Web en línea] Última revisión: 26/02/2013. [Consulta 05/05/2013]. Disponible en: <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer>.
- [7] **Sturgeon C.M.**, Diamandis E.P., Hoffman B.R., Chan D.W., Hammond E., Hayes D.F. (2008). Use of Tumor Markers in Clinical Practice : Quality Requirements. *Clinical Chemistry*, 54:e1–10.
- [8] **Benavides F., Guénet J.** (2000). Modelos murinos de enfermedades humanas. *Medicina (Buenos Aires)*, 61(512): 215–231.
- [9] **Benavides F., Guénet J.** (2003) Manual de Genética de Roedores de Laboratorio. CAPÍTULO III Sistemática de los roedores utilizados en laboratorio. Universidad de Alcalá de Henares.
- [10] **Fanelli M.A.**, Vargas-Roig L.M., Gago F.E., Tello O., Lucero De Angelis R., Ciocca D.R. (1996). Estrogen receptors, progesterone receptors, and cell proliferation in human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 37(3):217-28.
- [11] **Mestas J., Hughes C.C.W.** (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(5): 2731–8.

- [12] **Cardiff R.D. (2001)**. Validity of mouse mammary tumour models for human breast cancer: comparative pathology. *Microscopy research and technique*, 52(2): 224–30.
- [13] **Russo I.H., Koszalka M., Russo J. (1991)**. Comparative study of the influence of pregnancy and hormonal treatment on mammary carcinogenesis. *British journal of cancer*, 64(3): 481–4.
- [14] **Huggins C.B., Ueda N., Wiessler M. (1981)**. N-Nitroso-N-methylurea elicits mammary cancer in resistant and sensitive rat strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(2): 1185–8.
- [15] **Frenkel K., Wei L., Wei H. (1995)**. 7,12-Dimethylbenza[a]anthracene induces oxidative DNA modification in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 19(3): 373-380.
- [16] **Thompson T.A., Haag J.D., Gould M.N. (2000)**. ras gene mutations are absent in NMU-induced mammary carcinomas from aging rats. *Carcinogenesis*, 21(10): 1917–22.
- [17] **Yu M., Snyderwine E.G. (2002)**. H-ras oncogene mutations during development of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-induced rat mammary gland cancer. *Carcinogenesis*, 23(12):2123–2128.
- [18] **Suh N., Glasebrook A.L., Palkowitz A.D., Bryant H.U., Burris L.L., Starling J.J., Pearce H.L., Williams C., Peer C., Wang Y., Sporn M.B. (2001)**. Arzoxifene, a New Selective Estrogen Receptor Modulator for Chemoprevention of Experimental Breast Cancer. *Cancer Research*, 61:8412-8415.
- [19] **Anzano M.A., Byers S.W., Smith J.M., Peer C.W., Mullen L.T., Brown C.C., Roberts A.B. (1994)**. Prevention of Breast Cancer in the Rat with 9- cis -Retinoic Acid as a Single Agent and in Combination with Tamoxifen. *Cancer Research*, 54:4614–4617.
- [20] **Belobrajdic D.P., McIntosh G.H. (2000)**. Dietary butyrate inhibits NMU-induced mammary cancer in rats. *Nutrition and Cancer*, 36(2):217-23.
- [21] **Hershman M.J., Habib N.A., Apostolov K., Barker W., Wood C.B. (1988)**. Alpha 2 interferon in the prevention of N-nitroso-methyl urea induced breast cancer in rats. *European Journal of Surgical Oncology*, 14(3):249-51.
- [22] **Gambini J.P., Cabral P., Fernandez M., Paolino A., Piuma L., Pacheco J.P. Alonso O. (2006)** 99mTc-Glucarato como radiotrazador de cáncer de mama inducido por nitrosometilurea en ratas. *Alasbimn Journal*, 8(31):8.

- [23] **Hill M.**, Bausero M., Mazal D., Ménoret S., Khalife J., Anegón I., Osinaga E. (2004). Immunobiological characterization of N -nitrosomethylurea-induced rat breast carcinomas: tumoral IL-10 expression as a possible immune escape mechanism. *Breast cancer Research and Treatment*, 84(2): 107–16.
- [24] **Liska J.**, Galbavy S., Macejova D., Zlatos J., Brtko J. (2000). Histopathology of mammary tumours in female rats treated with 1-methyl-1-nitrosourea. *Endocrine regulations*, 34(2): 91–6.
- [25] **Russo J.**, Russo I.H. (2000). Atlas and Histologic Classification of Tumors of the Rat Mammary Gland. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 5(2):187-200.
- [26] **Russo J.**, Gusterson B.A., Rogers A.E., Russo I.H., Wellings S.R., Van Zwieten M.J. (1990). Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Laboratory Investigation*, 62: 244--278.
- [27] **Wellings S.R.**, Jensen H.M., Marcum R.G. (1975). An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions. *Journal of the National Cancer Institute*, 55: 231-273.
- [28] **Gullino P.M.**, Pettigrew H.M., Grantham F.H. (1975) N-nitrosomethylurea as mammary gland carcinogen in rats. *Journal of the National Cancer Institute*, 54(2):401-14.
- [29] **Clifford W. Welsch.** (1985). Host Factors Affecting the Growth of Carcinogen-induced Rat Mammary Carcinomas: A Review and Tribute to Charles Brenton Huggins. *Cancer Research*, 45:3415-3443.
- [30] **Chan M.M.**, Lu X., Merchant F.M., Iglehart J.D., Miron P.L. (2005). Gene expression profiling of NMU-induced rat mammary tumors: cross species comparison with human breast cancer. *Carcinogenesis*, 26(8): 1343–53.
- [31] **Biología el ratón de laboratorio.** (1966). Esquema reportando la localización de las glándulas mamarias. McGraw-Hill, New York.
- [32] **Zabala M.**, Alzuguren P., Benavides C., Crettaz j., Gonzalez-Aseguinolaza G., Ortiz de Solorzano C., Gonzalez-Aparicio M., Kramer M.G., Prieto J., Hernandez-Alcoceba R. (2009). Evaluation of bioluminescent imaging for noninvasive monitoring of colorectal cancer progression in the liver and its response to immunogene therapy. *Molecular Cancer*, 8:2.
- [33] **Lynch's Medical Laboratory Technology.** (1976) Stanley S. Raphael. W.B.Saunders Company. Philadelphia-London-Toronto. Third Edition, Vol I: pagina 880.

- [34] **Thompson H.J., Adlakha H. (1991).** Dose-responsive Induction of Mammary Gland Carcinomas by the Intraperitoneal Injection of 1-Methyl-1-nitrosourea. *Cancer Research*, 51: 3411–3415.
- [35] **Perše M., Cerar A., Injac R., Štrukelj B. (2009).** N-methylnitrosourea Induced Breast Cancer in Rat , the Histopathology of the Resulting Tumours and its Drawbacks as a Model. *Pathology and Oncology Research*, 15: 115–121.
- [36] **Thompson H.J., McGinley J.N., Rothammer K., Singh M. (1995).** Rapid induction of mammary intraductal proliferations, ductal carcinoma in situ and carcinomas by the injection of sexually immature female rats with 1-methyl-1-nitrosourea. *Carcinogenesis*, 16(10):2407-11.
- [37] **Singh M., McGinley J.N., Thompson H.J. (2000).** A comparison of the histopathology of premalignant and malignant mammary gland lesions induced in sexually immature rats with those occurring in the human. *Laboratory investigation*, 80(2): 221–31.
- [38] **Clement Ip. (1996).** Mammary tumorigenesis and chemoprevention studies in carcinogen-treated rats. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 1(1): 37–47.
- [39] **Thompson H.J., Adlakha H., Singh M. (1992).** Effect of carcinogen dose and age at administration on induction of mammary carcinogenesis by 1-methyl-1-nitrosourea. *Carcinogenesis*, 13(9):1535-9.