

Tesis de Posgrado

Carcinogénesis mamaria murina por metilnitrosourea (MNU) y acetato de medroxiprogesterona (MPA)

Pazos, Patricia Adriana

1996

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Pazos, Patricia Adriana. (1996). Carcinogénesis mamaria murina por metilnitrosourea (MNU) y acetato de medroxiprogesterona (MPA). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2822_Pazos.pdf

Cita tipo Chicago:

Pazos, Patricia Adriana. "Carcinogénesis mamaria murina por metilnitrosourea (MNU) y acetato de medroxiprogesterona (MPA)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2822_Pazos.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

***CARCINOGENESIS MAMARIA MURINA POR
METILNITROSOUREA (MNU) Y
ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA (MPA)***

Autora:

Lic. PATRICIA ADRIANA PAZOS

Tesis presentada por la opción al título de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS.

Directores:

Dra. CLAUDIA L. M. LANARI y Dr. ALFREDO A. MOLINOLO

Realizada en:

División Medicina Experimental
Instituto de Investigaciones Hematológicas
Academia Nacional de Medicina

-

Instituto de Biología y Medicina Experimental

Palabras clave: *ratón, glándula mamaria, carcinogénesis mamaria, carcinogénesis hormonal y química, MNU, MPA*

1996, Buenos Aires, Argentina

UNIVERSITY OF BUENOS AIRES
SCHOOL OF SCIENCES

***MURINE MAMMARY CARCINOGENESIS BY
METHYLNITROSOUREA (MNU) AND
MEDROXYPROGESTERONE ACETATE (MPA)***

by:

PATRICIA ADRIANA PAZOS MSci

Thesis work presented to obtain a PhD degree in Biology

Directors:

CLAUDIA L. M. LANARI PhD and ALFREDO A. MOLINOLO MD, PhD

Division of Experimental Medicine
Institute for Hemathological Research
National Academy of Medicine

-
Institute for Experimental Biology and Medicine

Keywords: mice, mammary gland, mammary carcinogenesis, hormonal and chemical carcinogenesis, MNU, MPA

-
1996, Buenos Aires, Argentina

"Al principio todo es tinieblas..

De repente una puerta se entreabre dejando pasar un rayo de luz cegadora que ilumina sólo una parte del conocimiento.

Sin embargo, así como los ojos necesitan tiempo para percibir la totalidad del ambiente gracias a ese rayo de luz, así los hallazgos científicos deben ser acumulados gradual y penosamente para que la claridad de la luz no muestre solo el hecho central sino el conjunto del cual emerge.

La visión inicial aporta una exaltación incomparable pero su completa explotación significa años de duro y muchas veces tedioso trabajo.

Es la equilibrada combinación entre el entusiasmo inicial y la búsqueda metódica y prudente lo que define la creatividad científica del hombre".

G.J.V.Nossal.

Antibodies and Immunity.

Penguin Books, 1971.

—
"Existen dos clases de verdades, las verdades superficiales en las que queda evidente que lo contrario es incorrecto y las verdades profundas en las que lo contrario es igual de correcto".

Niels Bohr.

El Mundo de Sofía.

Ediciones Siruela, 1995.

A Alejandro
Efjaristó!

Este trabajo de tesis lo desarrollamos en la División Medicina Experimental de la Academia Nacional de Medicina y en el Instituto de Biología y Medicina Experimental. Muchas son las personas y otras instituciones que merecen mi gratitud y reconocimiento, ya que éste es el reflejo de un verdadero trabajo de equipo:

A la Dra. Claudia Lanari le agradezco profesionalmente, haberme permitido trabajar junto a ella, haberme enseñado como observa un investigador el mundo, cómo formularme correctamente una pregunta y cómo descubrir una respuesta cuando más de una vez los datos recolectados en océanos de papeles nublaban mi entendimiento. Personalmente, le agradezco ser tan compañera y estar siempre cerca de nosotras, sus becarias.

Al Dr. Alfredo Molinolo, por colaborar con muchísima paciencia en esta tarea de hacer de mí una persona crítica del universo que nos rodea, por (casi) templar como acero mi espíritu y demostrarme que la lucha diaria mantiene en forma 'cuerpo y alma', y que la ciencia es uno de los mejores campos de batalla.

A la Dra. Christiane Dosne Pasqualini, por haberme permitido el placer de trabajar bajo su tutela, por su estímulo y confianza.

A Fernanda, una amiga de aquellas... difícil de encontrar, una gran compañera con la que siempre pude trabajar hombro a hombro. Aprender, charlar y compartir cosas (buenas y de las otras) siempre me dejó una sensación cómoda y tan 'de familia' como una verdadera hermana. Y como era de esperar llegó otra hermana, Marina... Es realmente bueno que compartamos esta parte del camino.

Al Dr. Raúl Ruggiero por su generoso aporte de ideas y crítica discusión a lo largo de mi trabajo y por su invaluable colaboración en los ensayos de inmunogenicidad.

Muy especialmente a los Dres. Mirta Giordano y Martín Isturiz por su gentil disposición a ayudarme y asesorarme en los ensayos inmunológicos y a discutir los resultados recogidos.

A la Dra. María Teresa Santarelli por su clave colaboración en los estudios estadísticos de los resultados presentados en esta tesis.

A los Laboratorios Dr. Gador de Argentina por el suministro de hormonas usadas en este trabajo. Especialmente quiero recordar al Dr. E. Montuori por tantos años de cordial colaboración.

Al CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) y a la Fundación Alberto J. Roemmers por su aporte económico.

A TODOS los miembros de la División Medicina Experimental y muy particularmente:

Al Sr. Juan Portaluppi, nunca encontraré las palabras que necesito para agradecer todo lo bueno, importante y valioso que aprendí de esta bellísima persona, 'Gracias, Juancito'.

Al Sr. Antonio Morales por su invalorable e incondicional ayuda y su cálida compañía 'Grazie, caro compagno'.

A Fernando Benavides, por ser tan buen amigo y excelentísimo compañero de trabajo.

En la distancia y el tiempo recuerdo y agradezco a Edith Kordon su compañerismo allá, a principios de los noventa..

A Maruja, a Mimí y a toda la buena gente de la Biblio.

No quiero pecar de olvidadiza y agradezco nuevamente a los muchos integrantes de Mi Ex-Sección Leucemia Experimental.

Finalmente, a mi familia por apoyarme constantemente y nunca dejarme caer.

RESUMEN

En este trabajo de tesis presentamos un modelo experimental de carcinogénesis mamaria por MNU y MPA en el ratón BALB/c. En nuestro laboratorio ya se había desarrollado un modelo de inducción de adenocarcinomas mamarios por MPA, en el cual los tumores, que aparecen con una latencia mayor al año, son en su mayoría ductales, hormono-dependientes y expresan en su mayoría altos niveles de RE y RP. En este trabajo hemos desarrollado la caracterización de los tumores inducidos por MNU + MPA en cuanto a su morfología y hormono-dependencia. Además caracterizamos el rol de MPA como promotor tumoral y los efectos de la ovariectomía y de la sialoadenectomía en la inducción de tumores.

Hemos desarrollado las condiciones de dosis necesarias como para poder estudiar al carcinógeno MNU como un agente exclusivamente iniciador en el proceso de carcinogénesis mamaria y pudimos definir la acción de promotor tumoral del progestágeno MPA.

A partir de los experimentos aquí presentados, definimos también una acción específica del MPA que es previa a la iniciación, favoreciendo ya sea por modificación o por incremento en el número celular, la transformación neoplásica. A este efecto lo denominamos "permisividad".

Las experiencias realizadas en los animales ovariectomizados, demostraron la importancia de las hormonas ováricas. La ovx generó un patrón de atrofia mamaria evidenciable por la técnica de montaje total de las mamas y en este caso, la acción de MNU fue casi nula, lo que sugiere que éste ejerce su acción sobre una célula o grupo de células presente en una glándula sometida a estímulos hormonales. El MPA pudo suplir la ausencia de los ovarios debido quizá a su acción progestacional, elevando los valores de incidencia tumoral a niveles del control positivo.

Se obtuvieron resultados interesantes en el análisis del rol de las glándulas salivares en animales pretratados con MPA y MNU en la inducción tumoral. Registramos una significativa disminución en los valores de incidencia tumoral en aquellos animales tratados con MPA y sialo, frente a los controles intactos. Considerando que el MPA provoca un aumento de EGF sérico proveniente de las glándulas salivares y basándonos en datos previos de este efecto en el modelo de carcinogénesis mamaria por MPA, confirmamos también que el EGF también juega

un importante rol en el modelo de cocarcinogénesis MNU+MPA, probablemente afectando la fase de promoción.

Los tumores de mama surgidos en estos experimentos fueron clasificados como adenocarcinomas con distintos grados de metaplasia pavimentosa. Las diferencias histológicas tan marcadas entre los tumores inducidos por MNU y MPA y la mayoría de los tumores inducidos exclusivamente por MPA nos indujeron a definir estos fenómenos como tipos diferentes de carcinogénesis. La metaplasia pavimentosa fue un atributo exclusivo del MNU, siendo más evidente en los grupos expuestos a un mayor número de dosis de MNU. También fue evidente el la mayor incidencia de fenómenos metaplásicos en animales inoculados con MNU a los dos meses de MPA que a la semana. Todo lo analizado más datos previos nos inducen a pensar que existe una fuerte correlación entre la histología y el agente iniciador (en nuestro modelo MNU). Estudios de montajes de glándulas mamarias revelaron que la metaplasia pavimentosa precede al desarrollo de la lesión invasora.

Los estudios de parámetros biológicos confirman los resultados anteriores demostrando una diferencia muy notable entre ambos modelos experimentales. Como ya se mencionó anteriormente, si bien la mayoría de los inducidos por MPA son hormono-dependientes, todos los inducidos en estos experimentos salvo alguna excepción fueron tumores autónomos.

Nuevamente estos resultados nos llevaron a teorizar sobre posibles mecanismos de acción de las hormonas y el carcinógeno en los distintos grupos experimentales discutiendo la probabilidad de que ambos compuestos actúen sobre poblaciones celulares diferentes o si actuarían sobre la misma población de células madre induciendo diferentes cambios genéticos que las llevan a diferenciar en forma diferencial.

Por otra parte comprobamos que en este modelo de inducción tumoral, el MPA actúa como un verdadero promotor tumoral, eliminando la posibilidad que esta hormona favorezca la aparición de las neoplasias mamarias, por un mecanismo inmunosupresor hipotético, ya que el estado inmunológico de los animales tratados con ambas sustancias estaba en valores normales e inclusive superiores a los normales. Curiosamente hemos demostrado que el MPA produce una

muy fuerte inmunoestimulación, confirmando a su vez que este efecto es netamente hormonal y no un mero efecto adyuvante inespecífico ya que fue revertido por un antiprogéstágeno.

Por último hemos demostrado también por primera vez que el MPA y el MNU actúan como co-carcinógenos en el útero. Si bien el MPA y el MNU ambos inducen HGQ, los decíduomas sólo fueron inducidos en animales tratados con MPA en presencia o ausencia de MNU, pero en distintos protocolos en los cuales los animales han sido tratados por un tiempo con MPA se han observado algunos carcinomas de endometrio e hiperplasias epiteliales severas, no detectadas cuando los animales tuvieron un inóculo de MNU muy cercano al de MPA. También hemos demostrado que MNU induce un alto porcentaje de leucemias cuya incidencia fue mucho menor en los grupos pretratados con MPA.

En resumen, este modelo experimental si bien es interesante para dilucidar las funciones del MPA en el proceso de carcinogénesis no resulta un buen modelo de cáncer de mama humano ya que las características biológicas y morfológicas de los tumores son bastante diferentes a la mayoría de lo tumores humanos.

ABSTRACT

In this thesis we have put forward an experimental model of mammary carcinogenesis induced by MNU and MPA in BALB/c mice. In our laboratory a model of induction of mammary adenocarcinomas by MPA had been previously developed; tumors appeared with a latency of one year, being mostly ductal, hormone dependent and expressing in most cases high levels of ER and PR. In this project we have characterized the tumors induced by MNU + MPA regarding morphology and hormone dependence. We have also characterized the role of MPA as a tumor promotor and the effects of ovariectomy and sialoadectomy on tumor induction. Experiments were designed to evaluate the possible role of MPA as a modulator of mammary carcinogenesis by MNU. This was done by pretreating the animals with MPA.

Doses necessary to study MNU as an agent involved exclusively in the initiation of the carcinogenic process were found, and we were able to define the action of MPA as a tumor promotor.

The experiments presented herein enable us to define a specific action of MPA, which is previous to initiation, favouring neoplastic transformation, either by modifying or increasing the number of cells. We have called this a "permissive" effect.

The importance of ovarian hormones was proved in the experiments carried out in ovariectomized animals. Ovariectomy generated a pattern of mammary atrophy which was clearly seen in whole mounts. In this case the action of MNU was almost null suggesting that it is able to carry out its effects only on a cell or group of cells which have been under hormonal stimulus. MPA was capable of substituting the ovaries probably due to its progestational action, increasing tumor incidence to positive control values.

Interesting results were found in tumor induction when analyzing the role of the salivary glands in animals pretreated with MPA and MNU. A significant decrease in tumor incidence was found, compared to intact controls, in sialoadectomized animals treated with MPA. Taking into account the fact that MPA increases the levels of seric EGF generated

by the salivary glands, and considering previous results obtained in the model of mammary carcinogenesis by MPA, we confirm that EGF plays an important role in the model of co-carcinogenesis of MNU + MPA, probably affecting the promotion phase.

The mammary tumors induced in these experiments were classified as adenocarcinomas with various degrees of squamous metaplasia. The definite histologic differences found between tumors induced by MNU + MPA and those induced exclusively by MPA have made us consider these processes as two different types of carcinogenesis. The squamous metaplasia was an exclusive attribute of MNU, being more evident in those groups exposed to a greater number of MNU doses. An increase in the incidence of these lesions was also found in animals inoculated with MNU two months after treatment with MPA compared to those pretreated a week before. All this, together with previous results makes us think that there is a strong correlation between histology and the initiating agent (in our case we refer to MNU). Whole mount studies of mammary glands revealed that this squamous metaplasia precedes the development of the invasive lesion.

The study of biological parameters confirm our results showing a remarkable difference between both experimental models. As we have previously mentioned, although most tumors induced by MPA were hormone dependent, all those induced in these experiments, except for a couple of exceptions, were autonomous.

Once again our results have taken us to hypothesize over the possible mechanisms of action of the hormones and the carcinogen on the different experimental groups, arguing over the possibility that both compounds are acting on different cellular populations or, on the contrary, on a unique stem population but inducing genetic changes that lead to diverse routes of differentiation.

On the other hand, we have demonstrated in this model of tumor induction, that MPA acts as a real tumor promotor, eliminating the possibility that it could be acting through a hypothetic immunosuppressing mechanism that would favour the development of mammary tumors. The immunological state of animals treated with both compounds together were

equal, or even higher than those observed in normal controls. Curiously we have proved that MPA produces a strong immunostimulation, confirming as well that this effect is exclusively due to its action as a hormone and not to an inespecific adjuvant effect, because it was reverted by an antiprogesterone.

Finally we have also demonstrated, for the first time, that MPA and MNU act as co-carcinogens in the uterus. Although both MPA and MNU induce HGQ, deciduomas were only induced in animals treated with MPA in the presence or absence of MNU. However in various protocols in which animals were treated with MPA for some time, endometrium carcinomas and severe epithelial hiperplasias were observed. This was not so when MNU was inoculated shortly after MPA. We have also proved that MNU induces a high percentage of leukemia; however the incidence was much lower in groups pretreated with MPA.

INDICE

INTRODUCCION	1
I. Introducción a la Biología Tumoral	2
A. Tipos de crecimiento	2
B. Clasificación de neoplasias	3
C. Clasificación histogénica	3
D. Nomenclatura de neoplasias y su base embriológica	4
E. Relevancia del cancer en la población humana	4
II. Cáncer y hormonas	6
A. Cáncer de mama	7
1. Terapia hormonal del cáncer de mama	9
III. Modelos experimentales	11
A. Glándula mamaria del ratón	11
IV. Genes involucrados en la transformación maligna	13
A. Oncogenes y tumores de mama	15
V. Mecanismos carcinogénicos	17
A. Carcinogenesis física	18
B. Carcinogénesis viral	18
1. Relación entre virus y carcinomas mamarios	19
C. Carcinogénesis química	20
1. Nitrosamidas	22
a. Nitrosometilurea	23
(1) Características Generales	23
(2) Datos biológicos	24
(3) Reacciones químicas involucradas y mecanismos de acción:	25
(4) Factores que varían la respuesta tumoral	25
(5) Oncogenes activados por MNU	27
D. Carcinogénesis hormonal	28
1. Mecanismo de acción de hormonas esteroideas	28
2. Relación entre las hormonas esteroideas y el cáncer	29
a. Relación entre estrógenos y neoplasia	29
(1) Factores de crecimiento como mediadores de la acción estrogénica	30
b. Relación entre progestágenos y neoplasia	31
(1) Acetato de medroxiprogesterona (MPA)	33
(a) Características generales	33
(b) Usos clínicos	34
(c) Efectos carcinogénicos	35
i) en humanos	35
ii) en ratones	36

iii) en perros	36
iv) en ratas	36
VI. Antecedentes y origen de nuestro modelo experimental	37
OBJETIVOS	38
MATERIALES Y METODOS	39
I. Animales	9
II. Tratamiento hormonal	39
III. Tratamiento con MNU	40
IV. Tratamientos quirúrgicos	40
V. Experimentos de incidencia tumoral	40
A. Estudios histológicos	43
B. Evaluación de hormono-dependencia	43
1. Transplantes singeneicos	43
2. Medición de RP y RE	44
3. Respuesta a los estrógenos de los tumores transplantados	44
C. Caracterización de la inmunogenicidad de los tumores inducidos	45
VI. Determinación por radioinmunoanálisis de EGF en suero (EGF-S) en animales tratados con MPA	46
VII. Estudios inmunológicos: determinación del estado inmunológico de ratones tratados con MNU y MNU + MPA	46
A. Título de anticuerpos anti glóbulos rojos de camero (GRC)	46
1. Efecto de MNU y MPA	46
2. Caracterización del efecto progestacional del MPA en la respuesta inmune a través del antiprogestageno onapristona	47
3. Comparación entre el efecto del MPA administrado en forma de pellet y el inoculado como depósito de microcristales	47
B. Ensayo de hipersensibilidad retardada a antígenos de GRC	48
VIII. Estudios estadísticos	48
RESULTADOS	49
I. Evolución del peso de ratones tratados con distintos rotocolos de MNU y MPA . .	50
II. Morfología de las glándulas mamarias de ratones tratados con MNU o MNU y MPA (Montajes totales)	50
III. Adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA y MNU	62

A. Morfología	62
B. Incidencia tumoral e histología	75
1. Efecto promotor del MPA	79
a. Incidencia tumoral	79
b. Histología de los tumores	79
2. Efecto de la sialoadenectomía	82
a. Niveles de EGF en suero (EGF-S)	82
b. Montaje total de las glándulas mamarias de ratones tratados con MPA sialoadenectomizados o no	82
c. Incidencia tumoral	82
d. Histología de los tumores	85
3. Efecto de la ovariectomía en la inducción de tumores mamarios por MNU	85
a. Incidencia tumoral	85
b. Histología tumoral	86
4. Efecto de MNU en ratones expuestos temporalmente al MPA	86
a. Incidencia tumoral	86
b. Histología tumoral	88
C. Influencia del estadio del ciclo estral en el momento de la aplicación del carcinógeno sobre la incidencia tumoral	88
D. Caracterización de los tumores	90
1. Receptores hormonales	90
2. Hormono-dependencia	90
a. Sensibilidad al MPA	90
b. Sensibilidad a los estrógenos	93
3. Inmunogenicidad de tumores inducidos por MNU o MNU+MPA	93
IV. Lesiones uterinas inducidas por MNU y/o MPA	99
V. Otros tumores	108
VI. Estado inmunológico de los ratones tratados con MNU y/o MPA	111
A. Medición del título de anticuerpos anti glóbulos de carnero en ratones tratados con MNU, MPA y MNU+MPA	112
1. Respuesta primaria (7 días después del inóculo de GRC)	112
2. Respuesta secundaria (30 días después del inóculo de GRC)	112
B. Comparación entre la acción del MPA depot y MPA pellet	114
C. Efecto de un antiprogéstano sobre la estimulación inducida por MPA	114
D. Reacción de hipersensibilidad retardada	114
DISCUSION	119
CONCLUSIONES	137
REFERENCIAS	139

AP-1:	proteína reguladora de genes activos.
aFGF:	factor de crecimiento de fibroblastos, ácido.
bFGF:	factor de crecimiento de fibroblastos, básico.
DES:	dietilestilbestrol.
DMBA:	dimetilbenzantraceno.
E ₂ :	17 - estradiol.
EGF:	factor de crecimiento epidérmico.
GH:	hormona de crecimiento.
GRC:	glóbulos rojos de carnero.
H&E:	hematoxilina y eosina.
IGF I:	factor de crecimiento similar insulina tipo I.
IGF II:	factor de crecimiento similar insulina tipo II.
LDL:	lipoproteína de baja densidad.
LH:	hormona luteinizante.
LTR:	extremos repetitivos.
MMTV:	virus del tumor mamario murino.
MNU:	metilnitrosourea.
MPA:	acetato de medroxiprogesterona.
NGF:	factor de crecimiento derivado de neuronas.
onaP	onapristona.
OVX:	ovariectomía.
P:	progesterona.
PAI 1:	inhibidor del activador de plasminógeno.

PDGF:	factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PTK:	tirosina-quinasa.
R-EGF:	receptor del factor de crecimiento epidérmico.
RE:	receptor de estrógeno.
RP:	receptor de progesterona.
SHAM:	operación simulada de sialoadenectomía.
SIALO:	sialoadenectomía.
TEB:	brotos terminales mamarios.
TGF-alfa:	factor de crecimiento de transformación alfa.
TGF-beta:	factor de crecimiento de transformación beta.

INTRODUCCION

I. INTRODUCCIÓN A LA BIOLOGÍA TUMORAL.

De acuerdo a la definición de Willis, una **neoplasia** es "una masa anormal de tejido cuyo crecimiento excede el de los tejidos normales que no está coordinado con estos mismos y que persiste en la misma manera excesiva después de cesar el estímulo que desencadenó el cambio". La tasa de división celular en los tejidos neoplásicos puede ser más lenta que su contraparte normal o tan rápida como en tejidos embrionarios. La proliferación neoplásica, como lo indica la palabra tejido en su definición, está restringida sólo a organismos multicelulares (Robbins S.T., 1989).

A. *Tipos de crecimiento*

- Hiperplasia:** Es el proceso que conduce a un aumento en el **número** de células de un tejido. Si bien la mayoría de los tumores malignos se encuentran asociados a un aumento del número de células, ésto no es una característica o un requerimiento absoluto en el desarrollo de una neoplasia. Ejemplos son las hiperplasias compensadoras que aparecen en ciertos órganos como el hígado, como respuesta a la falta de masa luego de exéresis parciales.
- Hipertrofia:** Es el proceso que conduce a un aumento en el **tamaño** de las células que constituyen un tejido, pero no se asocia a un aumento en el número de células. Un ejemplo típico es la hipertrofia muscular de los atletas.
- Displasia:** Es una alteración de la **maduración** normal de un tejido que se expresa por alteraciones morfológicas y funcionales de las células adultas y se asocia a variaciones en el tamaño, forma, organización y patrones de maduración.
- Anaplasia:** Se define como tal a un conjunto de alteraciones morfológicas celulares graves caracterizadas por marcada variación en el tamaño y morfología nucleares, alteraciones de los patrones de coloración típicos, cambios en la morfología, tamaño y número de nucléolos, inversión de la relación núcleo-citoplasmática, disminución marcada o desaparición de los patrones morfológicos de diferenciación y/o maduración, que caracterizan ciertos tumores malignos.
- Neoplasia:** Se puede resumir como un crecimiento relativamente autónomo de tejido.

El término **cáncer** se utiliza para indicar un proceso con las características biológicas de una neoplasia maligna, mientras que la palabra **tumor** denota una masa tisular fácilmente distinguible del crecimiento fisiológico normal. Tanto en la clínica como en la investigación se utilizan como sinónimos los términos cáncer y neoplasia maligna. Las diferencias entre tumores malignos y benignos se describen a continuación.

B. Clasificación de neoplasias

Estas pueden clasificarse como benignas o malignas. Las principales características de ambos tipos son las siguientes:

Benignas	Malignas
Encapsuladas.	No encapsuladas.
No invasoras.	Invasoras.
Altamente diferenciadas.	Pobrementemente diferenciadas.
Pocas mitosis y típicas.	Mitosis atípicas.
Crecimiento lento.	Crecimiento rápido.
Sin anaplasia.	Anaplasia variable.
No generan metástasis.	Con metástasis (variable).

La diferencia esencial entre los dos tipos es que una neoplasia benigna, por definición, no tiene capacidad de invadir ni dar metástasis, mientras que una maligna invade tejidos adyacentes y puede originar metástasis. Una **metástasis** se define como un crecimiento secundario de un tumor primario que crece en una localización distinta a la de éste (Robbins S.T., 1989).

C. Clasificación histogénica

Las neoplasias pueden agruparse de acuerdo a los tipos de tejidos de los cuales surgen. Ritchie agrupó las neoplasias en base a su origen histogénico (Ritchie A.C., 1978):

1. Neoplasias de epitelios.
2. Neoplasias de tejido conectivo.

3. Neoplasias del sistema inmune y hematopoyético.
4. Neoplasias del sistema nervioso.
5. Neoplasias de origen celular histogénico múltiple.
6. Neoplasias varias.

Los tumores pueden adquirir un nombre compuesto formado por la designación del tejido del cual surgió la neoplasia y agregar un término descriptivo tal como papilar, quístico, folicular, etc.; por ejemplo: carcinoma lobulillar de mama.

D. Nomenclatura de neoplasias y su base embriológica

Los tumores **benignos** se nombran utilizando un prefijo que designa el tejido del cual surgió la neoplasia y el sufijo *oma*. Por ejemplo una neoplasia benigna de un tejido glandular es un adenoma. Se utilizan en algunos casos características morfológicas de la neoplasia y se hace referencia al tejido de origen, por ejemplo: papiloma de células transicionales. Las neoplasias **malignas** se dividen en dos categorías de acuerdo a su origen embriológico (Ritchie A.C., 1978; Robbins S.T., 1989):

Sarcomas: tumores originados en estructuras de origen mesodérmico. Ejemplo: Fibrosarcoma.

Carcinomas: estructuras derivadas del endodermo o del ectodermo. Ejemplo: adenocarcinoma de mama.

Excepciones de esta regla son los **linfomas**, neoplasias malignas del tejido linfático y los **melanomas**, tumores malignos de los melanocitos.

E. Relevancia del cáncer en la población humana

En los Estados Unidos desde los años '80, alrededor de un 22% del total de los decesos son por causa del cáncer (Robbins S.T., 1989), valor sólo superado por las enfermedades cardiovasculares. En 1990, la American Cancer Society predijo que alrededor del 30% de los americanos desarrollarían alguna forma de esta enfermedad en los próximos 10 años. Distintos estudios estadísticos a nivel mundial han determinado que la distribución de cánceres fatales en la población humana tiene el siguiente orden de frecuencia (Anderson P., 1989):

- 1°. Cáncer de estómago, con mayor incidencia en el continente asiático.
 - 2°. Cáncer de pulmón, con fuerte aumento en la incidencia por el elevado consumo de tabaco en los países en desarrollo.
 - 3°. Cáncer de mama, principalmente en la población occidental.
 - 4°. Tumor de colon y recto, afectando fundamentalmente a la población anciana del mundo.
- Entre la población infantil mundial, la más común de las neoplasias es la leucemia.

Si bien el número de muertes por cáncer en la población del mundo está en aumento, probablemente a causa de un aumento en la vida media, el número de muertes entre aquellos pacientes menores de 30 años está disminuyendo a causa del marcado desarrollo en drogas, métodos terapéuticos y a los programas de prevención.

En la Argentina el cáncer es la segunda causa de muerte desde 1960. La mayor tasa de mortalidad por tumores malignos en la población femenina es la de origen mamario abarcando mujeres en período fértil y durante la menopausia (Ustarán J. y col., 1988). El cáncer de mama se encuentra en primer lugar entre mujeres de 55 a 64 años; estos resultados son similares a los hallazgos de otros estudios realizados en el país (Sobel N. y col., 1984) y en el exterior (Harris N. y col., 1982; Helmrich S. y col., 1983).

II. CANCER Y HORMONAS

Distintos estudios epidemiológicos en humanos han demostrado la existencia de una relación entre ciertas hormonas y la aparición de determinado tipo de cánceres (Siiteri P. y col., 1980; Dockerty M. y col., 1951; Antunes C. y col., 1979). En el carcinoma de endometrio, los estrógenos están directamente involucrados en su génesis; entre los factores de riesgo estudiados se encuentran: la diabetes mellitus, la obesidad, la nuliparidad, tratamientos estrogénicos prolongados y tumores ováricos secretores de estrógenos (Kurman R. y col., 1987). En las obesas se observa síntesis periférica de estrógenos en el tejido adiposo a partir de andrógenos adrenales y una disminución de los niveles de proteínas transportadoras de hormonas sexuales, incrementando así los niveles séricos de estrógenos libres. La nuliparidad está asociada a prolongados períodos de estimulación estrogénica sin la actividad intermitente, supuestamente protectora, de la progesterona.

También se ha asociado el consumo de anticonceptivos hormonales (estrógenos y progestágenos) con la aparición de otro tipo de neoplasias aparentemente no relacionados a tejidos hormono-dependientes, como por ejemplo, adenomas hepáticos y raramente hepatocarcinomas (Pitot H., 1978). El caso más notable fue el del dietilestilbestrol (DES), un estrógeno sintético no esteroide, suministrado en terapias de prevención de abortos espontáneos, que indujo una alta incidencia de una forma especial de cáncer de vagina (adenocarcinoma de células claras) en las hijas de mujeres tratadas (Herbst A. y col., 1971).

En los hombres, el desarrollo del **cáncer de próstata** depende de la presencia de andrógenos como la testosterona. La ausencia de este tipo de cáncer en eunucos y en pacientes con cirrosis confirman esta observación (Moore R., 1944). En estos últimos, los niveles de estrógenos séricos son superiores a lo normal por fallas de la metabolización hepática, inhibiendo la secreción de hormona luteinizante (LH) y, consecuentemente, de testosterona (Sutherland D., 1987).

El **cáncer de mama** es otro de los claros ejemplos de relación entre hormonas y cáncer. Nuevamente en esta patología las principales evidencias de la participación hormonal se obtuvieron de datos epidemiológicos.

A. *Cáncer de mama*

El cáncer de mama es inicialmente una enfermedad local que se extiende luego por vía linfática a los ganglios vecinos, para diseminarse a partir de allí, por vía hemática a otros órganos. El sistema utilizado para la estadificación de este tipo de neoplasia se basa en la extensión del tumor, el compromiso de los nódulos linfáticos y la presencia de metástasis (Harris J. y col., 1992).

El carcinoma *in situ* está caracterizado por la proliferación de células con fenotipo maligno dentro de los conductos y lóbulos mamarios sin invasión del estroma adyacente. Dependiendo de su localización se pueden catalogar como **ductales** o **lobulillares**. El carcinoma ductal *in situ* tiene típicamente distribución segmental (similar a aquellos cánceres invasivos con un componente intraductal extenso) y comúnmente está involucrado el pezón y la región subareolar. Los carcinomas lobulares *in situ* se caracterizan por la proliferación sólida de células pequeñas dentro del lóbulo de la mama y ocasionalmente dentro de los conductos. Las células tienen núcleos pequeños, uniformes y de forma redondeada a oval. Este tipo de carcinoma suele carecer de características distintivas en la clínica y en el examen mamográfico. En general es un hallazgo en glándulas mamarias estudiadas por otros motivos (displasias, etc.) y se encuentra frecuentemente en mujeres premenopáusicas.

Los carcinomas invasores de mama constituyen un grupo de lesiones histológicamente heterogéneo. La mayoría son adenocarcinomas ductales o lobulillares y se clasifican en base a su imagen microscópica. Los de origen ductal son el tipo más común y abarcan el 75% de los estudiados; comúnmente metastatizan en nódulos linfáticos axilares, hueso, pulmón, hígado y cerebro. Los adenocarcinomas lobulillares son relativamente poco comunes y su incidencia es de alrededor del 5-10%, están compuestos por células pequeñas con un rearreglo en "fila india" con tendencia a crecer alrededor de los conductos y los lobulillos; también afectan a los nódulos axilares y metastatizan muy frecuentemente las superficies serosas y meníngeas, como también otros sitios inusuales. Cuando se diagnostica clínicamente la diseminación metastásica del cáncer de mama, generalmente la muerte ocurre dentro de los 3 a 4 años siguientes (Harris J. y col., 1992a).

La etiología del cáncer de mama es objeto de numerosas investigaciones y aún permanecen sin aclararse muchos de los mecanismos involucrados. A pesar de haberse identificado algunos factores de

riesgo, no siempre es fácil tomar medidas preventivas. Estos factores pueden ser agrupados en: genéticos, hormonales y ambientales. El cáncer de mama es uno de los cánceres donde la historia familiar (carga genética), es un factor de predisposición relevante (Vorherr H. y Messer R., 1978; Harris J. y col., 1992). Los factores hormonales que aumentarían el riesgo de cáncer de mama están encabezados por los estrógenos. Esta preponderancia del estrógeno se ve sustentada por estudios realizados en la población femenina mundial, que postulan como mecanismos favorecedores de transformación (Vorherr H. y Messer R., 1978; Pike M. y col., 1983):

menarca temprana.

menopausia tardía.

edad avanzada para el primer embarazo.

dar a luz sin amamantamiento posterior o períodos de amamantamiento muy cortos.

nuliparidad y/o fallas en la ovulación.

hiperprolactinemia.

obesidad.

diabetes mellitus.

dietas ricas en grasas y proteínas.

tratamientos prolongados con dosis farmacológicas de estrógenos.

Si bien no existen evidencias concluyentes de la relación entre las hormonas endógenas y la aparición y desarrollo del cáncer de mama (Toniolo P. y col., 1991), éstas se consideran importantes factores de riesgo fundamentalmente durante el período fértil de la mujer. A pesar de que el grueso de las evidencias apuntan a los estrógenos como principales responsables, se ha sugerido últimamente que la progesterona puede tener importancia en el proceso de malignización de la glándula; las siguientes observaciones estarían relacionadas con dicho riesgo:

un comienzo temprano de los ciclos ovulatorios regulares.

los anticonceptivos orales combinados de estrógenos y progesterona en mujeres jóvenes.

la inoculación del anticonceptivo de acción prolongada, por ejemplo el acetato de medroxiprogesterona depot.

la terapia conjunta de progestágenos y estrógenos en la menopausia (Thomas D., 1991).

Dentro de los factores ambientales se encuentra la elección del estilo de vida y el componente dietario. Los factores ambientales de una enfermedad determinan, por ejemplo, que existan variaciones

importantes en la incidencia de cáncer de mama en los distintos países (WHO, 1984). Las tasas de incidencia son 6 veces más altas en los EEUU, Canadá o el Norte de Europa que en Asia o África negra. Estas diferencias no parecen estar determinadas por una variación en la susceptibilidad genética (Haenzel W. y Kurihara M., 1968) ya que se ha encontrado que las incidencias de cáncer de mama de las norteamericanas de raza negra y raza blanca son muy similares entre sí (60.1 y 62.3 casos por 100000 respectivamente) y a su vez diferentes de la raza negra africana (3 casos por 100000) (Harris J. y col., 1992a). El mismo patrón se encontró entre mujeres japonesas que migraron a Hawái y a California que poseen una mayor incidencia que las mujeres del Japón (Buell P., 1973; Dunn K., 1977). Las japonesas nativas que migran a los EEUU siendo jóvenes adultas muestran un incremento pequeño de las tasas de cáncer de mama, mientras que en las hijas que han nacido en los EEUU la incidencia se aproxima a las de sus compatriotas de raza blanca. Esto sugiere que el riesgo de cáncer de mama estaría ligado a factores del medio que inciden durante las primeras etapas de vida (Henderson B. y Bernstein L., 1991). Respecto de la dieta, la mayoría de los estudios muestran que la obesidad está asociada con el riesgo de tener cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas (Thomas D.B., 1991).

La problemática actual sobre el cáncer de mama está centrada en la incapacidad para identificar los agentes etiológicos y lograr controlarlos; y una vez establecida la neoplasia, la imposibilidad de llevar a cabo una destrucción selectiva de las células cancerosas en los pacientes con la enfermedad diseminada (Vorherr H. y Messer R., 1978). Por el momento la estrategia de control se basa en mejorar la sobrevida a través de un diagnóstico prematuro y un mejor tratamiento de la enfermedad. Sin embargo, aún este tipo de estrategia no ha logrado ser suficientemente efectiva ya que las tasas de mortalidad no han disminuído en los últimos 15 años (LeMarchand L., 1991).

1. Terapia hormonal del cáncer de mama

Hasta principios de la década del setenta el tratamiento para el cáncer de mama era la extirpación quirúrgica de la glándula mamaria, luego desplazada por la tumorectomía y como complemento la aplicación de radioterapia sin ninguna terapia adyuvante. La detección de receptores estrogénicos (RE) determinó un blanco de acción para tratamientos endócrinos y posteriormente para la utilización de antiestrógenos como agentes terapéuticos. La probabilidad de que los tumores primarios de mama expresen RE y RP se incrementa con la edad de la paciente y se asocia con un

mejor pronóstico pues determina la capacidad del tumor para responder a la terapia hormonal (Harris J. y col., 1992b). Clásicamente el tratamiento endócrino primario para las mujeres premenopáusicas era la ovariectomía, en cambio para las que habían atravesado la menopausia, era la administración de andrógenos o de dosis farmacológicas de estrógenos en cánceres de mama avanzados (Vorherr H. y Messer R., 1978). Actualmente este tipo de procedimientos quirúrgicos se usan cada vez menos y se da prevalencia a las terapias hormonales: antiestrógenos, dosis altas de progestágenos y aminoglutetimida (inhibidor de aromatasa o estrógeno sintetasa) (Muss H., 1992).

El tamoxifeno es el antiestrógeno no esteroideo de mayor difusión en el tratamiento del cáncer de mama. Se utiliza en el tratamiento de pacientes pre y postmenopáusicas en todos los estadios de la enfermedad. Se administra como paliativo a mujeres con cáncer avanzado y también como terapia adyuvante seguida por cirugía (Wolf D.M. y col., 1993). Se postula que inhibe el crecimiento tumoral por bloquear competitivamente la unión de los estrógenos a su receptor (Osborne C.K. y col., 1994).

Los tratamientos de larga duración (entre 3 y 5 años) con tamoxifeno en pacientes postmenopáusicas tienen beneficios adicionales tanto en sobrevida como en calidad de vida, ya que esta droga posee un efecto estrogénico parcial, ayudando a mantener la densidad ósea, protegiendo de infartos de miocardio y reduciendo los niveles de colesterol circulante por generar una disminución en la lipoproteína de baja densidad (LDL) (Jordan V., 1995). Entre los efectos adversos del tamoxifeno podemos enumerar retinopatías, disminución de la antitrombina III, tromboembolias, sequedad vaginal, un aumento probable en la incidencia de carcinomas hepáticos y un incremento de carcinomas de útero (Jordan V., 1994).

Los pacientes con enfermedad avanzada presentan una respuesta favorable al tamoxifeno por períodos que pueden ir de semanas a años pero, lamentablemente, su efecto citostático es temporal ya que finalmente todos los cánceres de mama avanzados experimentarán progresión durante el tratamiento, fenómeno conocido como *resistencia* al tamoxifeno. Entre el 35 y 60% de estas pacientes pueden responder favorablemente a una segunda o tercera línea de tratamiento endócrino mientras que el resto no responde a ningún tipo de terapia hormonal y son tratadas con quimioterapia citotóxica (Wolf D.M. y col., 1993). La causa principal del desarrollo de resistencia

al tamoxifeno puede ser la pérdida de RE y estos tumores serán refractarios a todo tipo de terapia endócrina.

La aplicación generalizada de la terapia con antiestrógenos ha llevado al desarrollo y estudio de nuevos antiestrógenos con propiedades farmacológicas diferentes. Se espera que estos compuestos aumenten la duración del tratamiento sin desarrollar enfermedad y que disminuyan los problemas toxicológicos. Actualmente se utilizan toremifeno y droloxifeno (derivados del tamoxifeno) en protocolos clínicos en Estados Unidos para el tratamiento de cáncer de mama avanzado en pacientes postmenopáusicas. En Inglaterra se está probando el nuevo antiestrógeno puro ICI 182,780 que probablemente será el más efectivo en terapias de segunda línea (Brown M., 1994).

Los antiestrógenos de la familia del tamoxifeno son agonistas parciales del estradiol, capaces de unirse a su receptor y de iniciar la transcripción de algunos genes regulados por E_2 . Los antiestrógenos llamados puros no poseen esta capacidad y esta diferencia es la que posibilita que en terapia estos últimos sean la alternativa cuando se desarrolla resistencia al tamoxifeno (Jordan V., 1994). El hecho de que no posean ese efecto estrogénico sobre el tumor y útero es positivo, pero, por otra parte, no poseen los efectos beneficiosos adicionales que hacen que el tamoxifeno siga siendo la droga de elección en una terapia de primera línea.

III. MODELOS EXPERIMENTALES.

La posibilidad de disponer de cepas endocriadas de ratones en las cuales se pueden mantener los tumores por pasajes singeneicos, ha permitido grandes avances en el campo de la oncología experimental. Con ratas también se han realizado numerosas investigaciones sobre todo en el campo de la carcinogénesis química y en la inducción de tumores mamarios.

A. Glándula mamaria del ratón

El ratón posee diez glándulas mamarias, con cinco pezones a cada lado del cuerpo del animal. Sus glándulas yacen en el tejido adiposo subcutáneo. La nomenclatura topográfica de las mamas

es: cervicales, 1ª y 2ª torácica, abdominales e inguinales (Dexter T. y col., 1978).

En ratones hembra recién nacidos, el parénquima mamario está formado por un cordón de células epiteliales conectadas al pezón por un conducto primario simple (Dexter T. y col., 1978; Russo I. y col., 1987; Russo I. y Russo J., 1991). El incipiente conducto mamario está parcialmente canalizado y posee 3 ó 4 ramificaciones. Se ha descrito que los conductos en este estadio están formados por 2 ó 3 capas de células epiteliales en las cercanías del pezón. Durante las primeras 3 semanas de vida, los conductos mamarios se elongan y ramifican, mostrando crecimiento isométrico. El crecimiento que ocurre durante este período parece ser dependiente del ovario y es abolido como respuesta a la castración. El tejido adiposo representa el sustrato obligatorio para la subsecuente morfogénesis mamaria, interaccionando con el epitelio siguiendo patrones específicos de desarrollo.

La madurez sexual en ratones se alcanza entre las 4 y 6 semanas de edad. A las 3 semanas los brotes terminales reaparecen y aumentan tanto la tasa de crecimiento como la ramificación. Los brotes terminales son los puntos de control regulatorio que determinan la ramificación, los cambios y los patrones de formación. La conducta de los brotes terminales está influenciada por: 1) hormonas sistémicas que aportan estimulación del crecimiento y 2) hormonas locales que son señales regulatorias a nivel del tejido que gobiernan la dirección del crecimiento y pueden causar la regresión de los brotes terminales. Estas señales causan el crecimiento o lo detienen si se alcanzan los límites del tejido adiposo. Los brotes terminales se visualizan fácilmente *in situ* utilizando la técnica del montaje total. Alcanzan un tamaño de 0.1 a 0.5 mm de diámetro. Un conducto largo está formado por 4 a 6 capas de epitelio cúbico. Las células de la superficie que da a la luz poseen microvellosidades y complejos laterales de unión (Gehring U., 1988). Las células son muy diferentes en la superficie basal de los brotes terminales. Las 'cap cells' tapizan la zona por debajo de la lámina basal. Estas células se distinguen de otros tipos celulares porque no están diferenciadas, su citoplasma no está polarizado, no poseen un citoesqueleto organizado y no poseen adherencia celular. Se ha sugerido que las 'cap cells' son una población de células *stem* pluripotenciales capaces de diferenciarse tanto en células ductales como en mioepiteliales. Siguen lateralmente a las 'cap cells' células mioepiteliales que recubren los conductos. Estos están compuestos por dos tipos principales de células, las de la región de los conductos mamarios, dispuestas en capas de espesor variable, y las células mioepiteliales debajo de la lámina basal. La

mayoría de los conductos terminales está formado por una única capa de células ductales. La lámina basal es sintetizada por las 'cap cells' en los brotes terminales y por las células mioepiteliales en los conductos. La punta de los brotes terminales puede considerarse una lámina en expansión. Es rica en ácido hialurónico, el que podría servir para reducir la adhesión cuando los brotes terminales invaden la glándula mamaria.

IV. GENES INVOLUCRADOS EN LA TRANSFORMACIÓN MALIGNA.

El cáncer es el resultado de una serie de eventos o accidentes genéticos aleatorios que están sujetos posteriormente a selección natural. En ningún caso un mismo tipo de enfermedad oncológica puede ser genéticamente idéntica. Sin embargo, para cada tipo de célula existe un determinado espectro de variantes que permite la desregulación de la proliferación. De hecho, se han identificado un determinado conjunto de genes cuyos cambios están relacionados con el comportamiento de una célula cancerosa. La identificación y caracterización de muchos de estos genes se ha logrado en el campo de la biología molecular del cáncer (Weinberg R., 1983; Cooper G., 1990).

La proliferación puede ser modulada por dos caminos: uno es el que directamente determina la entrada en el ciclo de división celular y el otro es a través de la regulación de la entrada a la diferenciación celular o a la muerte celular programada o apoptosis (Alberts B. y col., 1994). Existirían dos vías para la inducción de proliferación descontrolada:

- a) la transformación de un gen estimulador en hiperactivo; este tipo de mutación tiene un efecto dominante pues una sola de las dos copias del gen en la célula necesita ser modificada. A este tipo de genes se los denomina genéricamente **oncogenes**.
- b) la segunda opción es la inactivación de un gen inhibitorio, en este caso ambas copias deben ser inactivadas o eliminadas para liberar a la célula de la inhibición. Estos genes son los llamados **genes supresores de tumor** siendo los más estudiados el gen del retinoblastoma, **Rb** y el **p53**; ambos juegan roles en el control de la división celular.

Han sido identificado más de 60 oncogenes y la mayoría de ellos derivan de genes celulares normales denominados **proto-oncogenes**. Estos son vitales para los procesos celulares normales pero pueden ser alterados y transformarse en oncogenes.

La nomenclatura para diferenciar los oncogenes de origen viral de los celulares se basa en el agregado de una *v* minúscula en el primer caso o una *c* en el segundo, delante de la sigla el proto-oncogen o del oncogen, por ejemplo: *v-src* o *c-src* (Weinberg R., 1983; Cooper G., 1990).

Las proteínas codificadas por oncogenes pueden afectar los sistemas de control de crecimiento en varios niveles. La mayoría se pueden agrupar en cuatro tipos o clases (Cooper G., 1990):

- a) *Clase I - Factores de crecimiento:* el ejemplo clásico es el oncogen *sis*, que codifica para la cadena beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). La activación de este oncogen puede inducir la transformación de células que expresen receptores para este factor.
- b) *Clase II - Receptores de hormonas o factores de crecimiento:* estos receptores se vuelven transformantes cuando son mutados a una forma constitutivamente activa aún en ausencia del ligando. Un ejemplo es la proteína receptor *neu* o *erbB-2* relacionada con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (R-EGF).
- c) *Clase III - Transductores intracelulares:* son aquellas moléculas que carecen de dominios transmembrana cuya función es transmitir las señales desde la unión de un ligando a su receptor hasta el núcleo. Muchos de estos oncogenes codifican proteínas con actividad de tirosina-quinasa (PTK), como por ejemplo los oncogenes *src* y *abl*.
- d) *Clase IV - Factores de transcripción nuclear:* las moléculas sintetizadas por estos oncogenes actúan directamente sobre las funciones nucleares. Uno de los mejor documentados es el *jun* que da origen a una parte del factor de transcripción llamado AP-1 que se une a una secuencia encontrada en promotores de muchos genes; la otra parte del AP-1 es el oncogen *fos* que se une a la proteína *jun*.

Los mecanismos de activación de proto-oncogenes son diversos: deleciones o mutaciones puntuales dentro de la secuencia codificante (*H-ras*, *K-ras*), inserciones virales en el genoma celular (*int-1*), amplificación génica (*myc*, *c-erbB-2*) o rearreglos cromosómicos cerca de un fuerte promotor

transcripcional (*abl*, *myc*) (Varmus H., 1989).

A. Oncogenes y tumores de mama

Se ha involucrado al gen *ras* en la inducción de adenocarcinomas mamarios murinos por agentes químicos, en líneas celulares y en tumores primarios de cáncer de mama. Su actividad oncogénica ha sido asociada con mutaciones puntuales, pérdida de heterocigosis y amplificación génica (Bishop J.M., 1987; Zarbl H. y col., 1985). Los productos de este gen son proteínas ligadoras de nucleótidos de guanina que están involucrados en la transducción de señales (McCormick F., 1989).

Han sido identificados 6 loci de la familia de los *Ints*: *Wnt1*, *Int2*, *Int3*, *Wnt4*, *Hst/k-FGF* e *Int6* en adenocarcinomas mamarios de ratones que son activados por el virus del tumor mamario murino (MMTV) (Callahan R. y col., 1993; Marchetti A. y col., 1995). Excepto en el caso del *Int3*, el virus activa la expresión de estos genes como consecuencia del efecto de sus secuencias "enhancers" que, al integrarse en el genoma del promotor transcripcional del gen *int* adyacente, lo activa. Los genes *Wnt* codifican proteínas que están involucradas en la comunicación entre células. El *Int2* y *hst/K-FGF* son miembros de la familia del factor de crecimiento fibroblástico (FGF). En el caso del *Int3*, la proteína que resulta es una quimera entre una porción del genoma viral y las secuencias celulares adyacentes. En general la activación de solo uno de estos genes no es suficiente para transformar el epitelio mamario, hacen falta además otras mutaciones somáticas. En el 20% de los tumores mamarios humanos también se han descrito amplificaciones del *Int2* que, curiosamente, en algunos casos se vio también que está coamplificado con el *hst* (Yoshida M.C. y col., 1988).

Los miembros de la familia del gen *myc* son activados en distintas neoplasias por mutación insercional, traslocación cromosómica o amplificación de DNA. Las proteínas codificadas por estos oncogenes actuarían como reguladores transcripcionales aunque también se postula que podrían regular el procesamiento de mRNA. En cáncer de mama la amplificación de *c-myc* está correlacionada con la progresión a estadios más malignos (Escot C. y col., 1986).

El potencial transformante del gen *erbB-2* humano puede comprobarse por mutaciones puntuales

en ratones transgénicos o por sobreexpresión en células NIH-3T3; es homólogo del *neu* murino, y se evidencia en el 20% de los carcinomas de células de los conductos mamarios, en el 50% de los carcinomas *in situ* y en el 100% de la enfermedad de Paget de mama (Lupu R. y Lippman M., 1993). En general su expresión se relaciona con un mal pronóstico y está fuertemente involucrado con la señalización y amplificación de la vía del oncogen *ras* (Janes P. y col., 1994; Colomer R. y col., 1994). Codifica una proteína receptor en la superficie celular y posee dos ligandos aislados: uno es una glicoproteína de 30 kDa que induce diferenciación y el otro es una proteína de 75 kDa que estimula la proliferación y formación de colonias en células que sobreexpresan el receptor (Bacus S. y col., 1992; Lupu R. y col., 1992).

Se ha encontrado en un muestreo de varios tumores de mama un aumento constitutivo de la proteína producto del oncogen *raf*. Estos productos, que se encuentran como proteínas citoplasmáticas solubles, actuarían en la transducción de señales desde la membrana al núcleo. Las alteraciones moleculares que convierten a estas proteínas en oncogénicas, serían deleciones en las secuencias regulatorias de la región amino terminal resultando en activación constitutiva del dominio proteína-quinasa (Hynes N. y col., 1992).

Existe una familia de genes, los *nm23*, cuya expresión estaría inversamente relacionada a la capacidad invasiva del tumor. Esto se ha demostrado tanto en adenocarcinomas murinos como en humanos. Son proteínas que poseen actividad nucleósido difosfato quinasa y actuarían como genes supresores aunque todavía no se conoce su mecanismo de acción (Steeg P.S. y col., 1993).

Los cambios en el gen supresor *p53* son las alteraciones más frecuentemente encontradas en distintas neoplasias, incluyendo el cáncer de mama. El 15-50% de los cánceres de mama contienen alguna alteración en el *p53* dependiendo del estadio o método de detección, y, como ocurre en otras neoplasias, los estadios menos invasivos tienen un menor índice de alteraciones (Elledge R.M. y col., 1993). Esta proteína nuclear está involucrada en la regulación del ciclo celular. Otro gen supresor, el *Rb*, está directamente relacionado con el retinoblastoma familiar aunque también se ha encontrado rearrreglado e inactivado en algunos carcinomas mamarios humanos (Lee E. y col., 1988; T'Ang A. y col., 1988). Por último tenemos la familia de los genes supresores *BRCA*, que están relacionados con el cáncer de mama familiar que constituyen el 5% de todos los cánceres de mama.

Los estudios epidemiológicos han sugerido que estos genes autosómicos dominantes (*BRCA1* y 2) están alterados en aproximadamente igual proporción de 3 de cada 1000 individuos (Bishop D., 1994; McKinley A. y col., 1995).

Dentro de los mecanismos carcinogénicos que llevan a la alteración de estos proto-oncogenes y genes supresores están involucrados los siguientes factores (Weinberg R., 1989; Cooper G., 1990):

- predisposición genética.
- agentes ambientales químicos y físicos.
- virus e infecciones crónicas.
- medicamentos.
- estímulos hormonales.
- disminución de la inmunocompetencia por senescencia.

V. MECANISMOS CARCINOGENICOS.

Carcinógeno es un agente cuya administración en animales no tratados previamente produce un aumento significativo de la incidencia de neoplasias malignas respecto de controles apropiados sin tratar, independientemente de que éstos tengan una alta o baja incidencia espontánea de la neoplasia en cuestión (Miller E. y Miller J., 1966; Pitot H., 1978). Algunos agentes, incluyendo promotores e inhibidores de la respuesta inmune, pueden aumentar la incidencia de neoplasias malignas en tejidos tratados previamente con dosis subcarcinogénicas de un agente tumoral; tales sustancias no deberían ser llamados carcinógenos. Los mecanismos carcinogénicos son aquellos procesos que logran que una célula normal sufra cambios irreversibles en su material hereditario, dándole características especiales que hacen de ella una célula cancerosa. Las características de las células 'transformadas' se definen por:

- crecimiento sin inhibición por contacto *in vitro*
- crecimiento tumoral en trasplantes singeneicos
- facultad de invadir otros tejidos (metástasis)

A. Carcinogénesis física

El efecto de la radiación como un mutágeno específico ha sido documentado desde la época de los estudios de Mme. Curie, Roentgen y otros. La radiación de alta energía conduce a la aparición de distintas neoplasias en los organismos expuestos, generando cambios y destrucción parcial del genoma, con un aumento en la tasa de mutación. Hay una buena y razonable evidencia de que la exposición crónica a radiaciones es leucogénica y carcinogénica en humanos.

Las radiaciones tanto ionizantes como las ultravioletas, son componentes normales de nuestro entorno (Rauth A.M., 1986). Considerando que las células son 80% agua y que todos los eventos celulares ocurren en medio acuoso, los efectos de ionización y fragmentación del agua producen tres grandes especies de radicales reactivos: radicales hidroxilos, radicales solvatados y radicales hidrógeno. El ADN y las proteínas son blanco importante de las radiaciones ya que alteran sus estructuras, por ejemplo en el ADN se generan quiebres en la cadena de azúcar-fosfato, pérdida o modificaciones de las bases y sitiosapurínicos o apirimidínicos (Borek C., 1979).

La radiación UV no es ionizante puesto que no posee la suficiente energía para expulsar partículas, en cambio poseen la necesaria para producir un estado excitado en las moléculas impactadas, transformándolas en químicamente reactivas. La alteración más común es la de la base pirimidica que reacciona con el agua produciendo hidratos de pirimidina, o con otra pirimidina vecina dando dímeros de pirimidina (timina-timina, citosina-timina, citosina-citosina). Todas estas especies pueden reaccionar con aminoácidos y formar uniones covalentes entre ADN y proteína. Ambos tipos de radiaciones pueden dar lesiones diferentes, iniciando el proceso de carcinogénesis.

B. Carcinogénesis viral

Los virus han sido implicados como causa de cierto tipo de tumores. Rous, en 1911, demostró que los extractos libres de células de sarcomas en pollo podían reproducir la enfermedad cuando eran reinoculados en otros pollos sanos (Rous P., 1911). Posteriormente, Shope comprobó la existencia del virus del fibroma cutáneo y papiloma de conejos (Shope R., 1933). En la década del '30 Bittner descubrió el virus del tumor mamario y en los '50 Gross demostró que filtrados libres

de células de leucemias de ratones de la cepa AKR, inoculados en ratones recién nacidos de la misma especie, producían un alto porcentaje de leucemias en un período posterior de la vida de estos animales (Pitot H. y col., 1981).

Los virus **oncogénicos** pueden dividirse en dos grupos generales: los que poseen genoma de ADN y los de ARN. Dentro de los primeros, los más conocidos son el poliovirus del ratón leucémico y el virus 40 de los simios (SV40). Dentro de los virus a ARN encontramos a los retrovirus que se caracterizan por poseer una enzima polimerasa de ADN dirigida por ARN o 'transcriptasa reversa'. Todas las células transformadas por virus tienen la característica de presentar en la membrana plasmática los antígenos específicos del virus (Davies B. y col., 1984).

1. Relación entre virus y carcinomas mamarios.

El MMTV es el único en el que se demostró que su poder carcinogénico está relacionado en forma absolutamente dependiente del entorno hormonal del huésped. Está clasificado dentro del grupo de retrovirus tipo B, conteniendo los genes *gag*, *pol*, *env* y una región adicional codificante *orf* (open reading frame) en la zona de los LTR (long terminal repeat). Recientemente se descubrió que codifica para los llamados 'loci menores de estimulación linfocitaria' (Mls) o auto-superantígenos (Harel J. y col., 1981; Golovkina T. y col., 1992; Varmus H., 1989). En la zona de los LTR existe, además, un sitio de unión a hormonas que modulan la expresión de su genoma. De todas las distintas variantes no se ha descrito ninguna portadora de algún oncogen (Coffin J.M., 1991). Este virus se detectó en la leche y posteriormente también fue hallado en varios órganos y distintos tejidos y fluidos corporales de las cepas con alta incidencia de tumores mamarios. El virus se transmite no sólo por la leche, como en los ratones de la cepa C3H (MMTV exógeno), sino también genéticamente, vía gametas, como en la cepa murina GR (MMTV endógeno). Para el estudio de tumores en los modelos murinos también se encuentran las cepas C57BL y B20 las cuales son resistentes, sin MMTV en la leche y con baja o nula incidencia de tumores mamarios. La cepa BALB/c es susceptible, pero su leche está libre del MMTV y presenta baja incidencia tumoral, del 1% al 30% (Schlom J. y col., 1973) en hembras multíparas; si a esta cepa se la amamanta con nodrizas C3H existe integración y replicación del MMTV, aumentando la incidencia del 1%

al 99% respecto del amamantamiento con nodrizas BALB/c. En los tumores surgidos en forma espontánea en esta cepa no se hallaron secuencias específicas nuevas insertadas en el ADN (Breznick T. y Cohen J., 1982).

El mecanismo de transformación celular para este virus con dos formas diferenciales de transmisión puede ser el mismo: una integración no selectiva dentro del genoma que afecte genes importantes para la transformación neoplásica. En todas las cepas susceptibles infectadas con este virus surgen lesiones hiperplásicas lobulillares, consideradas como preneoplásicas, y sobre éstas también actuaría el MMTV, terminando en la aparición del tumor mamario (Michalides R. y col., 1983).

C. Carcinogénesis química

Volviendo a la definición de carcinógeno anteriormente presentada, si bien vale para todos los tipos de carcinogénesis, es importante agregar que fue acuñada específicamente para definir el proceso de inducción de tumores de piel en animales mediante sucesivas topificaciones de agentes químicos (Miller E. y Miller J., 1966).

Los modelos experimentales de carcinogénesis *in vivo* se caracterizan por la prolongada latencia entre la primera aplicación del carcinógeno y la aparición de tumores; usualmente se requieren administraciones repetidas del agente químico para producir carcinogénesis y este período de latencia suele ser dependiente de la dosis administrada. El potencial carcinogénico de una sustancia puede ser modificado por numerosos factores: diferencia entre distintas especies, entre cepas de una misma especie, entre sexos y también entre distintas edades (Farber E., 1982). Se han propuesto distintos niveles de acción desde la administración del carcinógeno hasta la consecuente aparición del tumor (Pitot H., 1981): primero **iniciación**, luego **promoción** y por último **progresión**.

La iniciación es un proceso irreversible en el cual las sustancias químicas producen cambios permanentes en el ADN. Algunos carcinógenos actúan en forma directa y otros previa metabolización a una forma electrofílica activa que atacaría moléculas nucleofílicas, tales como la cromatina activa y zonas intranucleosomales del ADN. Esta activación se lleva a cabo por distintas

enzimas como, por ejemplo, la citocromo P 450, monoxigenasas y peroxidasas, que convierten sustancias tóxicas para el organismo en compuestos hidrofílicos fáciles de excretar. La administración del iniciador produce células "transformadas". En los modelos experimentales de carcinogénesis química se han definido tres tipos de iniciadores (Berenblum I. y Shubik P., 1947; Kolbye A., 1976):

- a) **carcinógenos proximales:** no requieren ser metabolizados para actuar sobre las células blanco, por ejemplo: MNU.
- b) **procarcinógenos:** requieren de modificaciones para convertirse en carcinógenos, por ejemplo: las hidrazinas.
- c) **cocarcinógenos:** requieren de la presencia de otros agentes iniciadores para la inducción neoplásica, por ejemplo: MPA.

La mayor parte de los estudios han demostrado que el proceso de iniciación es irreversible. Por ejemplo, en el modelo de carcinogénesis química en la piel del ratón, la aplicación de pequeñas dosis de carcinógenos indujo tumores aún cuando la aplicación del promotor se había demorado de 9 a 12 meses (Berenblum I. y Shubik P., 1947; Boutwell R., 1964). Sin embargo, en este mismo modelo, Roe y col. han demostrado que si el plazo entre iniciador y promotor superaba el año, la incidencia tumoral era prácticamente nula (Roe F. y col., 1972); ésto indicaría que en determinados tejidos existe una eliminación de las células iniciadas.

La promoción puede ser definida como el proceso mediante el cual las células iniciadas dan lugar a un tumor bajo los estímulos de un agente que, por sí mismo, es incapaz de inducir la transformación neoplásica. El fenómeno es reversible hasta que aparece la "primer célula tumoral". En general la mayoría de los promotores no necesitan activarse por una metabolización a especies electrofílicas. A diferencia del "estado iniciado", que es relativamente estable, la promoción puede ser modificada por diversos factores ambientales como son la edad, el sexo, el balance hormonal, etc.

En los últimos 10 años se le ha dado importancia a la acción promotora de moléculas, según su estado redox. Por ejemplo las dos formas más importantes del oxígeno son superóxido O_2^- y su ácido conjugado el radical hidroperóxido HO_2 , el oxígeno simple 1O_2 , el radical hidroxilo $OH\cdot$ y el

peróxido de hidrógeno H_2O_2 . Las consecuencias de la interacción de estas especies con moléculas intracelulares produce intercambio de cromátidas hermanas, aberraciones cromosomales, citotoxicidad, carcinogénesis y degeneración celular por senescencia. En la carcinogénesis, las especies de oxígeno activo jugarían un rol principalmente en la fase promotora, durante la cual la expresión de genes de células iniciadas es modulada por el estado redox de la célula (Cerruti P., 1985). Por otra parte, muchos antioxidantes son anticarcinógenos, ejemplos son la vitaminas C y E que antagonizan la promoción de los ésteres de forbol. Además de estos anticarcinógenos existen otras moléculas de bajo peso molecular como sulfhidrilos no proteicos, cisteína, glutatión y cisteínglicina que juegan un rol importante en la defensa celular inactivando los radicales oxígeno activos.

Finalmente el tercer y último paso es la *progresión*, donde se seleccionan células que poseen una mayor malignidad, ya sea porque crecen más rápidamente o porque han desarrollado gran capacidad invasiva y eventualmente producen metástasis (Archer M., 1987). También se han demostrado que los radicales de oxígeno están relacionados con la transducción de señales de factores de crecimiento; por ejemplo el tratamiento de células en cultivo con TNF-alfa aumenta el estado de oxidación intracelular generando un aumento del nivel basal del activador de plasminógeno tipo uroquinasa, una enzima proteasa de serina involucrada en la degradación de la matriz celular. Otros artículos indicarían que las especies reactivas de oxígeno actúan como señales de factores de crecimiento, como IL-1, TGF-beta y IL-8 (Egawa K. y col., 1994; Ohba M. y col., 1994; Satriano J. y col., 1986).

Hay modelos experimentales en los cuales estas tres etapas son fácilmente distinguibles; sin embargo en la mayoría de los casos un mismo carcinógeno actúa induciendo el proceso completo y en tal caso se dice que es un **carcinógeno completo** (Archer M., 1987). Aunque los agentes carcinogénicos pueden ser estudiados por separado, muchos de ellos actúan conjuntamente. Existen evidencias experimentales y clínicas que indican que la transformación neoplásica es un proceso que involucra eventos múltiples y sucesivos (Vogelstein B. y col., 1988).

1. Nitrosamidas

Estos nitroso-compuestos inducen tumores en una amplia variedad de tejidos y de especies susceptibles a su acción carcinogénica. A diferencia de las nitrosaminas, las nitrosamidas inducen tumor únicamente en la zona de administración con excepción de la metilnitrosourea (MNU); la especificidad de tejido de las nitrosamidas puede depender de la dosis pero no de la vía de administración. La susceptibilidad depende en gran parte de la estructura química, y aunque el mecanismo del efecto organotrópico es aún desconocido, se sabe que en general es necesaria una activación enzimática en el tejido blanco (Archer M., 1987; IARC, 1979).

a. Metilnitrosourea

(1) Características Generales.

Su masa molecular relativa es de 103.1. Son cristales amarillo pálido, con un punto de fusión de 124°C. Es soluble en agua y solventes orgánicos polares e insoluble en no polares. La estabilidad de la solución acuosa es pH dependiente (a mayor pH menor vida media del compuesto). Es usado para obtener diazometano, ya que en solución alcalina se descompone a este producto (IARC, 1979).

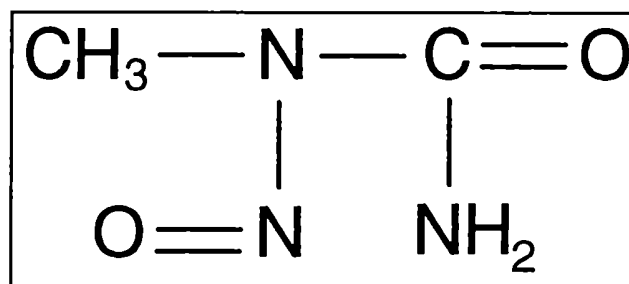


Figura 1 - MNU

Desde mediados de siglo, las nitrosoureas se usan como terapia en determinados tumores por sus propiedades citotóxicas y citostáticas, sólo o en combinación con ciclofosfamida (Nagarkatti M. y col., 1989). En 1967 se comprobó que en cultivos de células de ratón tratados con MNU existían cambios en la morfología y en el crecimiento celular y pérdida de la inhibición por contacto, todos ellos heredables. Se demostró también que al inyectar células previamente tratadas con MNU en ratones singeneicos había desarrollo tumoral, mientras que células no tratadas no lograban implantarse (Sanders F. y Burford B., 1967). Gullino y colaboradores propusieron al modelo de MNU en la rata como modelo experimental *in vivo* de cáncer de mama humano (Gullino P. y col., 1975); posteriormente este modelo fue muy utilizado por otros autores para estudiar mecanismos de carcinogénesis hormonal (Singer B., 1979).

(2) Datos biológicos:

MNU es un carcinógeno de acción local y sistémica, cuya efectividad como tal, se ha demostrado en distintos animales y por distintas vías de administración (IARC, 1979):

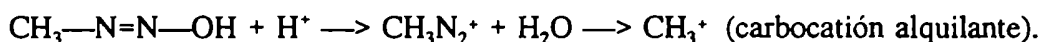
- a) Oral: Se desarrollan tumores en tubo digestivo y en sistema nervioso periférico en ratas, hamsters, cobayos, cerdos y monos (Reddy J. y Rao M., 1975; Adamson R. y col., 1977; Reddy J. y col., 1974).
- b) Intubaciones intragástricas: Se desarrollan adenocarcinomas gástricos en ratas (Tatematsu M. y col., 1992).
- c) Topicaciones en piel: Tumores de piel se desarrollan en ratones, ratas y hamsters y leucemias en ratones recién nacidos (Graffi A. y col., 1967).
- d) Instilaciones vaginales: En ratas y ratones de la cepa ICR, MNU produce un número bajo de tumores cervicales y de endometrio (Niwa K. y col., 1989; Niwa K. y col., 1991).
- e) Inhalaciones y/o administración intratraqueal: En hamsters se observaron tumores en el aparato respiratorio (Herrold K., 1970; Schreiber H., 1970).
- f) Intraperitoneal: En hamsters y cobayos se detectaron tumores de intestino (Reddy J., 1974). En ratones adultos se encontraron adenomas bronquiales y tumores en hígado y riñón; en neonatos se vieron adenomas en pulmón y linfomas. En ratones de distintas cepas se ha demostrado que la administración de MNU induce linfosarcomas tímicos (Siedel H. y Kreja L., 1984). En ratas se observan tumores de origen nervioso, tumores renales, digestivos y mamarios (Terracini B. y Testa M., 1970; Waldmann V. y Rabes H., 1992).
- g) Subcutánea y/o intramuscular: En ratones, ratas y hamsters se desarrollan tumores en tejido linfoide, en pulmón y en hígado; en ratones neonatos se hallan tumores de timo (Hass H. y col., 1973; Terracini B. y Stromignoni A., 1967).
- h) Intravenosa: En ratones, hamsters, gerbillos, conejos y perros se identificaron tumores en el aparato digestivo, respiratorio, circulatorio y sistema nervioso (Denlinger R. y col., 1974; Dexter D. y col., 1974; Hass H. y col., 1975).

De lo expuesto se desprende que MNU tiene distintos efectos organotrópicos según los animales, las vías y también los tiempos de administración (Swenberg J. y col., 1975).

Entre los efectos tóxicos en distintos animales se determinó que en ratas, la dosis letal 50 (DL50) por vía oral ó i.v., es 110 mg de MNU /kg; y en hamster por vía s.c. la DL50 es 50-110 mg /kg, y por vía i.v. la DL50 es 50 mg /kg. Se publicaron trabajos donde se encontraron efectos embriotóxicos y teratogénicos (Kelly M. y col., 1968; Mohr G. y col., 1974; Tomatis L. y col., 1975).

Entre otros efectos mutagénicos en células de hamsters se observaron intercambios de cromátides hermanas, cortes, fragmentaciones y traslocaciones (Abes S. y Sasaki M., 1977).

(3) Reacciones químicas involucradas y mecanismos de acción.



Además del metilo que formará los aductos, se produce también el ión cianato que reaccionará con las proteínas séricas, siendo responsable de la toxicidad de MNU en células en crecimiento (Knox D., 1976). Diez minutos después de la administración i.v. de MNU, no se detecta en sangre pues es rápidamente absorbido y metabolizado; su vida media es menor de quince minutos. Los productos de metabolización del carcinógeno interactúan con el ADN, en el que se detectan metilaciones en:

- 1-metil-; 3-metil-; 7-metil-Adenina
- O-6-metil-; 7-metil-Guanina
- 3-metil-Citosina
- 3-metil-; O-4-metil-Timidina

De todas estas posibilidades la persistencia de la metilación en O-6-metil-Guanina sería fundamental en la actividad carcinogénica del MNU (Singer B., 1979; Rabes H. y col., 1986). Esta alteración puede producir un mal apareamiento de esta base o formación de un sitioapurínico, con los consecuentes errores en la replicación y en la transcripción que pueden ser heredados.

(4) Factores que varían la respuesta tumoral

La hepatectomía parcial aumenta la síntesis de ADN y la incidencia de tumores en el hígado en animales tratados con MNU; lo mismo se observa en animales jóvenes, donde existe alta tasa de crecimiento (Abes S. y Sasaki M., 1977; Craddock U. y Frei J., 1974). También se ve una mayor incidencia tumoral luego de una aplicación i.p. de MNU más sulfato de isoprenalina (estimulante de la síntesis de ácidos nucleicos). Rabes y colaboradores investigaron la relación entre la etapa del ciclo celular en que se administra el carcinógeno y la incidencia de tumores (Rabes H. y col., 1986). Demostraron que en la etapa G1 temprana se obtenían pocos focos después del tratamiento con la droga pero la frecuencia aumentaba luego de la inyección entre las fases G1-S y era máxima en fase S temprana, para declinar en S media y caer en S terminal y G2-M a iguales valores que G1 temprano. Existe entonces una estrecha relación entre el poder carcinogénico y el estadio proliferativo. La síntesis de ADN decrece cuando se aproxima a G1-S medio lo que permite la acción de sistemas reparativos, evitándose de esta manera la persistencia de la metilación. En un estudio realizado en células HeLa S3 en suspensión, se demostró que la estructura primaria de la cromatina juega un rol importantísimo en la modulación del daño del carcinógeno, ya que existe una localización preferencial de presencia de aductos en el ADN nucleosomal (Boffa L. y col., 1992).

Ratko y col. descubrieron que en rata el patrón de alquilación del ADN inducido por MNU de la glándula mamaria variaba según la fase del ciclo estral en la que se encontraba el animal en el momento de la inyección del carcinógeno. Si la inoculación se efectuaba durante el estro o proestro, la latencia disminuía y aumentaban la incidencia y el número de tumores por animal, con respecto a ratas control inoculadas en diestro. Sus resultados les sugirieron que la remoción de estos aductos es llevada a cabo por un sistema de reparación del epitelio mamario que depende del entorno hormonal, ya que no observaron lesiones en otros órganos tales como el hígado en ningún momento del ciclo en que se encontraba la rata al ser inoculada por MNU (Ratko T. y col., 1988).

En forma similar, las lesiones preneoplásicas inducidas por MNU en la rata son diferentes según la fase del ciclo en la que el carcinógeno fue inyectado. Se observaron anomalías en los brotes terminales (TEBs) dentro de la primera semana de inoculación de MNU; y éstas se hacen significativas en proestro y estro con respecto al diestro. La incidencia de tumores de

mama era mayor en los animales tratados en proestro (Anderson C. y col., 1991).

La administración de estrógenos a ratas que recibieron una dosis de MNU cada semana durante tres semanas indujo una mayor incidencia y una menor latencia de tumores uterinos con respecto a los controles sin tratar con estrógeno (Niwa K. y col., 1991).

Grubbs C. y col. demostraron que la administración de estrógenos y progesterona en ratas previo al tratamiento con MNU, genera resultados controvertidos: por un lado si la aplicación hormonal era inmediata al inóculo del carcinógeno había un aumento de la incidencia tumoral, mientras que si se dejaban pasar 40 días entre el inóculo y el tratamiento hormonal, se observaba un efecto protector (Grubbs C. y col., 1983).

(5) Oncogenes activados por MNU

En tumores mamarios inducidos por MNU se demostró por análisis de oligonucleótidos que en el gen *H-ras* existiría una transición de bases G→A en el codón 12 (GGA→GAA), (glicina por valina) (Sukumar S. y col., 1988); lo mismo fue determinado por secuenciación en estudios *in vitro* (Zarbl H. y col., 1985). En tumores hepáticos en rata inducidos por una sola dosis de MNU, se demostraron rearrreglos, amplificaciones y altos niveles de transcripción del gen *c-myc* (Suchy B. y col., 1989). En estudios realizados en tumores de colon de rata inducidos con MNU, se encontraron rearrreglos, inserciones y/o deleciones intragénicas en los *loci* de *H-ras* y *myb* de diversos tumores, además de mutaciones puntuales y pequeñas alteraciones de los genes *fos* y *abl* (Alexander R. y col., 1992). En un trabajo reciente de inducción de adenocarcinomas mamarios en ratones transgénicos que sobre expresaban el *N-ras* normal, la administración de MNU indujo la aparición de adenocarcinomas mamarios y linfomas. En este modelo no se encontró el *ras* mutado, por lo que se concluye que la sobre expresión de este gen normal cooperaría con otros posibles genes mutados por MNU en el proceso de carcinogénesis (Mangues R. y col., 1994).

D. Carcinogénesis hormonal

1. Mecanismo de acción de hormonas esteroideas

Las hormonas esteroideas se caracterizan por poseer una estructura química básica derivada del colesterol, con grupos unidos que le confieren especificidad; dentro de esta familia se encuentran los estrógenos, andrógenos, progestágenos, glucocorticoides y mineralocorticoides. Existen sustancias que si bien no tienen estructura esteroidea, como por ejemplo los análogos del estradiol, poseen también la capacidad de unirse al receptor y generar una respuesta hormonal. Los receptores de estas hormonas pertenecen a una superfamilia que incluye además de los receptores para hormonas esteroideas, al receptor de la hormona tiroidea, vitamina D y ácido retinoico (Sutherland D.J., 1987).

El mecanismo general de acción de los esteroides se muestra en la siguiente figura:

La hormona penetra la membrana celular por difusión y se une al receptor nuclear específico que está formando un complejo con proteínas "heat shock" que lo mantienen 'inactivo'. Estos receptores son proteínas que tienen una estructura común con dos regiones altamente conservadas, una en aproximadamente la mitad de la proteína (conocido como el dominio C) involucrada en la interacción con el DNA y la otra en la región carboxi-terminal (dominio E/F) que une la hormona formando un complejo funcional. Este complejo conduce a la

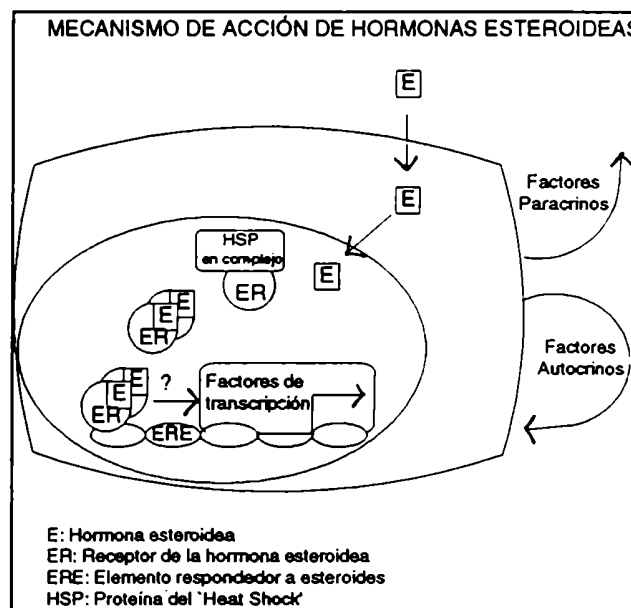


Figura 2. Mecanismo de acción de las hormonas esteroideas.

formación de una estructura dimérica que adquiere afinidad de unión al DNA en un sitio que se conoce como elemento respondedor de esteroides, cuya secuencia nucleotídica es palindrómica y está usualmente ubicada en la región 5' del gen respondedor al esteroide. El receptor ocupado con su ligando específico actuaría junto con factores de transcripción y otros componentes del complejo transcripcional para modular la expresión génica. Algunos de estos genes directa o indirectamente conducen al establecimiento de mecanismos autocrinos o paracrinos de crecimiento celular

(Katzenellenbogen B. y col., 1993).

En el caso particular de la progesterona, esta hormona posee un receptor formado por dos isoformas proteicas A y B que solo difieren entre sí en que a la A le falta una porción de la secuencia amino terminal por inicio diferencial de la transcripción. Los dímeros formados pueden ser AA, AB o BB y se postula que esta diversidad podría regular los distintos efectos de la progesterona en diversos tejidos (Schott D. y col., 1991; Horwitz K. y col., 1993).

2. Relación entre las hormonas esteroideas y el cáncer

En la primera mitad de siglo se propuso que el desequilibrio producido en el mecanismo regulatorio que ejerce la hipófisis sobre las glándulas endócrinas puede conducir a la aparición de alteraciones neoplásicas. Uno de los trabajos pioneros y más citado de la relación de hormonas y tumores es el modelo presentado por Biskin M. y Biskin G. en 1944. Estos autores transplantaban ovarios de animales singeneicos en bazo de ratas normales; los estrógenos sintetizados por el implante son volcados al sistema venoso esplénico y llevados al hígado donde son metabolizados y eliminados de la circulación general. Esta disrupción de la retroalimentación negativa entre gónadas e hipófisis da como resultado la falta de inhibición de la liberación de gonadotrofinas hipofisarias lo que provoca un estímulo constante en los ovarios injertados desencadenando la aparición de una neoplasia.

Las observaciones pioneras de Beatson ya a fines del siglo pasado, sugirieron una relación entre la aparición de tumores de mama y las funciones ováricas (Beatson G. y col., 1896). Posteriormente se demostró que otros tumores como algunas leucemias, carcinomas de próstata y endometrio además del de mama, pueden ser modulados positivamente en su crecimiento por hormonas esteroides (IARC, 1979). En las últimas décadas, se ha aprovechado la capacidad de las hormonas para regular la proliferación celular para dilucidar mecanismos autocrinos y paracrinos relacionados con la transformación celular (Dickson R. y Lippman M., 1987).

a. Relación entre estrógenos y neoplasia

Desde hace algunos años se ha postulado que los estrógenos podrían jugar roles múltiples como

carcinógenos, agentes permisivos y promotores junto al aporte de otras hormonas o factores hipofisarios que actuarían directa o indirectamente como mitógenos (Pike M. y col., 1983; Dickson R. y Lippman M., 1987). Existen evidencias experimentales que demuestran que los estrógenos son promotores tumorales a través de mecanismos epigenéticos y que determinados metabolitos son capaces de alterar directamente el ADN. Por ejemplo se sugiere que la unión covalente de 16-alfa-hidroxiestrone, uno de los metabolitos de la biotransformación del 17 beta-estradiol, funcionaría como iniciador tumoral en explantos y cultivo de células de glándula mamaria de ratón y humana (Telang N. y col., 1992). En mujeres se reportó una mayor actividad de la enzima estrógeno-16-alfa-hidroxilasa en pacientes con tumor mamario o en pacientes de alto riesgo comparado con pacientes normales. Se ha demostrado que la 16-alfa-hidroxiestrone se une en forma covalente al receptor de estrógeno; esto sugiere que éste podría ser uno de los mecanismos de transformación maligna en los tejidos respondedores a estrógeno (Swanek G.E. y Fishman J., 1988; Bradlow H. y col., 1994; Osborne C. y col., 1993). Adlercreutz y col. proponen que la 2-hidroxiestrone sería el metabolito relacionado con el aumento de riesgo de inducción de cáncer de mama (Adlercreutz H. y col., 1994).

Por todo lo anterior, se podría decir que los estrógenos podrían actuar como carcinógenos completos (Nebert D., 1993); los metabolitos de la hidroxilación del estradiol formarían aductos en el ADN, fijando mutaciones y activando oncogenes (iniciación tumoral); el 17-beta-estradiol (E_2) a través del receptor de estrógeno, podría estimular la vía de transducción de señales de factores de crecimiento no genotóxicos produciendo un aumento en la división celular (promoción).

(1) Factores de crecimiento como mediadores en la acción estrogénica

En la mayoría de los modelos experimentales de cáncer de mama se les ha atribuido a los estrógenos y a la prolactina roles importantes en la carcinogénesis, modulando el crecimiento de células epiteliales y la diferenciación (Sheehan D. y col., 1982; Welsch C. y col., 1977; Vic P. y col., 1982; Lippman M. y col., 1976). La hipótesis de que los estrógenos inducen factores de crecimiento autocrinos fue avalada por experimentos usando medios condicionados enriquecidos en factores secretados por células estrógeno-respuestas expuestas a hormonas y por el hecho de que estos factores se segregan constitutivamente en células estrógeno-

independientes o autónomas. Algunos de estos factores actúan por vía autocrina sobre las células epiteliales que expresan los receptores adecuados, mientras que otros lo hacen sobre las células estromales en forma paracrina (Osborne C. y col. 1990; Lippman M. y col., 1986). Todos estos factores podrían actuar también vía intracrina por interacciones en el complejo de Golgi o en vesículas secretorias (Mathieu M. y col., 1990). La hipótesis de que estos factores median la actividad mitogénica de los estrógenos se ve favorecida por el hecho de que hay una mayor expresión de factores mitogénicos en células tratadas con estrógenos que es abolida por la administración de antiestrógenos y viceversa. La regulación transcripcional de los inhibidores del crecimiento, como los factores de transformación beta (TGF-beta) 1,2 y 3, es disminuida por los estrógenos y estimulada por antiestrógenos (Osborne C. y col., 1989; Arrick B. y col., 1990). La hipótesis intracrina se ve apoyada por la relativa ineficacia de los anticuerpos neutralizantes en bloquear el crecimiento celular (La Rocca L. y col., 1990; Vignion F. y col., 1992). Los factores de crecimiento que más se han asociado a proliferación de células tumorales mamarias son los de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de transformación alfa (TGF-alfa), la familia de los factores semejantes a la insulina I y II (IGF I, IGF II), y por últim/, algunos miembros de la familia del FGF. Por otra parte los TGF-beta se comportan como reguladores negativos de la proliferación de células epiteliales y positivos en células estromales. Los estrógenos y EGF e IGF-I pueden regular la expresión de determinados genes como el del RP y de enzimas lisosomales; pueden también directa o indirectamente aumentar la producción de IGF-II, TGF-alfa, PDGF, etc, y de sus receptores. A su vez estos factores pueden regular la eficiencia de unión de los esteroides, modulando la fosforilación del receptor nuclear (Freiss G. y col., 1993).

b. Relación entre progestágenos y neoplasia

Dentro de las sustancias de actividad hormonal esteroidea están los progestágenos sintéticos, que como su nombre lo indica, tienen actividad progestacional. Su potencia se valora con un ensayo biológico consistente en la inducción de diferenciación del endometrio de conejo, por administración sistémica o intrauterina, que son los tests de Mc Phail y Mc Ginty respectivamente (Russo I. y Russo J., 1991). Se utiliza útero de rata para determinar si la hormona induce decíduomas, si inhibe la ovulación o mantiene la preñez después de la

ovariectomía. Sin embargo los efectos de los progestágenos en la glándula mamaria normal están muy discutidos. Existen evidencias que sugieren que podrían actuar como potenciadores de los carcinógenos químicos en rata y ser mitogénicos en tumores de ratón (Danguy A. y col., 1980; Welsch C. y col., 1968; Nagasawa H. y col., 1980; Kiss R. y col., 1986). En general su acción depende del sistema, de las dosis y del tiempo y forma de administración; en el caso del progestágeno sintético linestrenol, la dosis de 3 mg/kg protege a hembras de la raza canina Beagle de la aparición de tumores de mama, pero a dosis de 50 a 120 veces superiores producen carcinomas mamarios (Misdrop W., 1991). Se observaron efectos dosis/respuesta similares con diferentes progestágenos en ratas, perros y monos (Russo y col., 1989; Concannon y col., 1981; Tavasolli y col., 1988). En gatos, la administración regular de progestágenos para la prevención del estro ó por problemas dermatológicos, incrementa considerablemente el riesgo de tumores mamarios, pero ésto no ocurre cuando se administra en forma discontinua (Misdrop W., 1991). En la línea tumoral humana MCF-7, distintos progestágenos a concentraciones en suero equivalentes a las dosis de anticonceptivos orales (3-5 ng/ml), no producen estímulo en la proliferación celular; sin embargo, el uso de concentraciones farmacológicas por encima de estos valores induce división celular (van der Burg B., 1991).

No hay que olvidar que las hormonas que son clasificadas como progestágenos, lo son por su habilidad de mantener el embarazo, lo cual no excluye que posean otras respuestas que imiten la acción de hormonas tales como los glucocorticoides, estrógenos o andrógenos sobre una variedad de tejidos reproductivos o no. Entre las distintas interrelaciones de las hormonas hay que considerar aquellas que tienen un efecto potenciador o uno contrario cuando son administradas en conjunto (Muwszowicz I. y col., 1974).

Está lejos de ser claro el rol de las hormonas en general y de los progestágenos, en particular en la patogénesis mamaria. Entre las muchas acciones de los progestágenos se determinó que en perros la progesterona endógena durante el metaestro y la progesterona que se administra para prevenir el estro, causa secreción excesiva de la hormona de crecimiento (GH) e IGF-1 aumentando los niveles plasmáticos y ambas son hormonas mamotróficas (Selman P. y col., 1991).

Existe una relación indirecta entre el grado de diferenciación de la glándula mamaria previa a la exposición a un carcinógeno y la inducción tumoral. Russo y col. estudiaron el efecto de la ovariectomía y la administración de hormonas sobre varias estructuras ducto-terminales en glándula mamaria de rata: TEB, conducto terminal y lóbulo germinal. Estos autores demostraron que la cinética de crecimiento en la glándula no está regulada principalmente por los niveles de hormonas sistémicas, sino más bien por mecanismos locales selectivos, íntimamente relacionados con el grado de diferenciación de cada estructura. Por ejemplo, la ovariectomía afecta más profundamente la proliferación de estructuras diferenciadas que las que no lo están. Los TEBs no son enteramente dependientes de los esteroides ováricos para mantener su alta tasa de proliferación (Russo J. y Russo I., 1991). Sus estudios revelaron que los tumores originados de estructuras terminales indiferenciadas en hembras jóvenes, vírgenes y sexualmente maduras, están preponderantemente ubicados en la región torácica; aquí los TEBs son más grandes y numerosos que aquellos ubicados en la región abdominal. La mayor susceptibilidad de estas áreas a la transformación neoplásica ha sido atribuida a diferencias topográficas en el desarrollo de la mama (Russo I. y col., 1986).

(1) Acetato de medroxiprogesterona (MPA)

(a) Características generales:

El MPA es un progestágeno derivado del pregnano, 17-alfa-acetoxi-6-alfa-metil-4-pregnano-3,20-diona, cuya estructura es muy parecida a la progesterona y posee, como ésta, actividad antiestrogénica en concentraciones séricas mayores a las usadas en terapia tumoral (> 200 ng/ml). También se han observado propiedades estrogénicas pero a nivel del eje hipotálamo-hipofisario como bloqueo de la secreción de gonadotrofinas y disminución de la concentración de estradiol intracelular (El Etreby M. y col., 1979). Se ha demostrado hace algunos años que el MPA puede unirse a los receptores de

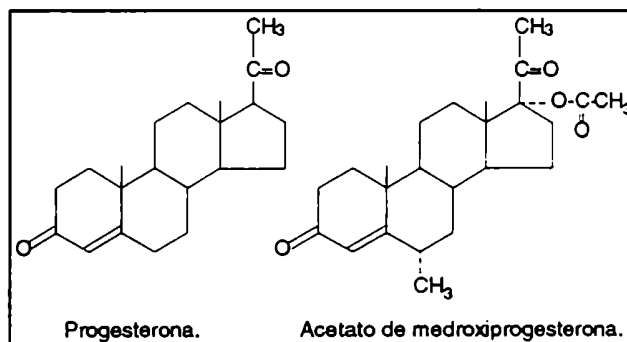


Figura 3. Estructuras químicas de la progesterona y medroxiprogesterona.

andrógenos y desencadenar distintos tipos de respuestas relacionadas con actividad androgénica, como por ejemplo inducir la secreción de EGF en glándulas salivares de ratón (Bullock L. y col., 1975). Algunos progestágenos que poseen el grupo 17-beta-OH pueden, en concentraciones altas, unirse a receptores de estrógenos y esta actividad puede ser bloqueada por antiestrógenos (van der Burg B., 1991); este no es el caso del MPA pues carece del grupo funcional 17-OH (Miller W. y O'Neil J., 1990).

(b) Usos clínicos

Ya desde 1970 se utiliza el MPA como droga anticonceptiva en más de 90 países. Aproximadamente 30 millones de mujeres en el mundo lo han usado y alrededor de 2 millones de personas lo utilizan hoy en día. En Estados Unidos el único anticonceptivo inyectable disponible desde 1993 es el MPA depot y la dosis recomendada es de 150 mg intramuscular cada tres meses. Posee una eficacia anticonceptiva del 99% de anticoncepción e inhibe la ovulación durante 14 semanas. En el primer año de uso continuo genera episodios impredecibles de sangrado irregular, pero con el tiempo estos eventos disminuyen y se establece una amenorrea continua. Aunque la supresión de la ovulación puede persistir hasta 18 meses, no se afecta la fertilidad en forma permanente. El uso del MPA por largos periodos produce una reducción del sangrado menstrual que ha sido asociado con una disminución en la incidencia de enfermedades inflamatorias y de candidiasis. Se reduce dramáticamente la incidencia de cáncer de endometrio y está también involucrado en una reducción reversible de la densidad ósea, probablemente a través de la supresión endógena de la producción de estrógeno. El MPA se utiliza en el tratamiento de la amenorrea secundaria, metrorragia uterina, endometriosis, en mujeres embarazadas con pobre respuesta progestacional, en carcinomas endometriales y en cáncer de mama avanzado (Murad F. y Guilman A., 1975; Gambrell R., 1988; Cortes Funes H. y col., 1983). Cuando se administra a mujeres durante la lactancia, el MPA se secreta en la leche, por lo que existe una exposición exógena a la hormona en recién nacidos (Schwalhe P., 1974). Otras indicaciones son: en el tratamiento de la dismenorrea, aborto recurrente, tensión premenstrual, infertilidad luteal y pubertad precoz (Sun M., 1984). En los últimos años se ha utilizado MPA como terapia de neoplasias hormono-respondedoras: mama, testículo, ovario y riñón; en el caso de carcinomas de mama se logra un 30-40% de respuesta en tumores avanzados (Schulz K. y col., 1985). Si bien el uso de progestágenos en pastillas anticonceptivas se consideraba inocuo y se creía que disminuía la incidencia de carcinomas

mamarios en la mujer, trabajos recientes sugieren un aumento de incidencia de cáncer de mama en mujeres jóvenes después de 1-2 años de exposición al progestágeno (WHO, 1984; WHO, 1993).

En la mayoría de los tratamientos de pacientes oncológicos con drogas citotóxicas se producen efectos colaterales de mielotoxicidad. El MPA posee un efecto mieloprotector en la quimioterapia combinada de tumores sólidos (carcinomas de cabeza y cuello). Los autores proponen que esta acción sería debida a la capacidad de MPA de inducir un arresto mitótico de las células progenitoras de la médula ósea que las protege de la acción de la droga (Amadori D. y col., 1992).

Existen controversias sobre la actividad de MPA como modulador de la vascularización en distintos sistemas. Posee una acción inhibitoria sobre células endoteliales pretratadas con inductores angiogénicos como bFGF y TGF-alfa (Yamamoto T. y col., 1994); este efecto también se comprobó sobre distintas líneas tumorales, ejerciendo su actividad inhibitoria sobre proteasas como el activador de plasminógeno y colagenasas e induciendo la síntesis de un inhibidor natural del activador de plasminógeno tipo uroquinasa (PAI-1) (Fan T. y col., 1995). Sin embargo en el trabajo de Moulton y Khan, el tratamiento de células del epitelio luminal y miometrio estromal de úteros de rata con MPA, aumenta la expresión y el procesamiento de catepsina D, una aspartil proteasa lisosomal relacionada con eventos de invasión celular y metástasis (Moulton B. y Khan S., 1992; Vetvicka V. y Fusek M., 1994)

(c) Efectos carcinogénicos

i) En humanos

Varios estudios epidemiológicos han tratado de dilucidar el posible rol carcinogénico del MPA. Uno de los primeros estudios fue realizado en Costa Rica (WHO, 1993; Lee E. y col., 1987) y encontraron que el MPA en depósito subcutáneo incrementaba al doble el riesgo de cáncer de mama, pero el diseño experimental de este estudio fue cuestionado. Un segundo estudio fue realizado en Nueva Zelanda y no se encontró ninguna asociación entre el uso del MPA y el riesgo de cáncer mamario, sin embargo las usuarias de aproximadamente 1 año, tenían una doble probabilidad de adquirir la enfermedad antes de 35 años, y las de más de 2 años antes de los 25 años; por lo tanto los autores especulan que el MPA depot podría aumentar el riesgo de cáncer solamente al principio del tratamiento, quizá actuando como un

promotor en estadios tardíos de la carcinogénesis (Van Leeuwen F., 1991).

ii) **En ratones**

Los estudios realizados con concentraciones de MPA de 5 mg i.m. en ratones hembra de la cepa MARSH indican que MPA no es carcinogénico (Bischoff y Bryson, 1977). Por otra parte Nagasawa y col., sugirieron que cuando se tratan durante dos meses a ratones hembras de la cepa SHN con MPA a concentraciones de 25 mg, disminuye la incidencia de nódulos alveolares hiperplásicos (Nagasawa H. y col., 1985), sin embargo, posteriormente los mismos autores (Nagasawa H. y col., 1988) demostraron que MPA a concentraciones de 30 mg cada 2 meses durante 7 meses aumentaba la incidencia tumoral.

En nuestro laboratorio hallamos que la administración de este progestágeno a hembras de la cepa BALB/c (40mg en forma de pellet o depósito s.c.), induce adenocarcinomas de mama después del año de comenzado el tratamiento (Lanari C. y col., 1987).

iii) **En perros**

En experimentos con estos animales, se demostraron diferencias significativas en el aumento del número de los nódulos alveolares hiperplásicos en los grupos tratados con MPA 75 mg/kg (25 veces la dosis recomendada para humanos). Además el 75% de los perros tratados con esta dosis desarrollaron tumores malignos con metástasis al final del cuarto año, mientras que ningún animal control presentó tumores (Misdrop W., 1991).

iv) **En ratas**

En un modelo experimental de inducción de tumores de mama en rata utilizando dimetilbenzantraceno (DMBA), Danguy y col. demostraron que MPA poseía un efecto estimulador del crecimiento tumoral utilizado en dosis de 0.5-5 mg/kg/día, mientras que a dosis mayores (50-100 mg/kg/día) lo inhibía (Danguy A. y col., 1980). Por otra parte, Russo y col. (Russo I. y col., 1989) demostraron que cuando se usan dosis de MPA equivalentes a las usadas en tratamientos anticonceptivos (2.5-3 mg/kg), no existía diferencia en la inducción de tumores mamarios por DMBA respecto a los controles sin tratar, mientras que con dosis 10 veces mayores de MPA, se observaba una inhibición de la diferenciación mamaria con un aumento

de la incidencia tumoral (Russo IH. y Russo J., 1991; Selman P. y col., 1991).

VI. ANTECEDENTES Y ORIGEN DE NUESTRO MODELO EXPERIMENTAL.

En nuestro laboratorio hemos demostrado que ratones hembras vírgenes de la cepa BALB/c tratados con dosis altas de MPA desarrollan adenocarcinomas de mama, con una incidencia actuarial del 80% y una latencia media de 52 semanas (Lanari C. y col., 1986). La mayoría de los tumores inducidos son ductales, expresan altos niveles de RE y RP, niveles no detectables de EGF-R y son MPA-dependientes en los trasplantes singeneicos. En menor proporción se obtienen tumores lobulillares que no expresan RE y RP, pero sí EGF-R; estos últimos son hormono-independientes para su crecimiento en trasplantes singeneicos. Los adenocarcinomas espontáneos obtenidos en hembras multíparas de la cepa BALB/c tienen un patrón histológico similar a estos últimos (Molinolo A. y col., 1987; Lanari C. y col., 1989). En ratones de la cepa C3H también demostramos que el MPA aumentó la incidencia de adenocarcinomas mamarios pero esta diferencia no alcanzó un valor estadístico (38% vs 64%) (Lanari C. y col., 1987).

Con la idea de obtener carcinomas mamarios de igual histología en BALB/c con una latencia media menor al año pero que conserven sus características biológicas, estudiamos la acción de un carcinógeno químico junto con la hormona. Para ello usamos MNU, un carcinógeno que se había utilizado ampliamente para inducir tumores mamarios hormono-dependientes en rata (Gullino P. y col., 1975; Anderson C. y col., 1991), pero que no existía hasta ese momento ninguna experiencia en el ratón como carcinógeno mamario *in vivo*. Hemos demostrado que ratones vírgenes de la cepa BALB/c tratadas con MNU (3 dosis de 50 mg/kg .i.p. con un mes de intervalo) desarrollan con baja frecuencia tumores mamarios (15%). El pretratamiento con MPA (40 mg depot s.c. cada tres meses comenzando con 1 semana previa a la primer dosis de MNU) aumenta significativamente la incidencia tumoral (79%). La latencia tumoral fue mucho menor que la necesaria para inducir los tumores típicos de MPA (Pazos P. y col., 1992). En este trabajo de tesis decidimos caracterizar en profundidad este nuevo modelo de cocarcinogénesis.

MATERIALES Y METODOS

I. Animales:

Se utilizaron hembras vírgenes de la cepa BALB/c de 2 a 3 meses de edad con un peso medio de 20 gramos. Los ratones fueron mantenidos con agua y comida *ad libitum*, con ciclos de doce horas de luz y de oscuridad.

II. Tratamiento hormonal:

- A. **Acetato de medroxiprogesterona (MPA):** En experimentos de inducción tumoral las dosis utilizadas fueron de 40 mg de Medrosterona (suspensión de microcristales de MPA) inoculadas en 0,2 ml en forma subcutánea (s.c), en el flanco inguinal izquierdo del animal. Este inóculo fue repetido cada tres meses. En algunos experimentos el tratamiento fue suspendido a los dos meses, extrayendo el depósito de MPA en forma quirúrgica, con la consiguiente reaparición de los ciclos estrales. En trabajos anteriores hemos demostrado que MPA se libera lentamente y que este depósito dura más de 3 meses (Molinolo A. y col., 1987).

En los experimentos en donde se evaluó la hormono-dependencia de los tumores, los pasajes se hicieron en animales tratados con 0,1 ml de Medrosterona (20 mg MPA) s.c.

En los experimentos diseñados para evaluar el efecto inmunoestimulador del MPA se utilizaron pellets de 40 mg. implantados quirúrgicamente en el dorso de los animales.

- B. **17-beta-estradiol (E_2)** (Laboratorios Gador, Argentina): Se implantaron pellets de silástico conteniendo 5 mg de E_2 en el dorso de los animales en los experimentos donde se investigó el efecto inhibitorio de esta hormona sobre el crecimiento tumoral.
- C. **Onapristona o ZK 98299 (onaP)** (Laboratorios Schering, Argentina): En los experimentos donde se evaluó el título de anticuerpos hemaglutinantes en ratones tratados con MPA, se utilizaron dos formas de administración:

1. onaP diaria: solución acuosa, inyecciones diarias 10 mg/kg de peso.

2. onaP pellet: pellas de silástico de 1,7 mg.

III. Tratamiento con MNU:

La metilnitrosourea (MNU)(Sigma Chemical Co., St.Louis, MO) fue diluida en buffer sodio fosfato (PBS) y se inyectó en una concentración de 1 mg. en 0.1 ml. en forma intraperitoneal (50 mg/kg de peso del ratón). En cada oportunidad se preparó una solución de MNU nueva. Debido a la inestabilidad de la droga se inocularon los animales dentro de los 15 minutos posteriores a la preparación de la solución.

IV. Tratamientos quirúrgicos:

Para las ovariectomías (ovx), las sialoadenectomías (sialo) y las operaciones simuladas (sham) los animales se anestesiaron con éter etílico. Las operaciones se realizaron una semana antes de iniciar los tratamientos con MNU o MPA. En los experimentos de incidencia tumoral se consideró como día 0 el día del inóculo de MNU.

V. Experimentos de incidencia tumoral:

Se utilizaron entre 20 y 48 ratones por grupo. Todos los animales fueron pesados al iniciar el experimento y a los 10, 60 y 150 días.

En los grupos experimentales en los cuales el primer agente administrado fue MNU, se evaluó en qué momento del ciclo estral estaban los animales al inocular el carcinógeno químico, para investigar si la incidencia tumoral dependía del estadio del ciclo estral.

El diseño de los protocolos está específicamente señalado en cada Tabla de los resultados. Los grupos son presentados siguiendo el orden de la tablas de resultados:

a) Determinación del efecto promotor del MPA.

Se estudiaron cinco protocolos:

Grupo 1: 43 animales fueron tratados con una única dosis de MNU como control sin tratamiento con MPA.

Grupo 2: 22 animales recibieron MPA cada tres meses sin administración del carcinógeno

químico.

- Grupo 3: 44 animales se inocularon con una primer dosis de MPA y a la semana un único inóculo de MNU y cada tres meses recibieron un reinóculo del progestágeno.
- Grupo 4: 43 animales fueron tratados primero con la dosis de MNU y a la semana se inició el tratamiento con la hormona.
- Grupo 5: 42 animales recibieron un tratamiento similar al anterior pero a los dos meses de estar tratados con MPA se les extrajo el depósito de hormona.

b) Determinación del efecto de la sialoadenectomía en la inducción por MPA + MNU.

Grupos 1, 2 y 3 son los mismos que se utilizaron en el item anterior.

- Grupo 4: 42 animales fueron sometidos a una operación simulada de extracción de las glándulas salivares. Aproximadamente a los 10 días se trataron con la primera dosis de MPA, 2 meses después se administró MNU en condiciones de altos niveles de EGF circulantes (Kordon E. y col., 1994).
- Grupo 5: 41 animales recibieron igual tratamiento de drogas que el grupo 4 pero sin manipulación previa (control de sialoadenectomía).
- Grupo 6: 40 animales fueron sometidos a una operación de extracción de las glándulas salivares y posteriormente recibieron idéntico tratamiento al grupo 4.

c) Determinación del efecto de la ovariectomía en la inducción por MPA + MNU.

- Grupo 1: 22 animales iniciaron su tratamiento con MPA y a la semana recibieron la primera de tres dosis mensuales de MNU, continuando luego con la reinoculación de MPA.
- Grupo 2: 22 animales recibieron idéntico tratamiento al grupo 1, pero una semana antes se sometieron a la extracción de los ovarios.
- Grupo 3: 22 animales se trataron con un única dosis de MNU y a la semana se inició el tratamiento con el progestágeno.
- Grupo 4: 19 animales recibieron idéntico tratamiento al grupo 3, pero una semana antes se sometieron a la extracción de los ovarios.
- Grupo 5: 22 animales se trataron con tres dosis sucesivas y mensuales de MNU.
- Grupo 6: 22 animales recibieron idéntico tratamiento al grupo 5, pero una semana antes se

sometieron a la extracción de los ovarios.

d) Determinación de efecto de MNU sobre la glándula mamaria pretratada con MPA.

- Grupo 1: 42 animales fueron tratados con MPA luego de dos meses se extrajo el depósito de la hormona. Después de transcurrir un lapso de aproximadamente 15 días en que los animales volvieron a ciclar, se les inyectó MNU.
- Grupo 2: 22 animales recibieron un tratamiento idéntico al grupo 1, pero la administración del carcinógeno químico fue de tres dosis mensuales y sucesivas.
- Grupo 3: 22 animales recibieron exactamente el mismo protocolo que el grupo 2, pero una semana antes se sometieron a la extracción de los ovarios.
- Grupo 4: 43 animales fueron tratados con una única dosis de MNU como control sin tratamiento con MPA.
- Grupo 5: 22 animales se trataron con tres dosis sucesivas y mensuales de MNU.
- Grupo 6: 22 animales recibieron idéntico tratamiento al grupo 5, pero una semana antes se sometieron a la extracción de los ovarios.

Los ratones fueron examinados semanalmente para detectar la aparición de tumores. Las mediciones del tamaño tumoral se realizaron mediante calibre Vernier, determinando los dos ejes mayores. Los ratones portadores de tumor fueron sacrificados cuando las lesiones alcanzaron un tamaño tumoral aproximado de 1 cm². Se hicieron autopsias completas que incluían muestras de distintos órganos y tumor para estudios histológicos.

Cuando hubo suficiente material tumoral se guardó según el esquema siguiente de prioridades:

- 1) se fijó en etanol 96° ó formol 10% para estudios histológicos.
- 2) se hicieron trasplantes singeneicos para evaluar la hormono-dependencia.
- 3) se congeló en freezer de -70°C para estudiar RE y RP.
- 4) se congeló en nitrógeno líquido con medio de cultivo conteniendo 5% de suero fetal bovino y 10% de glicerina para futuros trasplantes singeneicos.

Los animales que no desarrollaron tumores después de 10 meses de comenzado el experimento, fueron sacrificados y autopsiados.

A. Estudios histológicos:

Las muestras de tejido normal y patológico (tumores) fueron fijados en formol 10% o etanol 96° y procesado según técnicas de rutina para su inclusión en parafina y los cortes obtenidos se tiñeron con H&E y ácido periódico-Schiff según técnicas de rutina.

Para colorear diferencialmente las estructuras mamarias se utilizó la técnica del montaje total que se describe a continuación:

Luego de sacrificar a los ratones, se disecciona la piel y el tejido subcutáneo que contiene al tejido mamario. La piel estirada se sumerge en formalina tamponada neutra al 10% durante 24 horas o más. Después de la fijación, se disecciona el tejido subcutáneo, que contiene las glándulas mamarias, de la piel. El tejido subcutáneo se sumerge en acetona para eliminar la grasa durante 2 o más días. Se hidrata el tejido en alcoholes de gradación decreciente: 100°, 90° y 70°, durante 1 hora cada uno. Para completar la hidratación se deja el tejido toda la noche en agua destilada. Se colorea en solución de azul de toluidina 0.025% en buffer de McIlvaine durante 2 horas (Buffer McIlvaine: fosfato de sodio 0.04M y ácido cítrico 0.02 M, pH=4.0). Se lava en agua destilada. Se decolora el tejido en metanol absoluto durante 30 minutos y luego con etanol 70° otros 30 minutos. Se lava el tejido en agua destilada y se lo deja toda la noche en agua destilada. Se fija en molibdato de amonio al 4% por 30 minutos. Se lava el tejido en agua destilada y se lo deja toda la noche en agua destilada. Se deshidrata en etanol de gradación creciente: 70°, 90° y 100°, durante 1 hora cada uno. Se aclara en xileno durante toda la noche. Se monta en bálamo separando las mamas torácicas de las abdominales. Se observan en el microscopio y se seleccionan ciertas áreas que se incluyen en parafina y se colorean con hematoxilina-eosina según técnicas de rutina. Se fotografían en un fotomicroscopio Zeiss III.

B. Evaluación de hormono-dependencia:

1. Transplantes singeneicos.

Se realizaron transplantes a 4 ó 6 ratones hembra vírgenes singeneicas por medio de trocar sc., en el flanco inguinal derecho del ratón. Para evaluar la hormono-dependencia de los tumores, la

mitad de los animales fue tratada paralelamente con 0,1 ml (20 mg) de MPA depot contralateralmente al inóculo del tumor. Los tumores fueron medidos dos veces por semana y los ratones fueron sacrificados cuando los tumores tenían un tamaño mayor de 200 mm²

2. Medición de RP y RE.

La medición de receptores esteroideos se realizó por la técnica de precipitación con carbón dextrano utilizando un punto único a saturación (Calandra y col, 1980).

Todos los procedimientos se realizaron a 0-4°C. Las muestras congeladas fueron pesadas y luego de ser trituradas se les agregó Buffer A (20 mM Tris-ClH pH 7,4 conteniendo 1,5 mM de EDTA, 0,25 mM ditiotritol, 20 mM de molibdato de sodio y 10% v/v glicerol) en una proporción de 1 a 4 (peso/volumen) . Las homogeneizaciones se realizaron en un Polytron Pt10 (Brikman Instruments Inc NY) con 3 pulsos de 15 segundos, con un minuto de intervalo de refrigeración en hielo. El homogenato fue centrifugado a 800 x g durante 15 minutos para remover las partículas grandes y el sobrenadante fue nuevamente centrifugado a 105.000 x g durante 60 minutos en una ultracentrífuga (Beckman L2-658). La fracción soluble del sobrenadante (citosol) fue usada inmediatamente en los ensayos de receptores para esteroides (Korenman S. y Dukes B. 1970).

Se tomaron alícuotas de 100 µl de citosol, por duplicado, y se incubaron con [2,4,6,7,-³H] Estradiol (85 Ci/mmol) [³H] (New England Nuclear Corp., Boston MA (NEN) ó 17 [alfa-metil ³H] R5020 (87 Ci/mmol)(NEN) 30 nM. con ó sin un exceso molar de 100 veces de DES o de R5020 sin marcar. La unión de estradiol y de R5020 a globulinas que unen hormonas sexuales o a proteínas de unión a cortisol, fue eliminado por adición de 200 veces en exceso molar de dihidrotestosterona y cortisol, respectivamente. Luego de incubar durante toda la noche en frío, se paró la reacción agregando 100 µl de una suspensión de carbón(5%)-dextrano(0.5%) en Buffer A. Se dejó incubar 10 minutos a 4° C y se centrifugó 10 minutos a 4.000 rpm para eliminar el radioactivo no unido al receptor (Calandra R. 1980). 100ul del sobrenadante fueron contados en un contador beta (Beckman). Los resultados fueron expresados en fentomoles por miligramo de proteína de citosol. Las proteínas fueron medidas por el método de Lowry (Lowry O. y col., 1951).

3. Respuesta a los estrógenos de los tumores transplantados.

Se estudió la respuesta a E_2 en 5 tumores incluyendo el único con expresión significativa de RE y RP. Se evaluó el efecto del agregado de E_2 en ratones portadores de tumor con un tamaño aproximado de 1 cm² y el efecto del inóculo de tumores en animales pretratados con E_2 (implantación del pellet: 5-6 días antes que el inóculo tumoral). En el caso de tumores progestágeno-autónomos el pellet se administró en animales tratados y en no tratados con MPA. En el caso del tumor progestágeno-dependiente (PD), los pellets se administraron solamente en animales tratados con MPA depot ya que no crecen en ausencia de progestágeno. En estos experimentos se utilizaron de 3 a 6 ratones por grupo.

C. Caracterización de la inmunogenicidad de los tumores inducidos:

Se evaluó el grado de inmunogenicidad en un tumor inducido por MNU y en otro inducido por MNU y MPA utilizando el test de implante y escisión.

1. Test de implante y escisión.

Se realiza el implante tumoral en forma sc. y se lo extirpa cuando alcanza un tamaño tumoral de 100 mm²; una o dos semanas posteriores a esta escisión se desafía con un segundo implante de tumor en el flanco contralateral del ratón que no haya vuelto a desarrollar crecimiento tumoral del primer implante (Ruggiero R.A. y col., 1985).

2. Determinación de la dosis tumoral 50 (DT₅₀)

La dosis tumoral 50 (DT₅₀) es aquella que produce la toma de un inóculo tumoral en el 50% de los individuos desafiados. Para calcularla se inocularon s.c. grupos de ratones (n=6) con distintas concentraciones de células tumorales que abarcaban el rango de 10⁵ a 10⁴ células/ml, resuspendidas en PBS. Se evaluó el porcentaje de toma tumoral en cada grupo experimental y se halló el valor de DT₅₀ por extrapolación. Se repitieron los ensayos por lo menos 3 veces para calcular una DT₅₀ media.

Se calculó así un cociente entre la DT₅₀ de ratones previamente inmunizados y de ratones control. Según parámetros establecidos, los tumores pueden comportarse como altamente inmunogénicos, de inmunogenicidad media o no inmunogénicos (Ruggiero R.A. y col., 1985).

VI. Determinación por radioinmunoanálisis de EGF en suero (EGF-S) en animales tratados con MPA:

Animales intactos, sialoadenectomizados y con operación simulada se trataron con una dosis de 40mg de MPA, 7 días post-intervención quirúrgica. A distintos tiempos de comenzada la administración de la hormona, se extrajeron muestras de sangre para obtener los sueros a estudiar, que fueron guardados a -20°C. Considerando la periodicidad circadiana de los niveles de EGF plasmáticos todos los sangrados se realizaron a las 10 de la mañana (Krieger D. y col., 1976).

Para la determinación por radioinmunoanálisis, se incubaron 100 µl de EGF estándar de ratón (Collaborative Res.) o de muestras, 100 µl de anticuerpos α -EGF en conejo (Collaborative Res., dilución final 1:300000) y 100 µl de ^{125}I -EGF (20000 dpm). El buffer de ensayo consistió en fosfato 0.05M, ClNa 0.1M, con azida sódica 0.005% y 0.2% de albúmina sérica bovina. Las mezclas se incubaron durante toda una noche a temperatura ambiente. Se agregaron 100 µl de suero normal de conejo (1:3 v/v) y 100 µl de anticuerpo secundario (α -IgG de conejo). Se incubó 12 horas más y se centrifugó a 3000g por 20 minutos, se descartaron los sobrenadantes y se contaron los precipitados en un espectrómetro de centelleo gamma. Las muestras y los estándares se ensayaron por triplicado. El límite de detección fue de 25 pg.

VII. Estudios inmunológicos: determinación del estado inmunológico de ratones tratados con MNU y MNU + MPA:

A. Título de anticuerpos antiglobulinos rojos de carnero (GRC).

1. Efecto de MNU y MPA.

Se usaron lotes de animales de diez o doce animales cada uno y recibieron:

Grupo 1: MPA depot s.c. 40 mg;

Grupo 2: MNU i.p. 50 mg/kg;

Grupo 3: MPA y a la semana una dosis de MNU;

Grupo 4: control sin tratamiento.

Consideramos día 0 la fecha de inóculo de MNU. Se evaluó el estado inmunológico de los

animales evaluando la capacidad de estos animales de generar anticuerpos antiglobulinos rojos de carnero (GRC).

A los 7, 30 o 90 días de haber iniciado el tratamiento con MNU se inoculan con 0.5 ml de GRC al 1% vía i.p. y a los 7 días posteriores se extrae el suero de los animales (sangrado por punción retrorbital) para la medición de la respuesta primaria. Al mes se realiza un segundo inóculo de GRC en iguales condiciones y una semana después se extraen nuevamente los sueros para la medición de la respuesta secundaria. Todos los sueros fueron deplementados por espacio de media hora a 56°C y luego se determinó el título de anticuerpos hemaglutinantes contra GRC. Para ello, se prepara una dilución 1:5 de cada suero en PBS conteniendo 0.1% SFB y se continúa en forma seriada con diluciones al medio, agregándole la suspensión de GRC en una concentración final de 0.25%. Se incubaba por más de 4 horas a temperatura ambiente y se lee el título de anticuerpos hemaglutinantes, considerando que la última dilución que aglutina es la del punto final de la titulación, por lo que la inversa de esta última dilución representa el título de anticuerpos en el suero sin diluir (Margni RA., 1980; Salaman M. y Wedderburn N., 1966).

2. Caracterización del efecto progestacional del MPA en respuesta inmune a través del antiprogestágeno onapristona.

Utilizamos grupos de animales de seis ratones cada uno y se trataron como sigue:

Grupo 1: MPA depot 40 mg s.c.

Grupo 2: Ona suspendida en PBS en dosis diarias de 10 mg/kg s.c. en estudios de respuesta primaria y en forma de pellet de 1,7 mg en los estudios de respuesta secundaria.

Grupo 3: combinación simultánea de ambos tratamientos.

Grupo 4: control sin tratamiento.

Nuevamente se calculó el título de anticuerpos hemaglutinantes como se explicó anteriormente.

3. Comparación entre el efecto del MPA administrado en forma de pellet y el inoculado como depósito de microcristales.

Partimos de tres grupos de 6 animales cada uno y recibieron:

Grupo 1: MPA depot s.c. (40 mg)

Grupo 2: MPA pellet s.c.(40 mg)

Grupo 3: grupo control sin tratamiento.

Los ensayos se realizaron por la técnica de hemaglutinación descripta anteriormente.

B. Ensayo de hipersensibilidad retardada a antígenos de GRC.

Paralelamente a la extracción de los sueros, a los 7 días se les reinocula una dosis de 10^8 GRC/0.1 ml en la almohadilla plantar para medir la hipersensibilidad retardada. En la hipersensibilidad retardada se mide la inflamación por afluencia de leucocitos que infiltran dicha zona en la misma pata del animal que recibió el inóculo de antígeno a los 7 días. Se realiza la comparación con la pata opuesta sin ningún tratamiento y en algunos animales de cada lote se aplica una inyección de solución fisiológica en la pata opuesta para descartar una inflamación inespecífica.

VIII. Estudios estadísticos:

Para evaluar la incidencia tumoral actuarial se usó el cálculo del producto límite estimado de la distribución de Kaplan-Meier; la igualdad de distribución fue ensayada con el log-rank test (Kaplan E. y Meier P., 1958. Peto R. y col., 1977). Para evaluar las diferencias de latencias de aparición tumoral, y las diferencias de título de anticuerpos en la hemaglutinación, se usó el test 't' de Student para variables independientes. Para comparar el peso de los ratones según los distintos tratamientos, se usó el análisis de varianza (ANOVA) y para comparar las diferencias entre grupos el test 't' de Tukey. Para comparar las incidencias tumorales en mama respecto del estadio estral de las hembras al comenzar el tratamiento con el carcinógeno químico, se utilizó el test de X^2 . En los ensayos de inmunogenicidad se usó el test 't' de Student para comparar las dosis tumorales 50 entre controles y animales inmunizados. Las diferencias de todos los datos fueron consideradas como significativas cuando el valor de P era <0.05 . Se evaluaron las diferentes alteraciones morfológicas en distintos grupos de tratamiento de los úteros utilizando el test de Fisher.

RESULTADOS

I. Evolución del peso de ratones tratados con distintos protocolos de MNU y MPA.

Para contar con un parámetro que permitiera la evaluación de la toxicidad de MNU a las dosis usadas, se midió la variación de peso en los animales en función del tiempo. Se utilizaron animales hembra BALB/c que fueron tratados con MPA sólo y MNU en una o 3 dosis, en ratones sin o con pretratamiento de MPA.

Mientras los animales controles aumentan casi un 10% de su peso al cabo de 150 días ($p < 0.01$) los ratones tratados con MPA incrementan su peso en aproximadamente un 30% ($p < 0.001$), lo que se debe al ya descrito efecto anabólico de esta hormona (Hynes N. y col., 1992) (**Tabla 1 y Figura 4**). El tratamiento con dosis única de MNU, si bien induce un descenso leve del peso corporal a los diez días, no modifica el peso de los animales con respecto a los controles a los 150 días. Los ratones tratados con 3 dosis de MNU no experimentan el aumento de peso registrado en los controles, más aún, al cabo de 150 días se observa que han perdido el 3% de su peso con respecto al día 0. Sin embargo, esta diferencia no es significativa. El tratamiento con MPA induce un aumento significativo de peso en ambos grupos ($p < 0.01$). Cabe destacar que el efecto anabólico del MPA ya se evidencia al día 10 de tratamiento ($p < 0.001$).

De los resultados expuestos se deduce que:

- a) los cambios de peso inducidos por MNU sugieren que es más ventajoso el uso de una dosis que tres dosis;
- b) el MPA ejerce un efecto anabólico que logra atenuar los efectos sobre el peso causados por el MNU.

II. Morfología de las glándulas mamarias de ratones tratados con MNU o MNU y MPA (Montajes totales).

En los animales tratados con una sola dosis de MNU no fueron evidentes cambios morfológicos de la glándula en el montaje total, luego de un mes de tratamiento, manteniéndose las

Figura 4

Variación del peso en ratones tratados con MNU y MPA

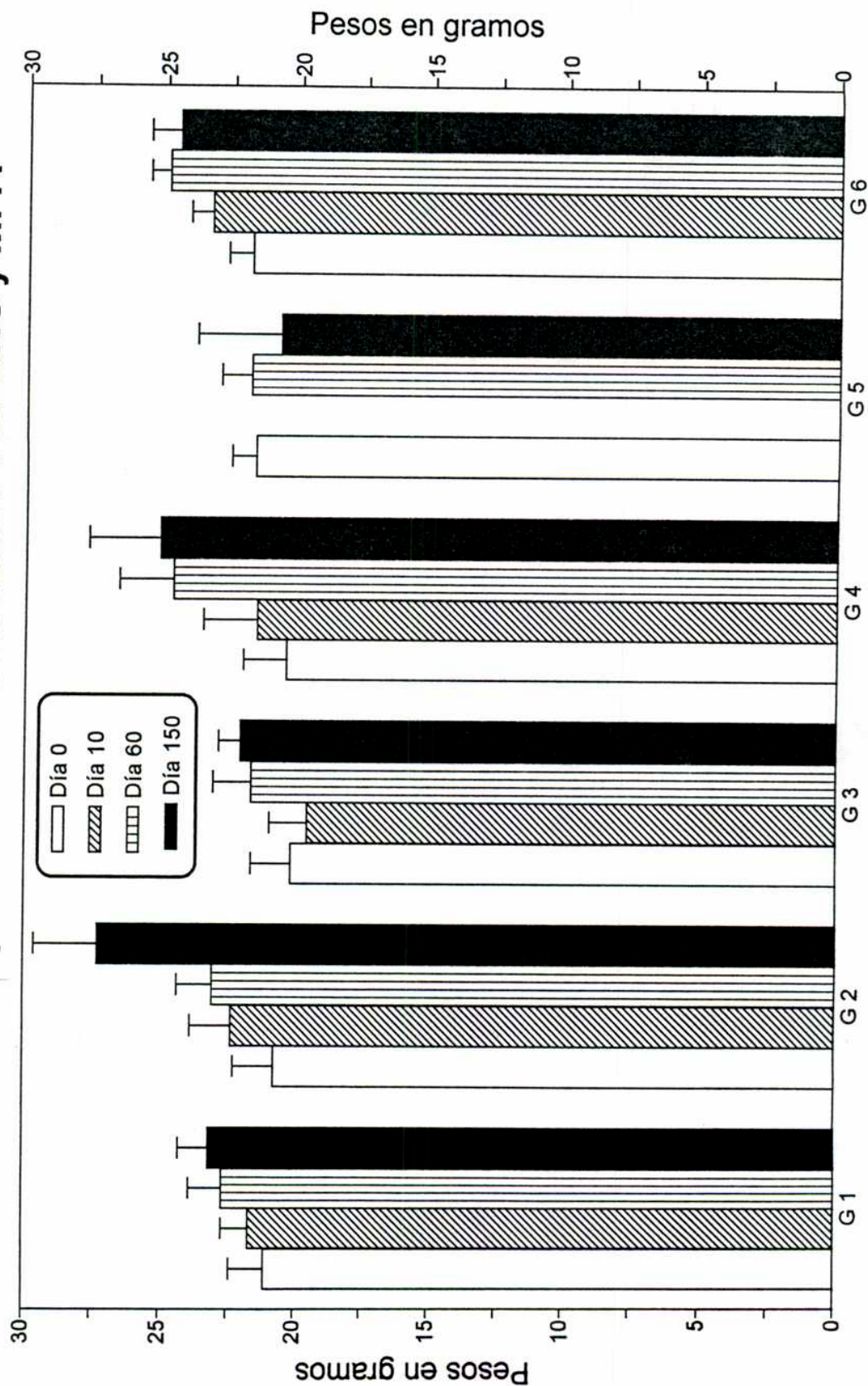


TABLA I
VARIACIÓN DEL PESO (X ± DS) EN FUNCIÓN DEL TIEMPO
DE RATONES TRATADOS CON MNU Y MPA.

PROTOCOLO	DIA 0	DIA 10 (DIF.)*	DIA 60 (DIF.)	DIA 150 (DIF)
1	21.1 ± 1.3	21.7 ± 1 (2.8%)	22.7 ± 1.2 (7.8%)	23.2 ± 1.1 (9.9%) ¹
2	20.8 ± 1.5	22.4 ± 1.5 (7.7%) ⁰	23.1 ± 1.3 (11%) ⁰	27.3 ± 2.3 (31.2%) ^{1 3}
3	20.2 ± 1.5	19.6 ± 1.4 (-3%) ²	21.7 ± 1.4 (7.4%) ^{0 1 2}	22.1 ± 0.8 (9.4%) ^{1 2}
4	20.4 ± 1.6	21.5 ± 2 (5.4%) ²	24.6 ± 2 (21%) ¹²	25.1 ± 2.6 (23%) ^{1 2}
5	21.6 ± 0.9	N.D.	21.8 ± 1.1 (0.9%) ²	20.7 ± 3.1 (-3%) ²
6	21.8 ± 0.9	23.3 ± 0.8 (6%)	24.9 ± 0.7 (11%) ^{1 2}	24.5 ± 1.1 (11%) ^{1 2 3}

X : MNU 50 mg/kg.

▼ : implante de MPA depot 40 mg.

ND: no determinado

DIF: diferencias de peso entre el día 0 y el día de la medición.

⁰ p<0.001 en cada grupo respecto al día 150.

¹ p<0.01 respecto día 0 del control.

² p<0.01 grupos 3 vs 4; 5 vs 6 dentro del día.

³ p<0.01 grupos 6 vs 2 en el día 150.

características típicas de poco desarrollo descriptas para la mama del ratón vírgen (**Figura 5A y B**). No se observaron alteraciones ductales o lobulillares que puedan ser relacionadas con una acción del carcinógeno, ni de la acción hormonal.

En los animales tratados con tres dosis de MNU se observó un rango de alteraciones en las cuales se observaron cuadros como el de la **Figura 6**, una glándula mamaria con muy pocas ramificaciones y sin desarrollo lobulillar evidente, imagen ésta poco distinguible de una mama vírgen que ha transcurrido algunos ciclos estrales. En la **Figura 7**, se presenta un cuadro con mayor desarrollo, en el que se observa un proceso hiperplásico caracterizado por la presencia de conductos mamarios de trayecto y diámetro irregulares, con extensa proliferación paraductal de pequeños brotes que remedan botones terminales. En este caso la hiperplasia se encuentra exclusivamente representada por la proliferación de estos brotes, ya que no se observa en este área un aumento del número de conductos mayores o hiperplasia lobulillar. La **Figura 8** muestra una glándula mamaria con alteraciones en el recorrido de los conductos, con dilataciones y constricciones. El número de ramificaciones es discreto, pero en este caso son evidentes estadíos tempranos de hiperplasia lobulillar. Es de destacar que este rango de lesiones parecen ser distintos estadíos evolutivos de una misma lesión y que con frecuencia coexistían en distintas glándulas mamarias de un mismo animal.

En ratones que habían sido tratados con MPA antes de comenzar el tratamiento con MNU, se observaron las lesiones ductales características de la acción del MPA tales como hiperplasia paraductal (**Figura 9**), alteraciones de la forma y trayecto de los grandes conductos (**Figura 10**) y las hiperplasias lobulillares asociadas con la acción progestacional prolongada (**Figuras 11 y 12**). La morfología de algunas áreas ductales terminales, caracterizada por la dilatación de los conductos con almacenamiento de un material laminado que se colorea poco con el azul de toluidina, sugieren ya la aparición de diferenciación pavimentosa (escamas córneas), aún cuando no parece haberse establecido todavía la lesión neoplásica carcinomatosa (**Figuras 13, A y B, y 14**). Se podría decir que ésta sería una de las diferencias más marcadas en los montajes de mamas de ratones tratados con MNU + MPA y MPA sólo.

En animales ovx la administración de MNU no modificó la morfología atrófica (**Figura 15**),

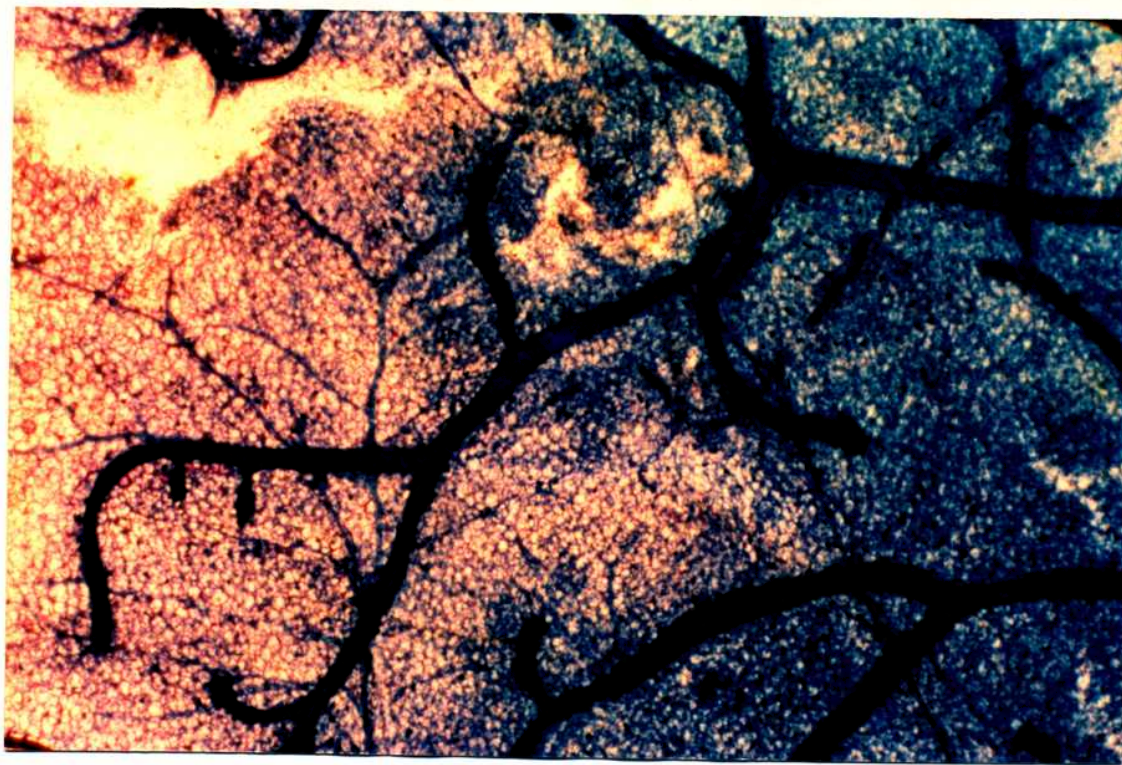


Fig. 5A

La foto muestra conductos mamarios con escasas ramificaciones y bifurcaciones, que terminan en una masa dilatada. No existe proliferación lobulillar o ductal, ni dilataciones de los conductos. La imagen remeda la de una mama que no ha sufrido estímulos hormonales, imagen que se observa en hembras vírgenes (Azul de toluidina, 25x).

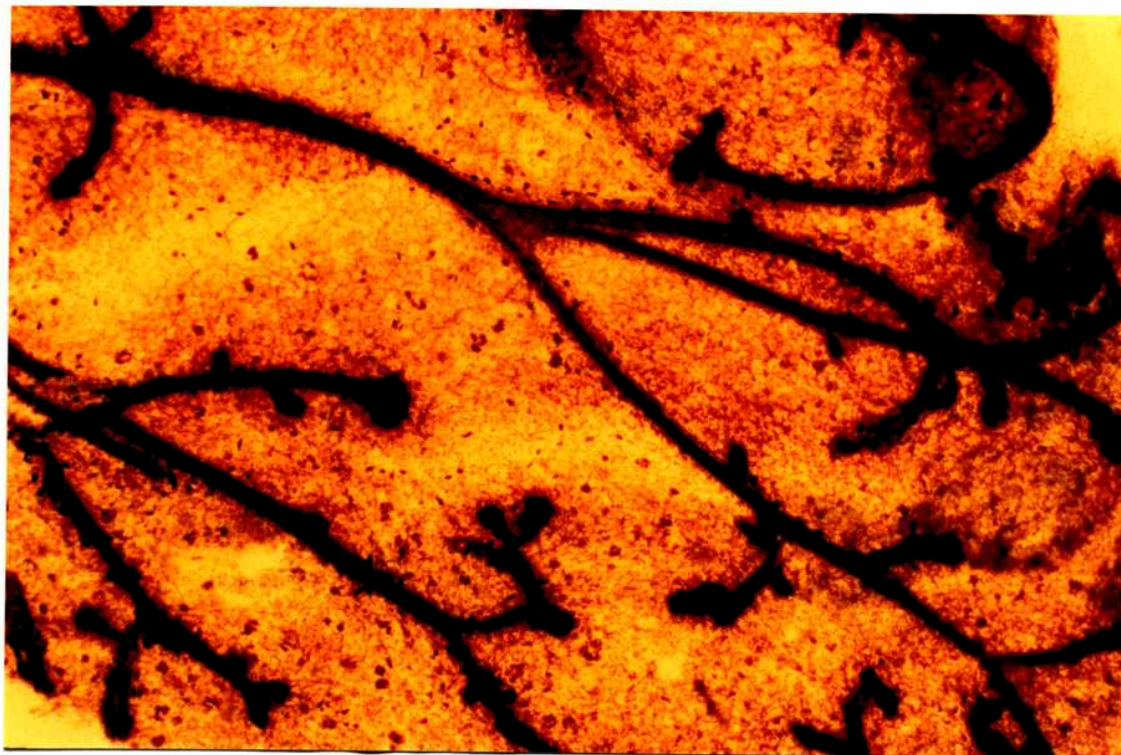


Fig. 5B

Corresponde también a una mama virgen con desarrollo característico de los estímulos hormonales de los ciclos estrales (Azul de toluidina, 25x).

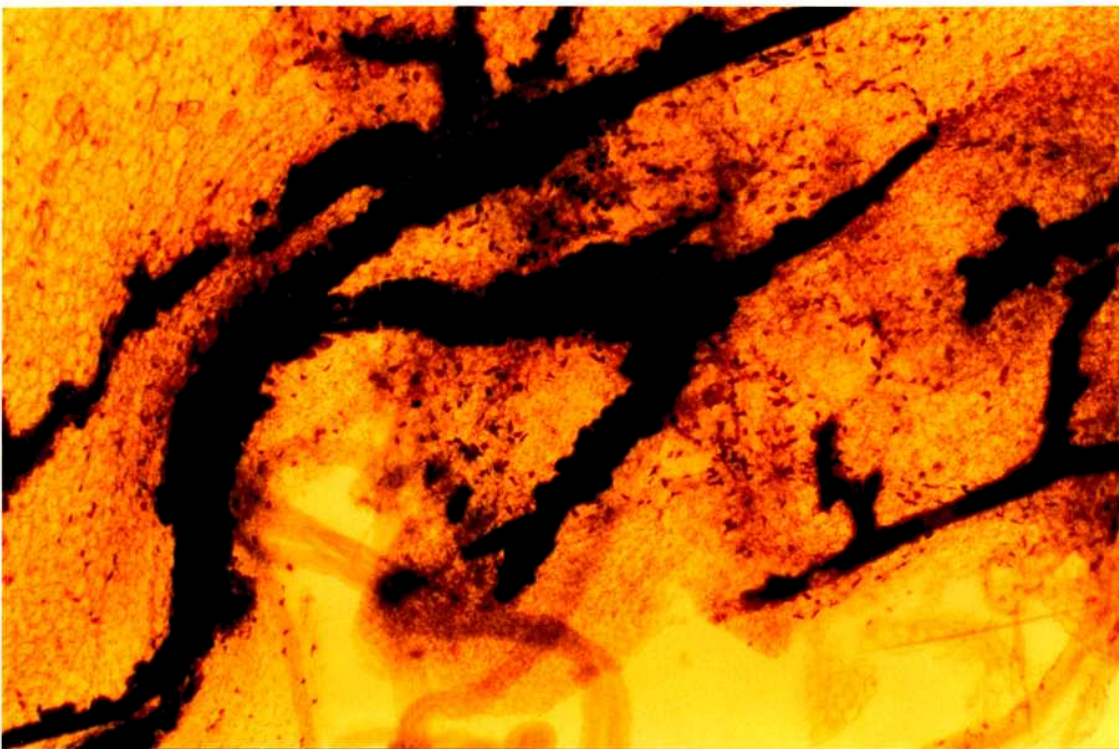


Fig. 6 Se observan conductos más desarrollados, pero sin desarrollo lobulillar. Este tipo de imágenes son similares a las encontradas en animales vírgenes, sin estimulación hormonal exógena, que hayan transcurrido algunos ciclos estrales (Azul de toluidina, 25x).

Fig. 7 Glándula mamaria hiperplásica con conductos mamarios de trayecto y diámetro irregulares, extensa proliferación paraductal de pequeños brotes que remedan botones terminales, y número discreto de ramificaciones. No hay desarrollo lobulillar (Azul de toluidina, 25x).

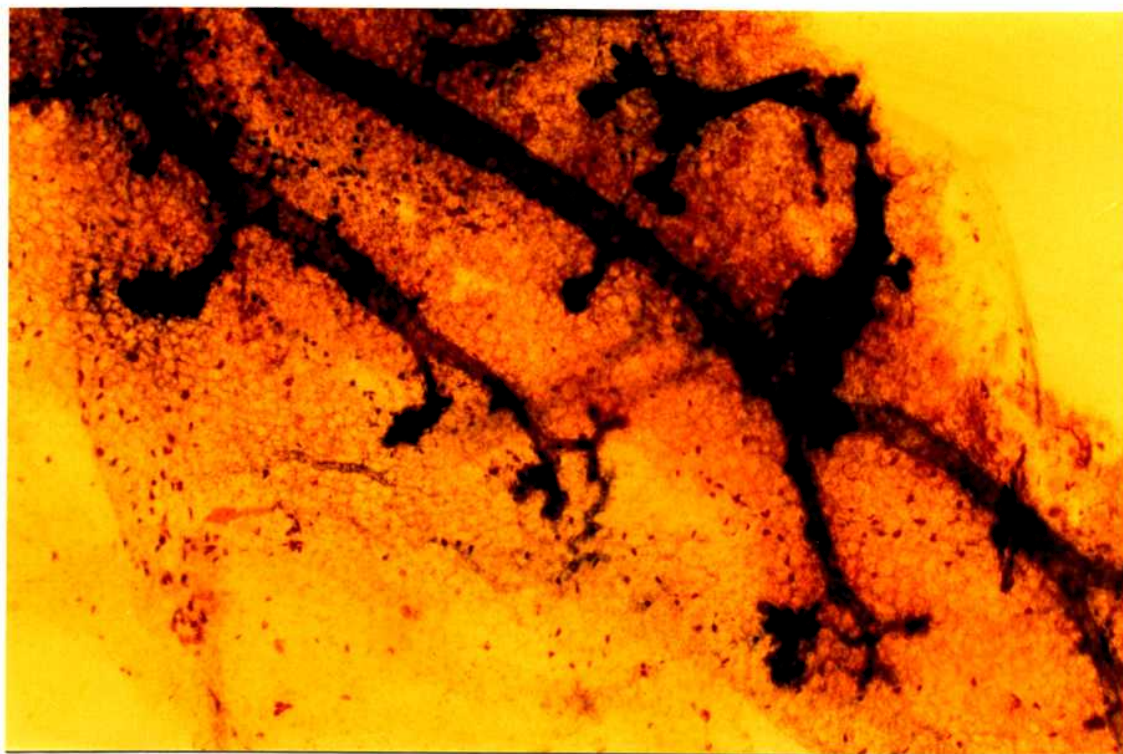


Fig. 8 La glándula mamaria muestra conductos con dilatación irregular y constricciones, con discreto número de ramificaciones y presencia de estadios tempranos con hiperplasia de tipo lobulillar de los botones terminales (Azul de toluidina, 25x).

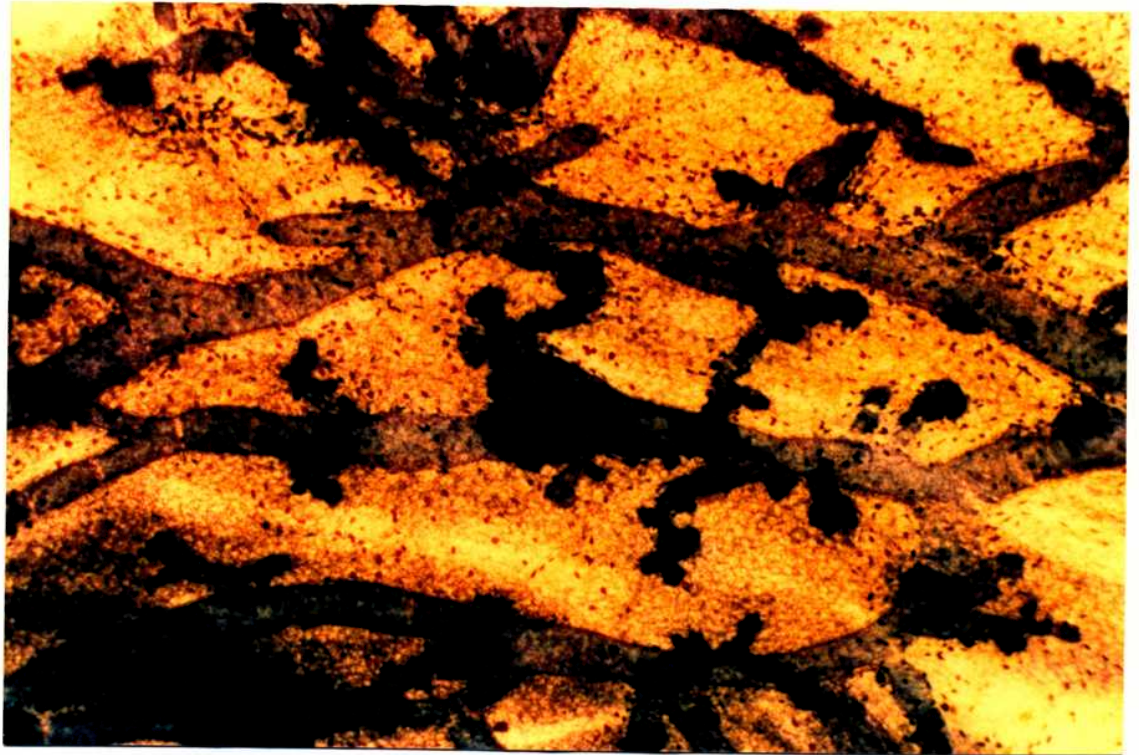
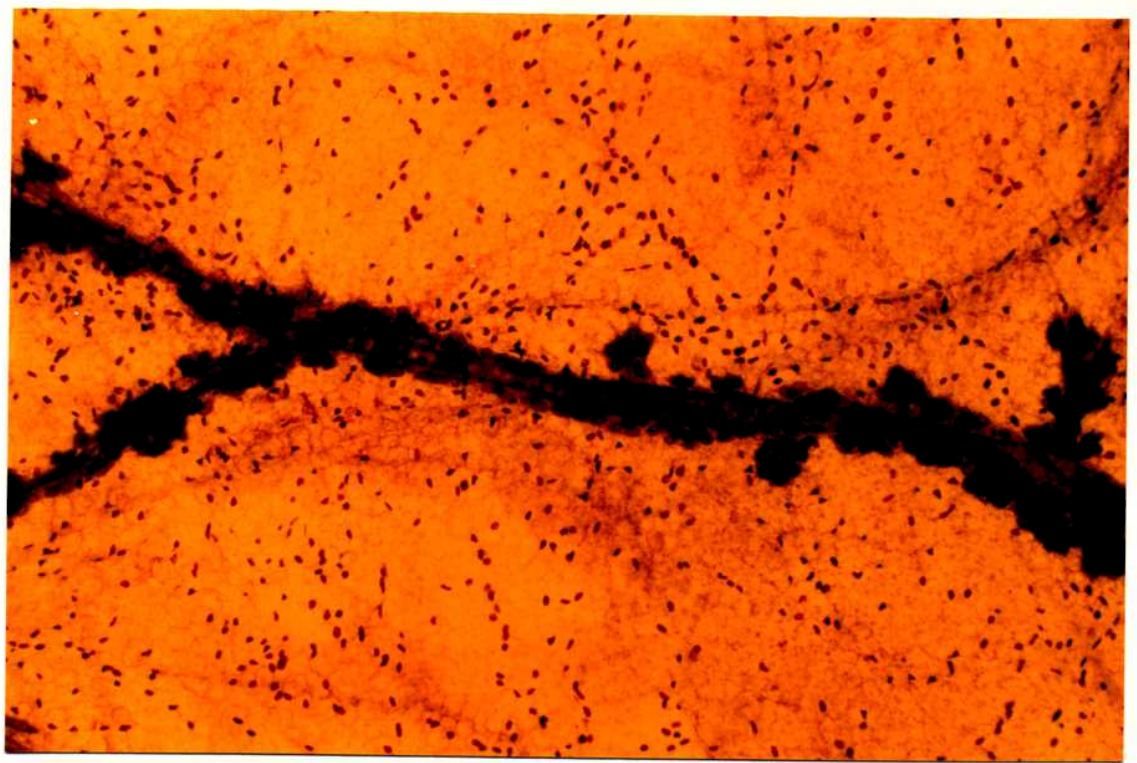


Fig. 9 Conducto mamario de trayecto rectilíneo y de límites netos, con hiperplasia caracterizada por la presencia de numerosos brotes paraductales. En algunos casos estos brotes parecen tender a constituir estructuras pseudolobulillares (Azul de Toulidina, 25x)

Fig. 10 Se observa un aumento del número de conductos, con dilataciones irregulares que acompañan con un número moderado de ramificaciones y signos de hiperplasia moderada de los botones terminales (Azul de toluidina, 25x).

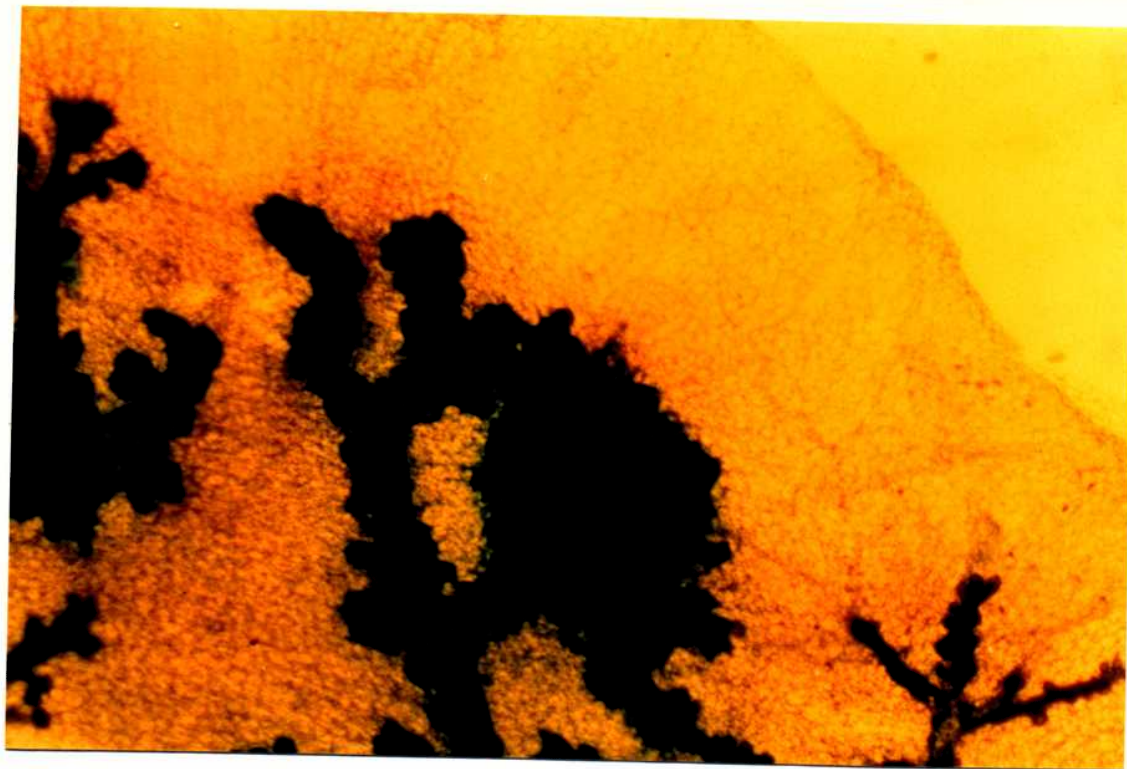


Fig. 11 Imagen característica de una hiperplasia lobulillar, sin aumento significativo del número de estructuras ductales. En áreas, los lobulillos hiperplásicos se encuentran enormemente desarrollados (Azul de toluidina, 25x).

Fig. 12 Con gran aumento se observa una glándula mamaria con una marcada hiperplasia de tipo lobulillar y aumento en el número de ramificaciones (Azul de toluidina, 25x).

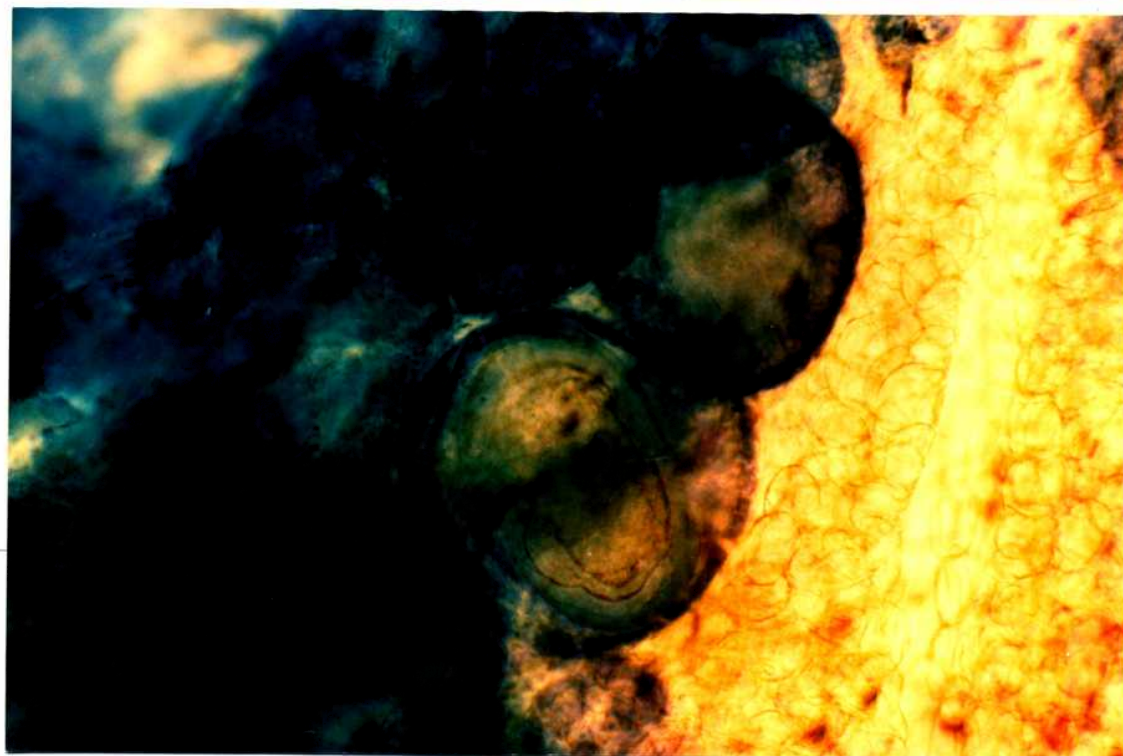
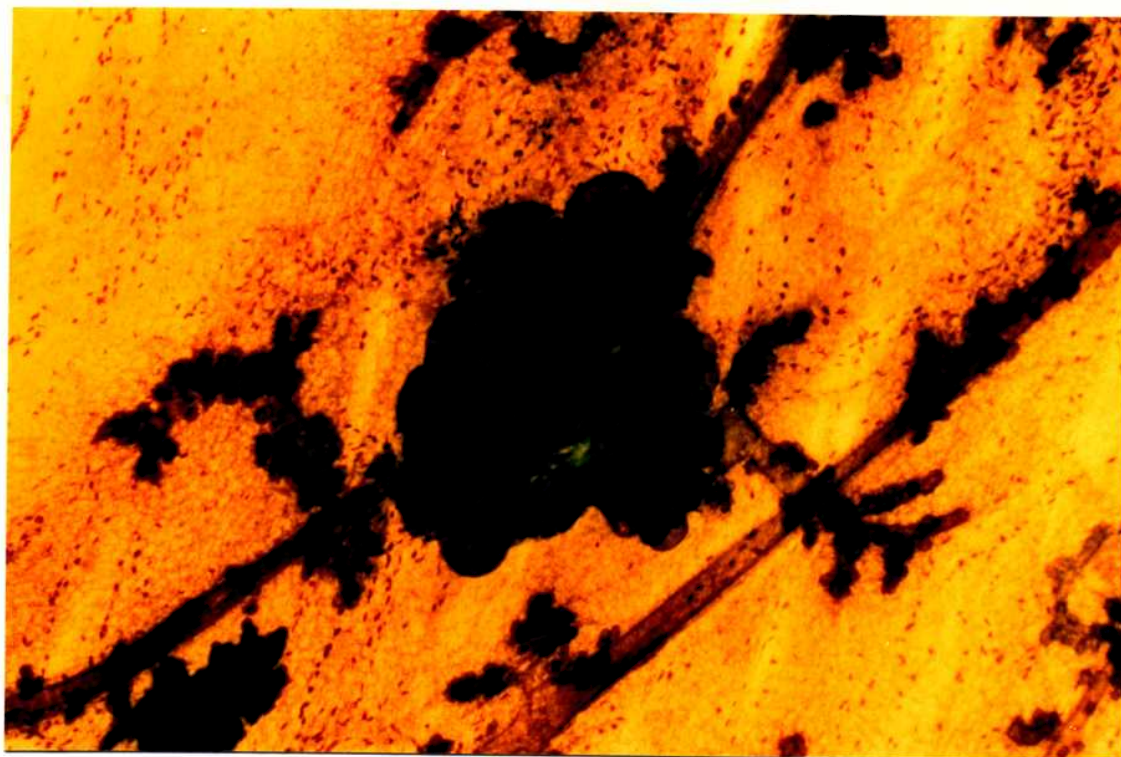


Fig. 13A Lobulillo dilatado, en la que se pueden identificar cuerpos laminados que rellenan la estructura. Esta imagen representa una visión panorámica de los fenómenos de metaplasia pavimentosa que son casi patognomónicos de la acción del MNU (Azul de toluidina, 25x).

Fig. 13B A mayor aumento se observan más claramente los cuerpos laminares (Azul de toluidina, 100x).

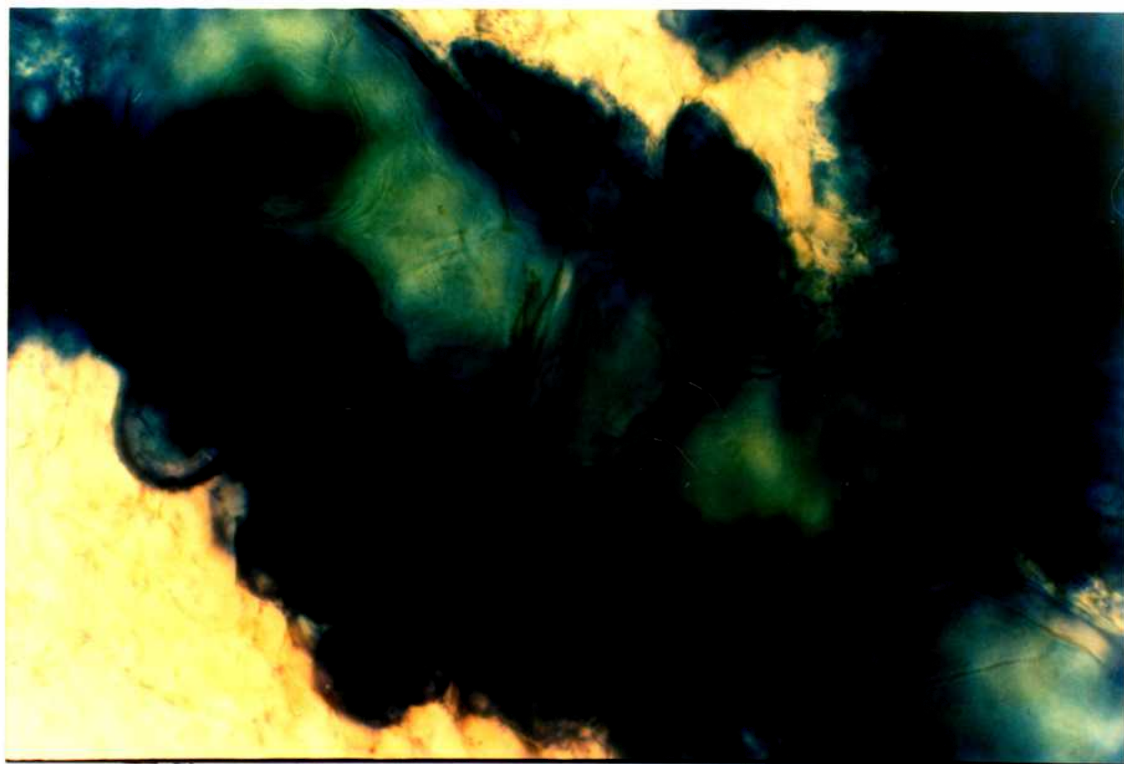


Fig. 14 Una imagen similar a la mostrada en la figura anterior, en la que se puede observar los cuerpos laminado de la metaplasia pavimentosa típica de la acción del MNU (Azul de toluidina, 25x).

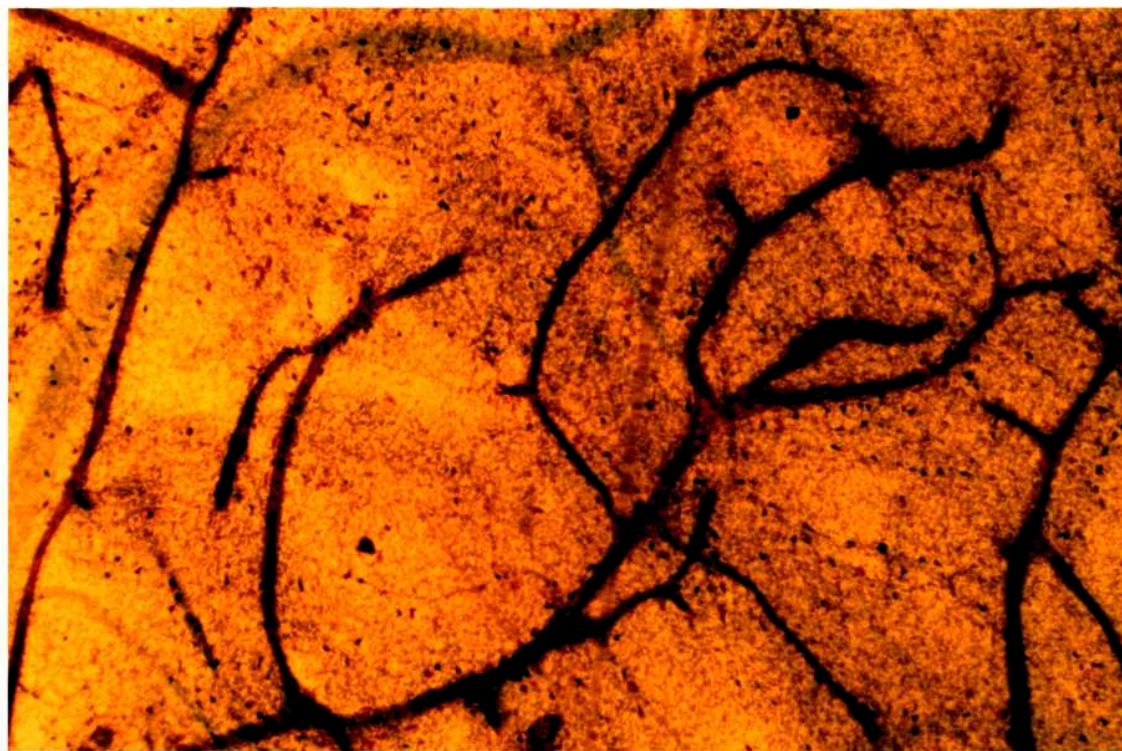


Fig. 15 Imagen de una mama atrófica típica de un animal ovx. Los conductos son sumamente finos, casi filamentosos. A esto se asocia un escaso número de ramificaciones y a la ausencia de desarrollo de los botones terminales (Azul de toluidina, 25x).

con conductos afinados y masas terminales delgadas, características de los ovx controles. Los ratones ovx tratados con MPA mostraron en cambio un marcado efecto hormonal, con áreas de glándula mamaria bien desarrolladas y focos de hiperplasia lobulillar (**Figura 16**).

Se estudió también el efecto del tratamiento durante dos meses de MPA y luego de la extracción del mismo el inóculo de MNU, en ratones enteros y ovx. En los animales enteros, luego de cierto tiempo, las alteraciones de la mama retrogradan y se dejan de reconocer las imágenes típicas del efecto del MPA. Antes de la suspensión del tratamiento de MPA existen todavía muchas ramificaciones (**Figura 17**), con el tiempo éstas van disminuyendo y la imagen se asemeja a la de una hembra virgen, si bien la glándula nunca retoma la morfología original.

En forma similar se estudió el efecto de la sialoadenectomía sobre la morfología de la glándula mamaria en ratones tratados con MNU y MPA. En los ratones sialo, las mamas presentaron un aspecto hipoplásico con menor desarrollo general de toda la glándula mamaria, lo que se objetivizó por una menor cantidad de ramificaciones, más evidente en la porción distal de la glándula y por menor cantidad de estroma. El efecto se hace más evidente después de los dos meses (**Figuras 18 y 19**). No hubo diferencias entre los animales de operación simulada y los controles.

III. Adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA y MNU.

A. Morfología.

En trabajos previos hemos descripto que el MPA, después de un año de iniciado el tratamiento, induce adenocarcinomas mamarios principalmente ductales mientras que los inducidos por progesterona son en su mayoría lobulillares (Kordon E. y col., 1993). En este trabajo los adenocarcinomas mamarios inducidos por MNU o MNU y MPA fueron adenocarcinomas de tipo lobulillar con distintos patrones de crecimiento histológico. Teniendo en cuenta que está descripto en otros modelos experimentales que MNU induce carcinomas con metaplasia pavimentosa (Guzman R. y col., 1992), y que ésta parece constituir una característica distintiva de estos tumores, se decidió clasificarlos en base a la presencia o ausencia de esta característica: **tipo I**, sin metaplasia y **tipo II**, con metaplasia pavimentosa.

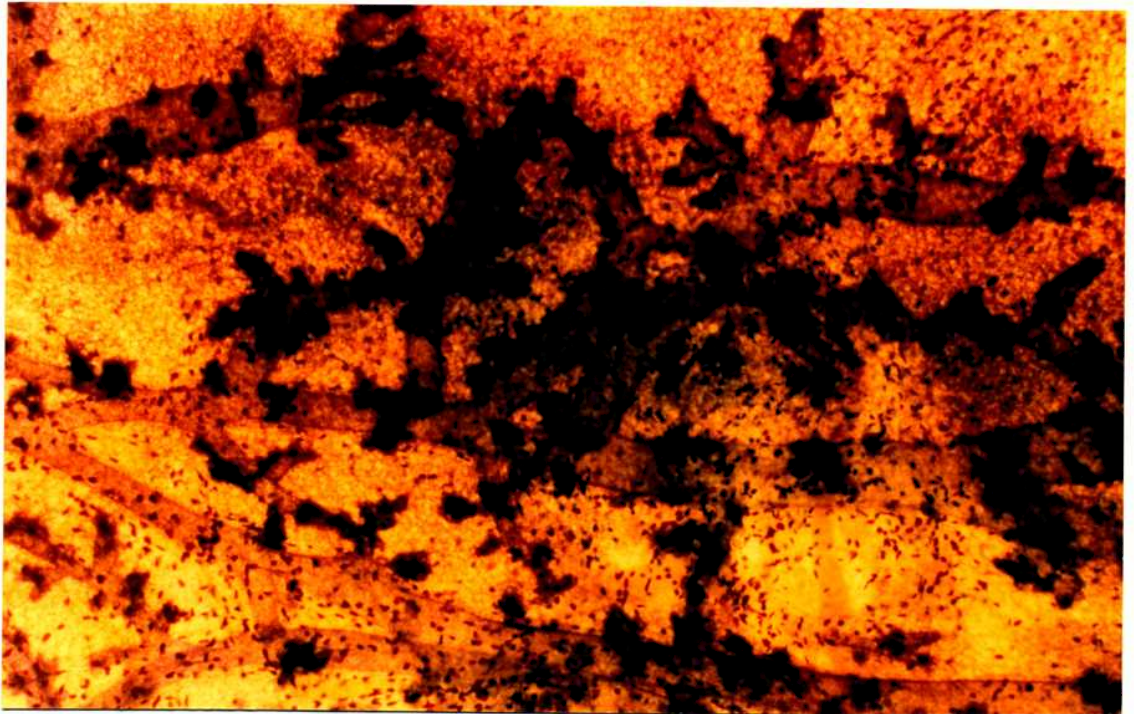
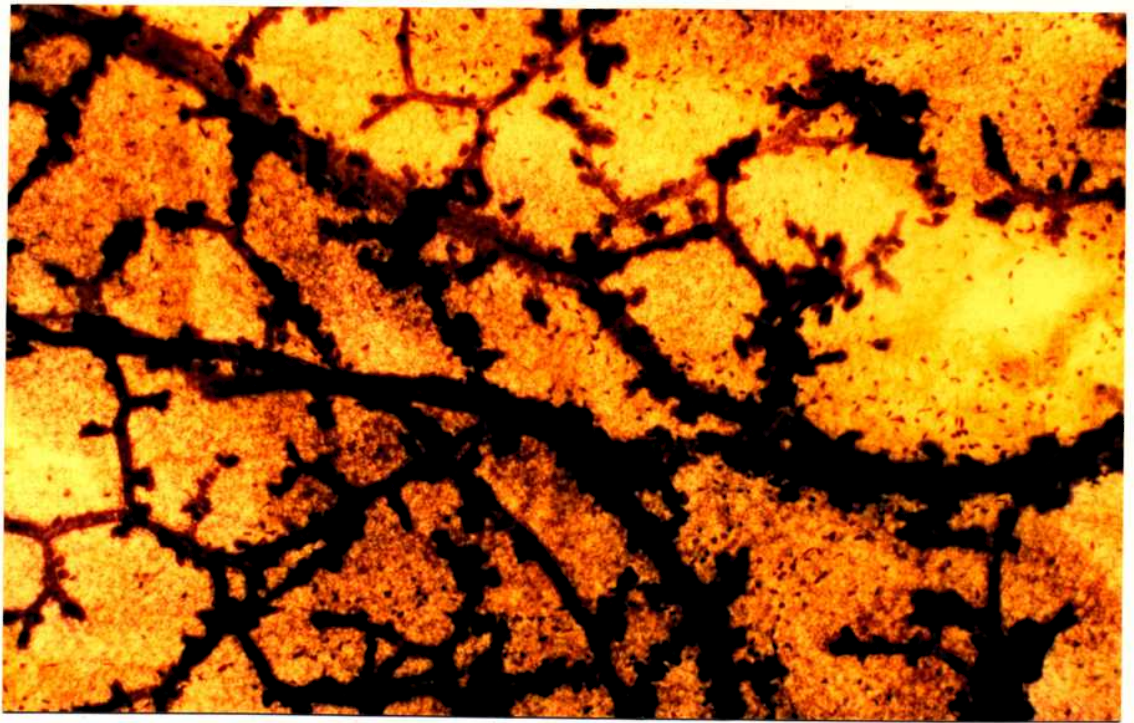
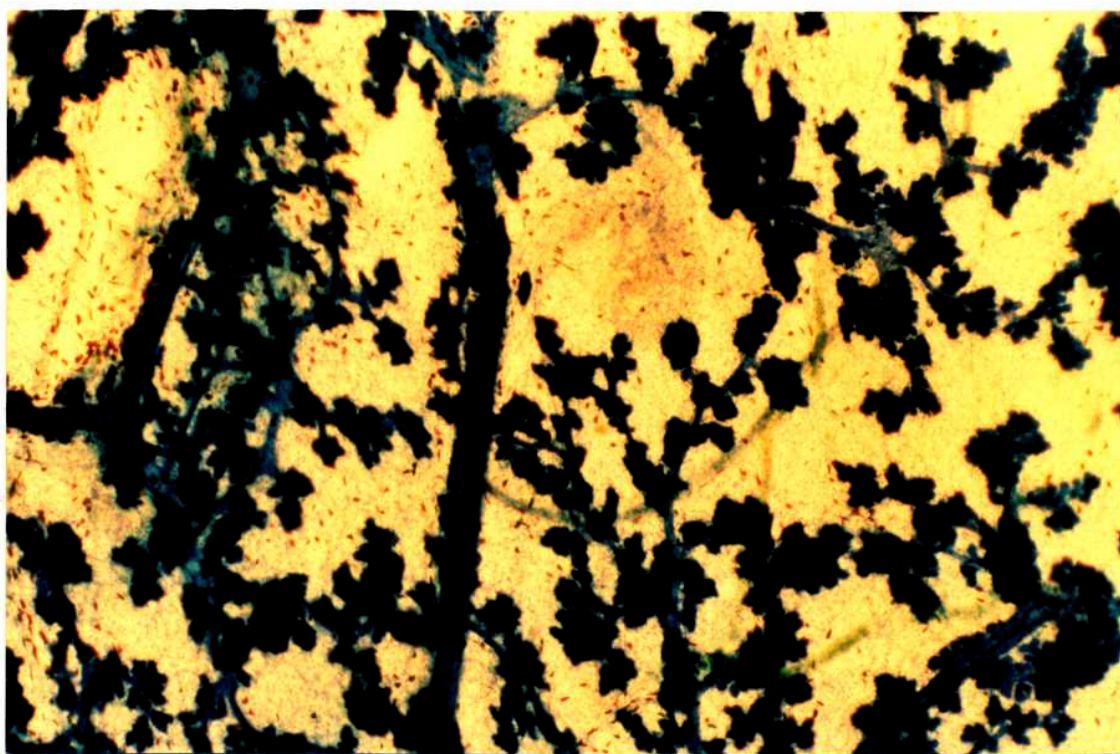


Fig. 16 La glándula mamaria presenta llamativas alteraciones de los conductos con dilataciones y recorrido irregulares y focos de estrechamiento. Existe un evidente aumento del número de ramificaciones. No se observan signos de hiperplasia lobulillar en este caso (Azul de toluidina, 25x).

Fig. 17 A pesar de que existe un aumento del número de ramificaciones y desarrollo moderado de los brotes terminales en esta glándula mamaria, las estructuras ductales impresionan con hipoestimuladas, en áreas con el mismo aspecto filamentososo descrito para la mama de un animal ovx (Azul de toluidina, 25x).



- Fig. 18 Existe en esta glándula un notable incremento del número de ramificaciones con tendencia al desarrollo lobulillar. No se observan alteraciones ductales (Azul de toluidina, 25x).
- Fig. 19 La imagen histológica corresponde a un ratón sialoadenectomizado, tratado con MNU + MPA (Azul de toluidina, 25x).

La **Figura 20** muestra un corte transversal de una hiperplasia lobulillar en el que se observa un conducto central dilatado, con secreción intraluminal, rodeado de estructuras acinares, que también contienen secreción en su interior.

Si bien los aspectos biológicos de todos los tumores parecen ser similares, los patrones histológicos mostraron gran heterogeneidad, que en ocasiones se verificó aún dentro de un mismo tumor. Un caso típico de esta complejidad se ejemplifica en la **Figura 21, A y B**, en la que se observa un tumor complejo, constituido por áreas sólidas, micro y macroglandulares, focos cribiformes, etc. En general, los tumores más anaplásicos, compuestos por grupos sólidos, cordones o lóbulos irregulares de elementos celulares poco diferenciados sin ninguna tendencia a la formación de estructuras histológicamente reconocibles (**Figura 22**), estuvieron relacionados con un mayor índice mitótico que en algunos alcanzaba a más de dos mitosis por campo de mayor aumento (**Figura 23**). Aún dentro de este patrón de crecimiento a veces se pudieron diferenciar dos poblaciones celulares (**Figura 24**), estrechamente vinculadas entre sí. El conjunto adoptaba un aspecto organoide, con la población menos diferenciada remediando el componente estromal. Otros tumores estaban constituidos por lóbulos sólidos, separados por tabiques conectivos, sin diferenciación evidente y con alto índice mitótico (**Figura 25**). En ocasiones estas estructuras lobulares se encontraban delimitadas por grupos celulares dispuestos en "empalizada" (**Figura 26**).

Los tumores más diferenciados mostraron patrones de proliferación dominados por la formación de estructuras lobulares de aspecto más regular, con tendencia a la diferenciación glandular (**Figura 27**) o cribiforme (**Figura 28**). Algunos tumores estuvieron formados por estructuras glandulares pequeñas aunque heterogéneas en tamaño y con diferentes grados de diferenciación citológica (**Figuras 29, 30 y 31**). Otros tumores diferenciaban estructuras glandulares de gran tamaño que se encontraban revestidas por células cúbicas altas o cilíndricas y podían experimentar dilatación quística (**Figura 32**).

Un patrón de crecimiento especialmente notable es el que se muestra en las **figuras 33 y 34**. En éste, la lesión crece formando masas constituidas por un grupo de elementos celulares atípicos que diferencia una estructura cilíndrica o tubular que se ensancha en un extremo formando una masa sólida. Este crecimiento remeda estrechamente la morfología de la mama virgen del ratón.

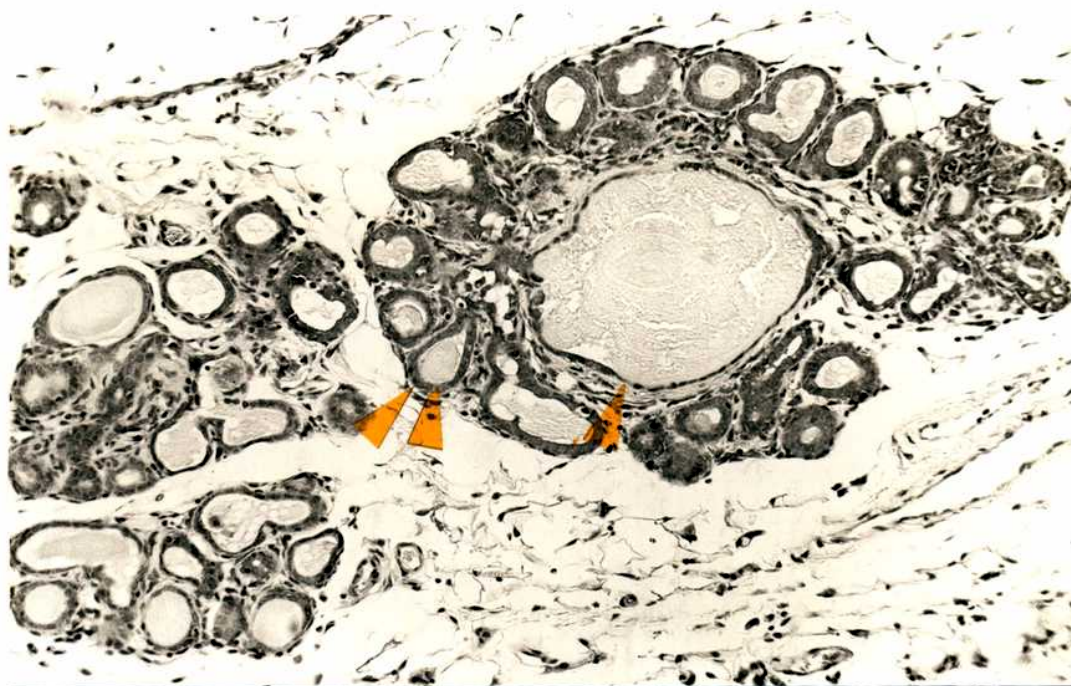


Fig. 20

La figura muestra un área de hiperplasia lobulillar caracterizada por la presencia de estructuras acinares dilatadas (flecha doble), centradas por un conducto igualmente dilatado con secreción amorfa en su interior (flecha única) (H&E, 100x).

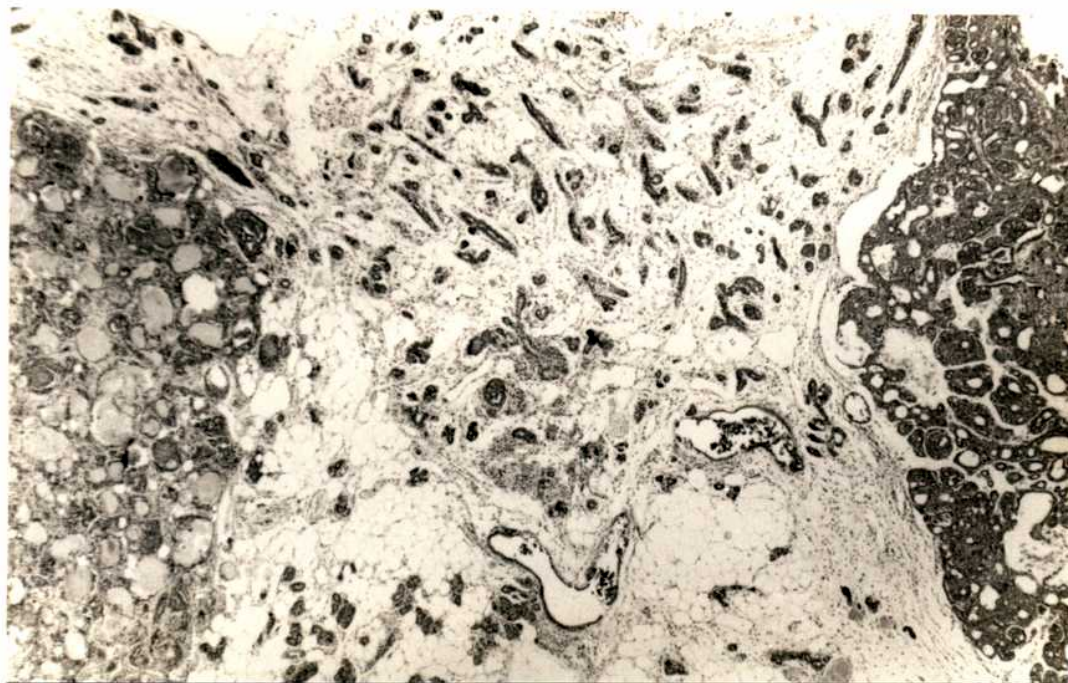
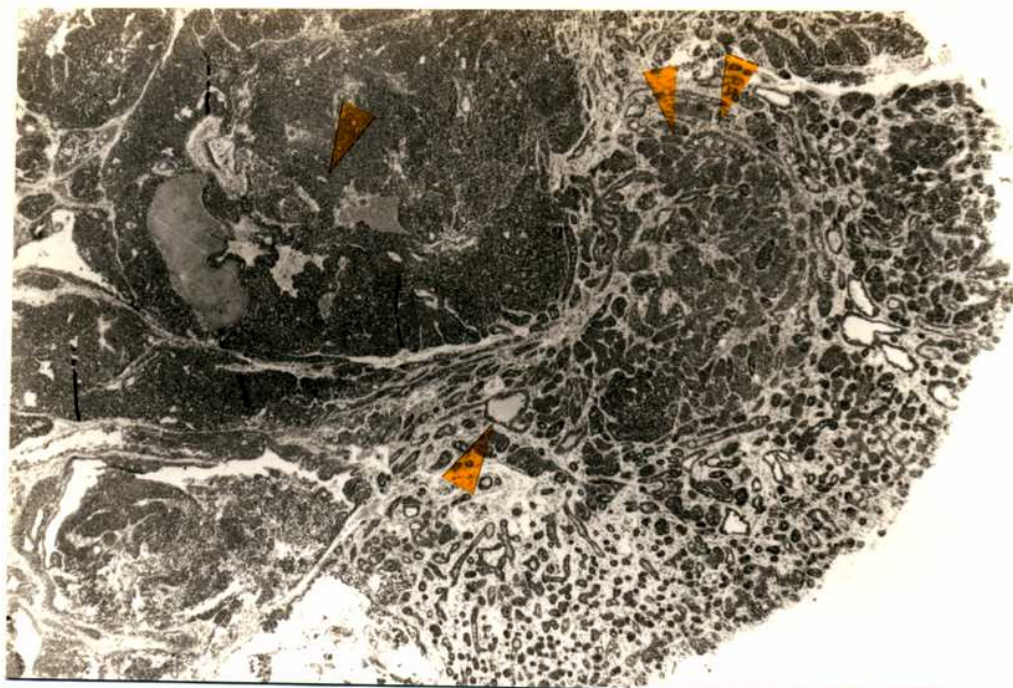


Fig. 21A Carcinoma lobulillar de mama de patrón histológico complejo. La imagen muestra áreas sólidas con focos de hemorragia y necrosis, con escaso estroma y discreta tendencia a formar estructuras glandulares. Existen focos de diferenciación lobulillar que alternan con otros macroglandulares. Hay en un área una lesión sólida que impresiona como creciendo dentro de una cavidad dilatada. (H&E, 25x).

Fig. 21B Otro ejemplo de un patrón heterogéneo de crecimiento, con focos de crecimiento cribiforme y de diferenciación glandular, separadas por un área con estroma fibroblástico y con restos de mama no neoplásica (H&E, 25x).

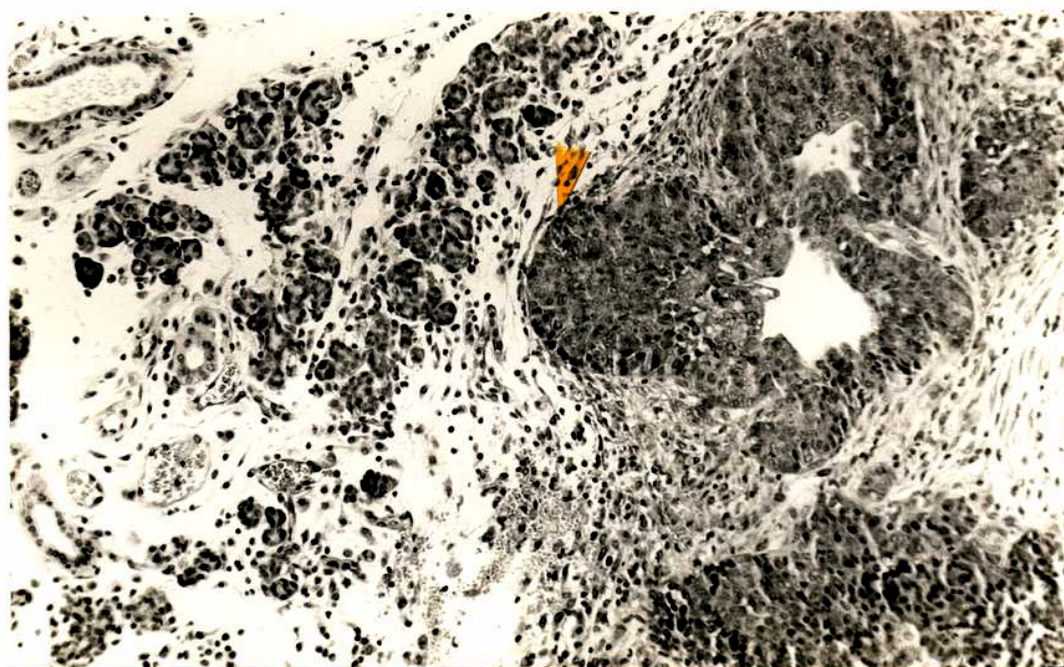


Fig. 22 Carcinoma anaplásico con grandes focos de necrosis localizado en el grupo mamario cervical. El tumor está infiltrando la glándula salivar (flecha)(H&E, 25x).

Fig. 23 Vista a mayor aumento de la Fig. 22. Se muestra el borde de infiltración del tumor en la glándula salivar. La neoplasia emite una prolongación que empuja el tejido conectivo hacia la glándula, la que muestra signos de atrofia e intensa congestión vascular. El conectivo que rodea el tumor es laxo y presenta infiltración mononuclear (H&E, 100x).

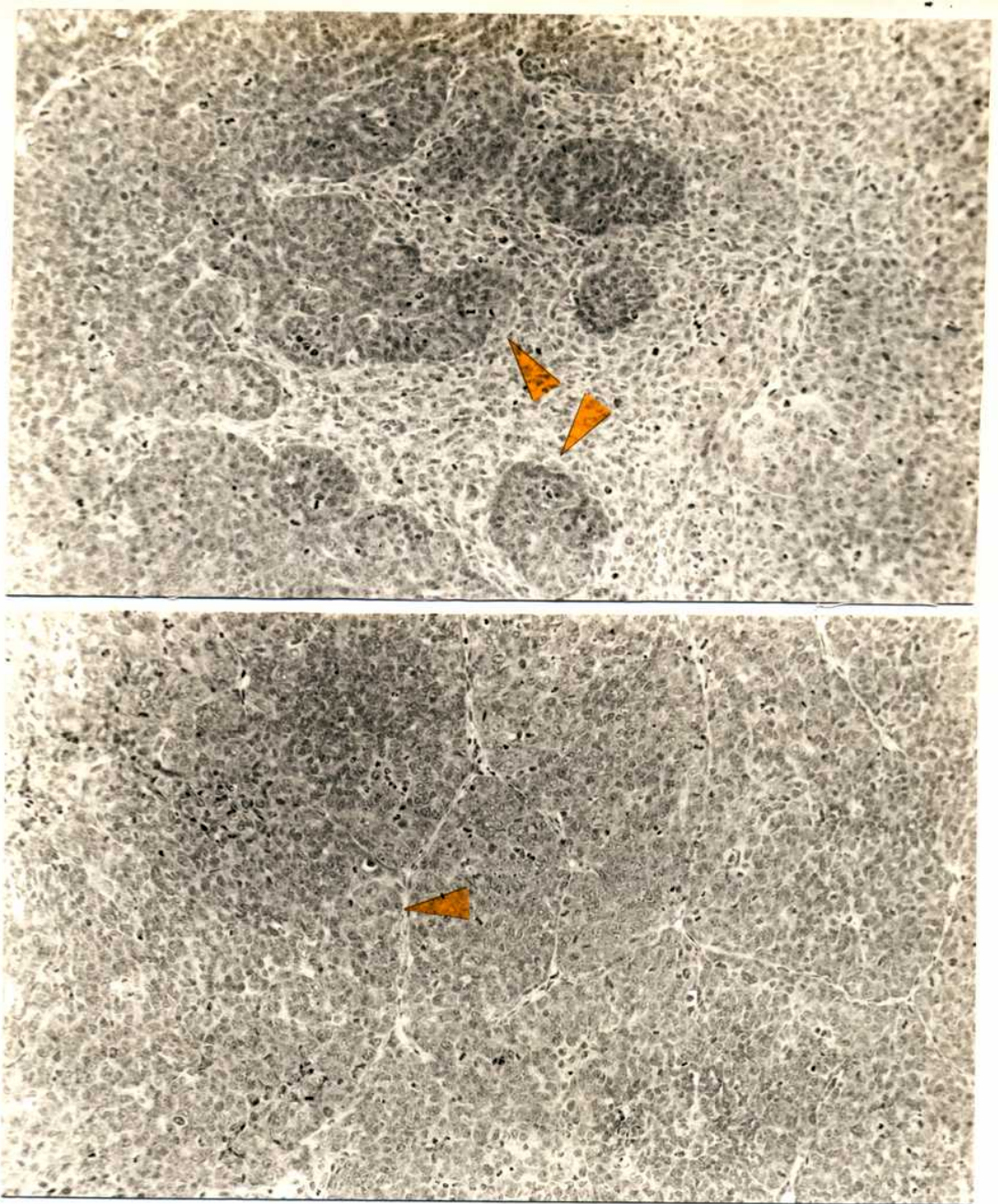


Fig. 24 Carcinoma sólido con dos poblaciones distintas de células epiteliales neoplásicas que otorgan al conjunto una imagen 'organoide'. A la izquierda se observa una población de células de núcleo ovoide y citoplasma oscuro, densamente agrupadas en una masa sólida de límites netos, que parece emitir expansiones digitiformes (flecha). A la derecha, la población está formada por células poligonales de mayor tamaño y citoplasma claro, que forman grupos con poca delimitación del estroma circundante. El índice mitótico es muy alto en ambas poblaciones. Se ignora el significado funcional, si es que tiene alguno, de estas diferencias histológicas (H&E, 100x).

Fig. 25 Carcinoma sólido constituido por lóbulos irregulares separados por tabiques conectivos delgados (flecha). Está formado por células poligonales de núcleo grande, francamente atípico, con escaso citoplasma. El índice mitótico es alto, y no existen signos de diferenciación glandular en esta lesión (H&E, 100x).

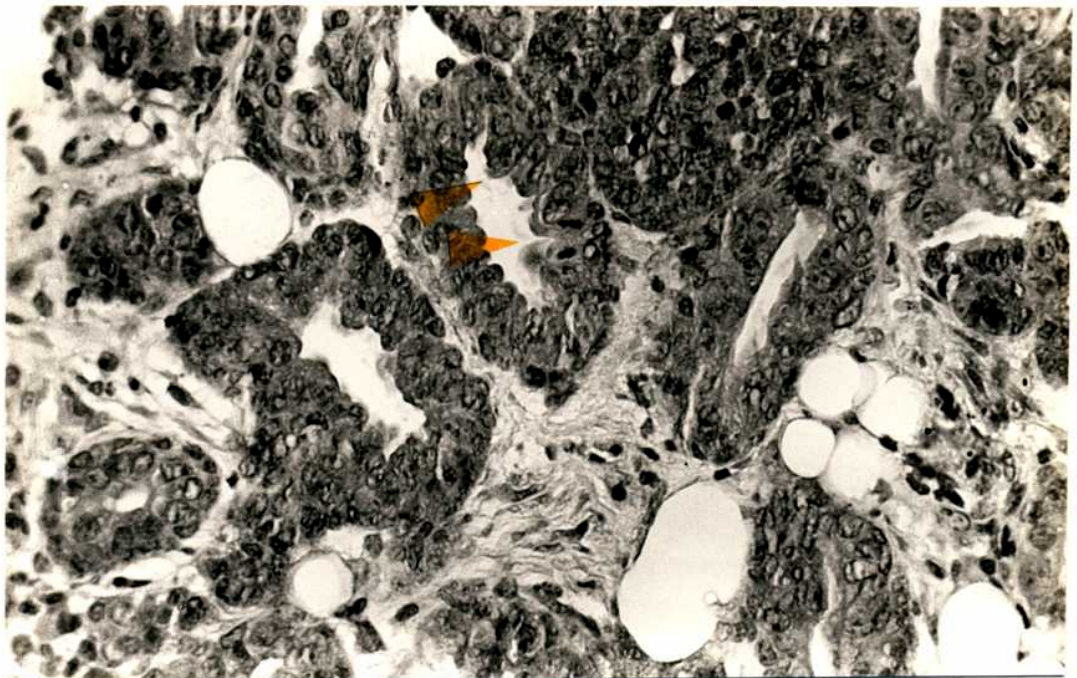
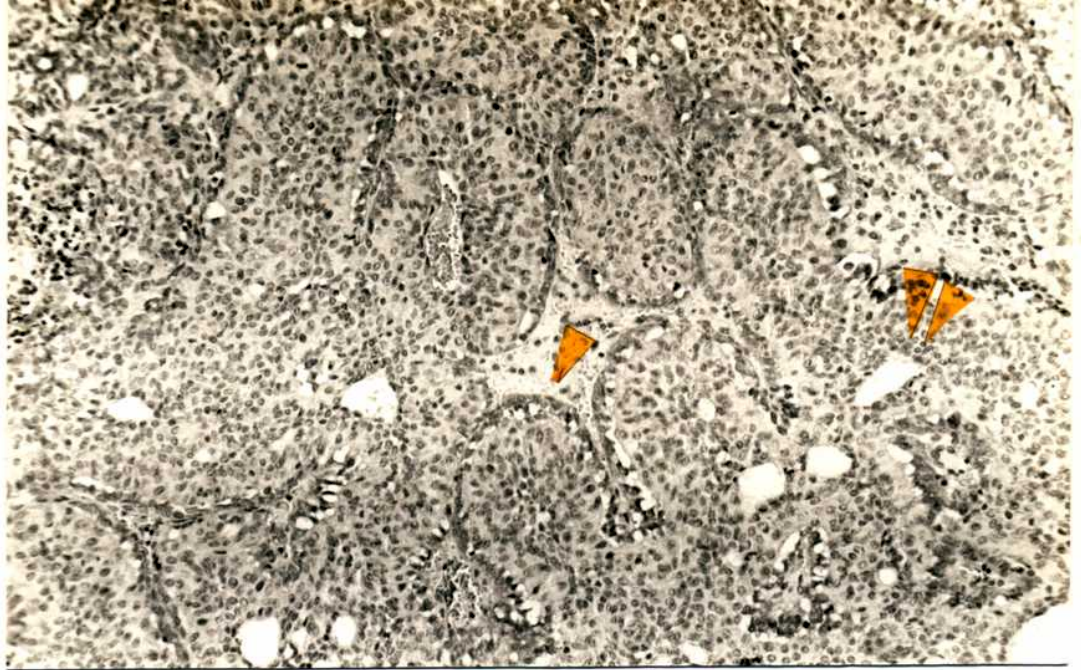


Fig. 26 Tumor sólido que forma lóbulos bastantes regulares con escaso estroma interpuesto. Las células son poligonales, con escasa atipía, con citoplasmas claros y núcleos ovoides. Existe tendencia a la diferenciación de estructuras glandulares dentro de la masa neoplásica (flecha doble). Los lóbulos se encuentran ocasionalmente delimitados por elementos celulares más oscuros dispuestos 'en empalizada' (flecha única) (H&E, 100x).

Fig. 27 Diferenciación glandular en un adenocarcinoma mamario inducido por MNU. Las estructuras glandulares están revestidas por una o más capas de epitelio neoplásico cilíndrico bajo o cúbico, con células poligonales de núcleo grande y atípico con escaso citoplasma. Existe protrusión hacia la luz del borde apical del citoplasma, remedando la secreción por decapitación que se observa en la mama funcional (flecha). El estroma es escaso y fibroblástico (H&E, 100x).

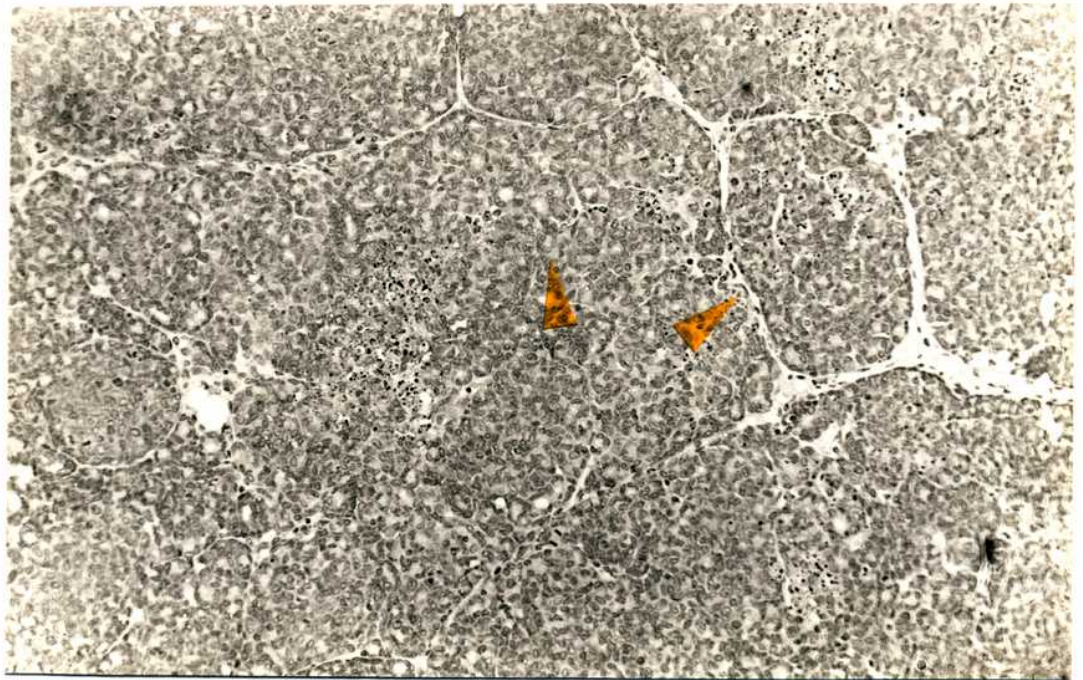
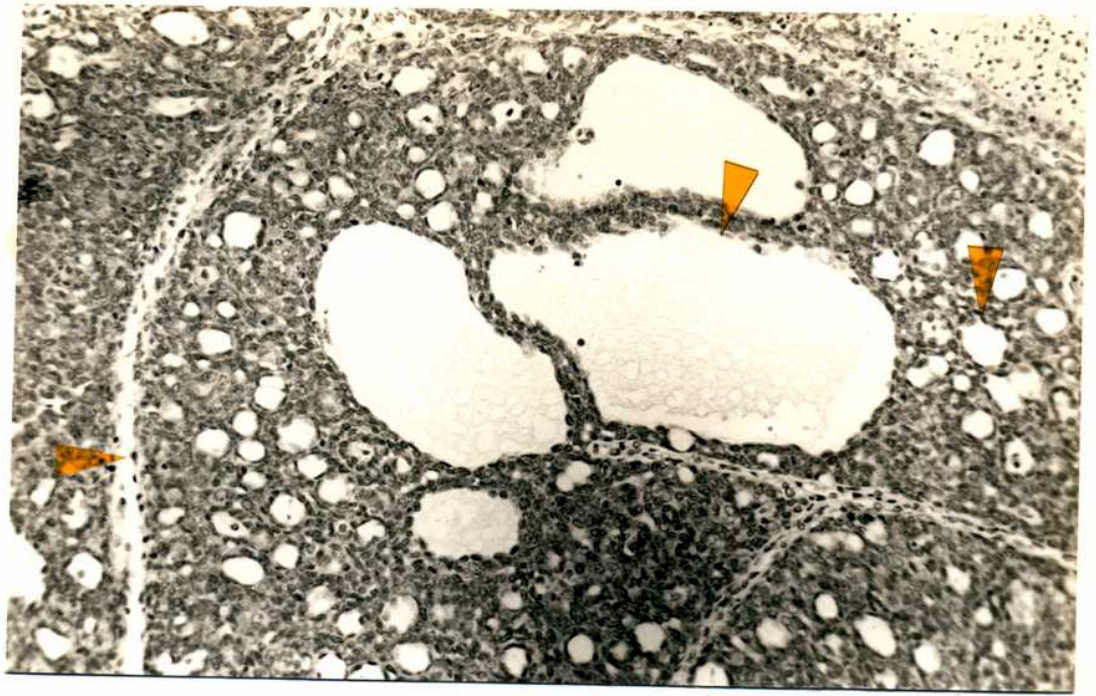


Fig. 28 Carcinoma cribiforme compuesto por lóbulos de células neoplásicas glandulares separados por bandas delgadas de tejido conectivo (flecha izquierda) . Las estructuras lobulares presentan numerosas formaciones glandulares pequeñas (flecha derecha) que le otorgan la imagen de criba, algunas de las cuales se dilatan y se llenan de un fluido amorfo traslúcido (flecha centro). Obsérvese el área de necrosis arriba a la derecha (H&E, 100x).

Fig. 29 Tumor compuesto por masas lobulares separadas por delgados tabiques conectivos (flecha) con áreas de necrosis. Dentro de los lóbulos se observan pequeños acinos de tamaño similar alternando con áreas sólidas. Los elementos celulares proliferantes son relativamente uniformes (H&E, 100x).

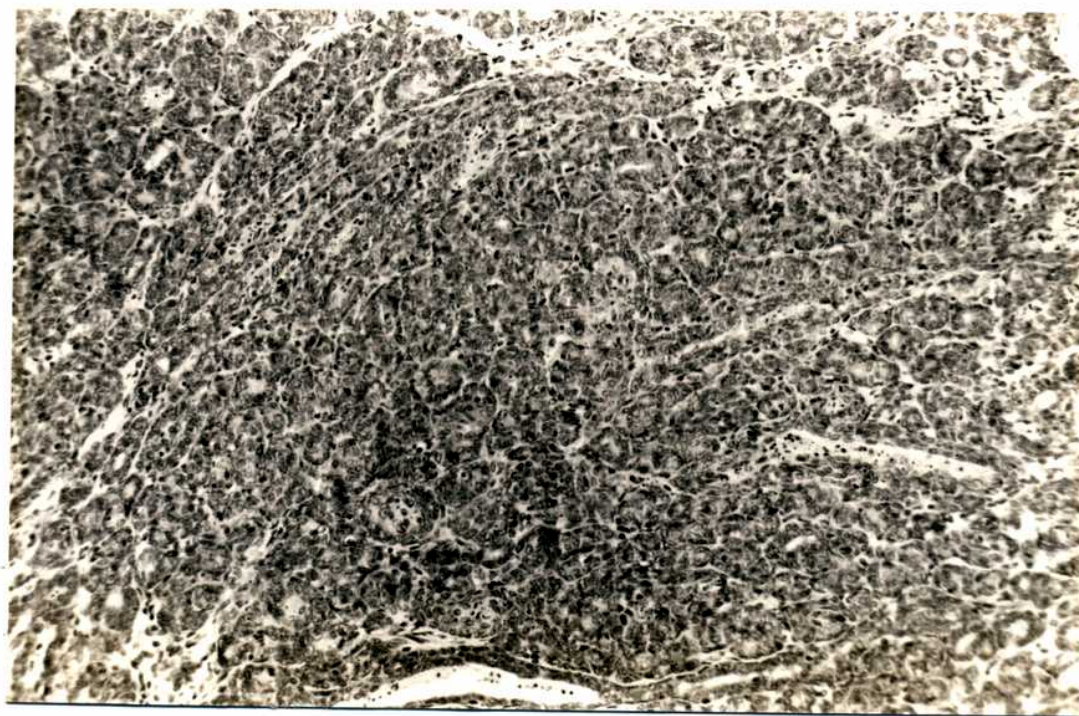
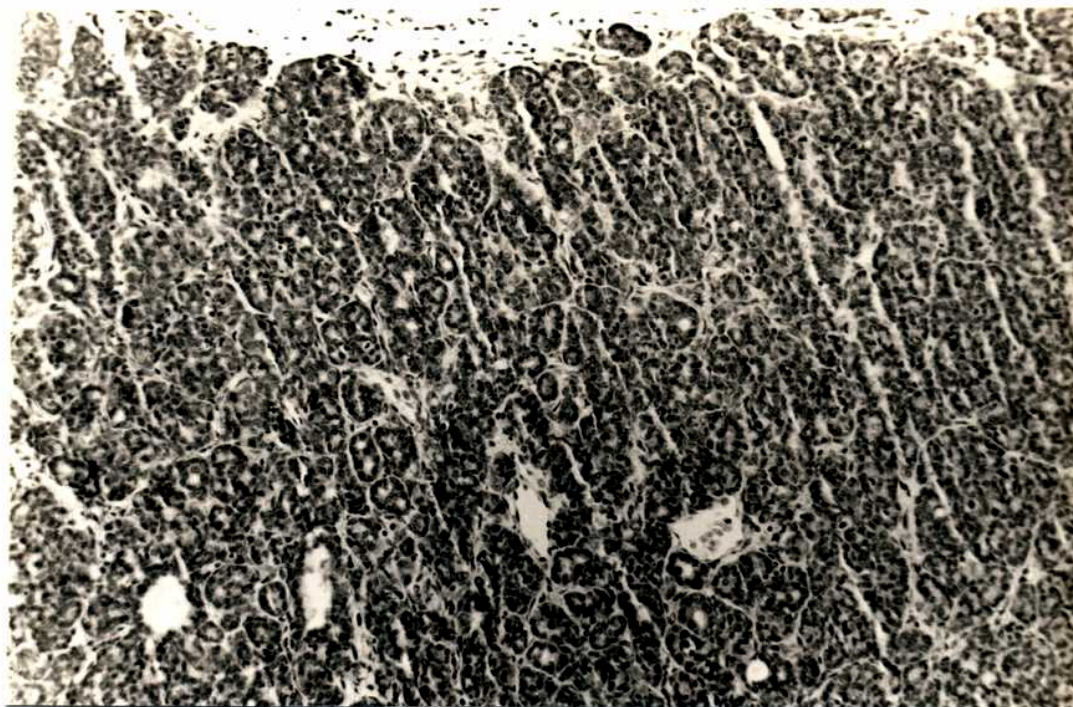


Fig. 30 No existe formación de lóbulos evidentes en este tumor. Las características de los acinos son similares a los de la figura 29 (H&E, 100x).

Fig. 31 En este caso los acinos son más irregulares y están compuestos por células con mayor atipía que en los casos anteriores. El índice mitótico es también mayor que el de los tumores de las figuras 29 y 30 (H&E, 100x).

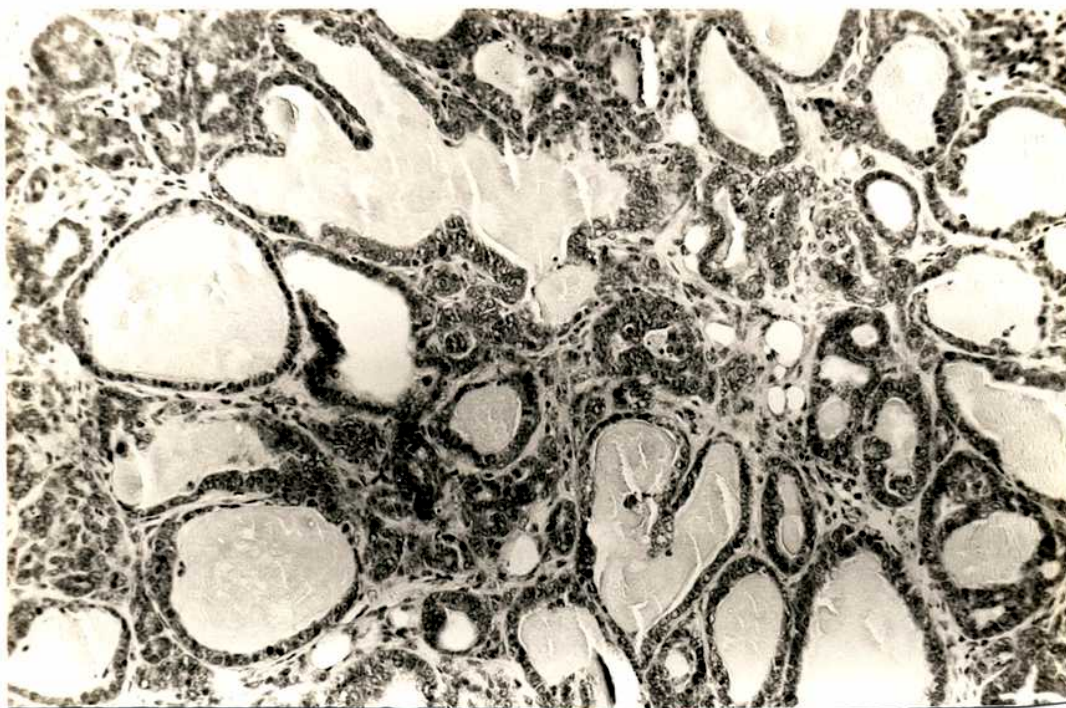


Fig. 32 La imagen muestra un adenocarcinoma mamario con diferenciación glandular. En este caso las estructuras glandulares se dilatan constituyendo áreas o cavidades pseudoquísticas, tapizadas por epitelio atípico, cilíndrico o cúbico (H&E, 125x)

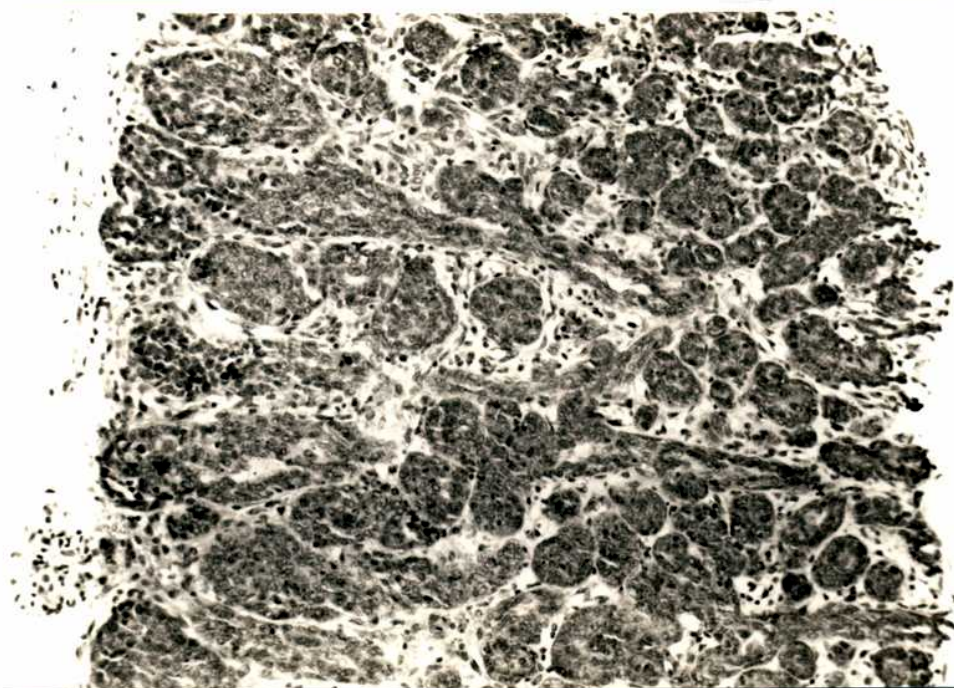
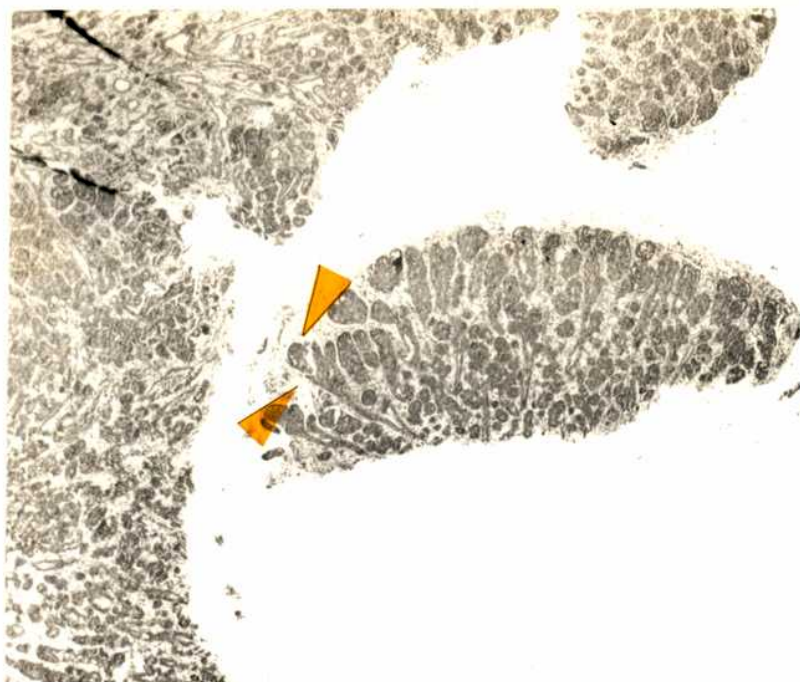


Fig. 33 Vista a pequeño aumento de un carcinoma lobulillar para mostrar la tendencia a diferenciar estructuras similares a los botones terminales presentes en la mama virgen. En este caso las estructuras están compuestas por un conducto de trayecto irregular tapizado por una o más capas de células neoplásicas, cuya luz aparece obliterada en áreas. El conducto termina en una dilatación sólida, ovoide, de células neoplásicas. En otras áreas el tumor muestra diferenciación glandular típica (H&E, 25x).

Fig. 34 Una imagen similar a la descrita en la Fig. 33, con mayor aumento, mostrando las estructuras ductales que terminan en una clava maciza de células neoplásicas (H&E, 100x)

Se observaron pocos tumores papilares verdaderos, pero la morfología papilar o pseudopapilar fue un componente relativamente frecuente en tumores heterogéneos (**Figura 35**).

El estroma es en general inconspicuo en las lesiones menos diferenciadas y se torna más abundante en las lesiones con mayor grado de diferenciación histológica. A veces es lo suficientemente abundante y denso como para dar a la lesión un aspecto "escirroso", pero en general se trata de un estroma laxo, fibroblástico, con poca o ninguna infiltración leucocitaria. Si bien no se efectuó un estudio especial de la distribución vascular, la mayoría de las lesiones estuvieron bien vascularizadas; sólo los tumores más grandes experimentan necrosis de coagulación (**Figura 21A**).

Un hecho que vale la pena destacar es la presencia de metaplasia pavimentosa de grado variable en un porcentaje importante de los tumores. Este fenómeno va desde la existencia de escamas o perlas córneas aisladas (**Figuras 36 y 37**), a constituir lesiones que remedan el pilomatrixoma o tumor de Malherbe del humano (**Figuras 38 y 39**). Los patrones de queratinización fueron variables; en ocasiones se observó queratinización de tipo tricolemal, sin capa de células granulosa, característica del pelo.

El fenómeno de la metaplasia pavimentosa parece ser un efecto casi exclusivamente relacionado con MNU, ya que sólo muy raramente lo hemos observado en tumores inducidos por MPA o Pg (Molinolo A. y col., 1987; Kordon E y col., 1994).

Las metástasis constituyeron un fenómeno ausente en este modelo de carcinogénesis. En un caso se pudo observar un carcinoma de mama creciendo en ramas de la pulmonar, en uno de los pulmones. La localización peculiar y la morfología diferente de los carcinomas pulmonares primitivos ayudó al diagnóstico diferencial (**Figura 40**).

B. Incidencia tumoral e histología.

Teniendo en cuenta que MPA induce adenocarcinomas mamarios con latencia media de 52 semanas, estos experimentos se siguieron durante 9 meses para evitar la superposición con los tumores inducidos por MPA.

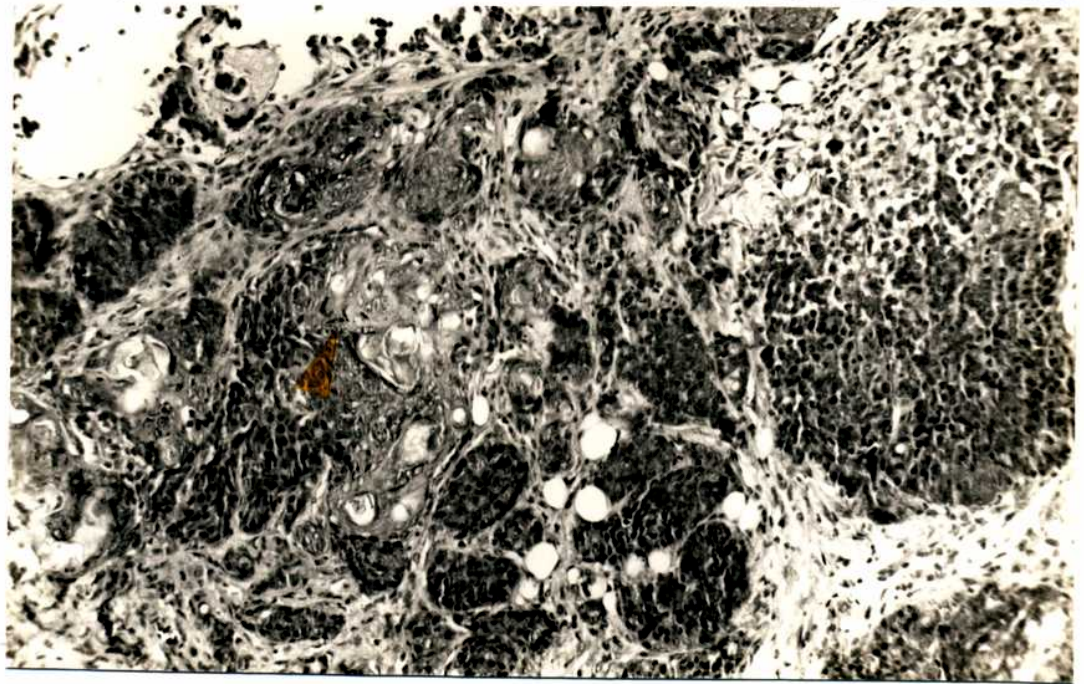
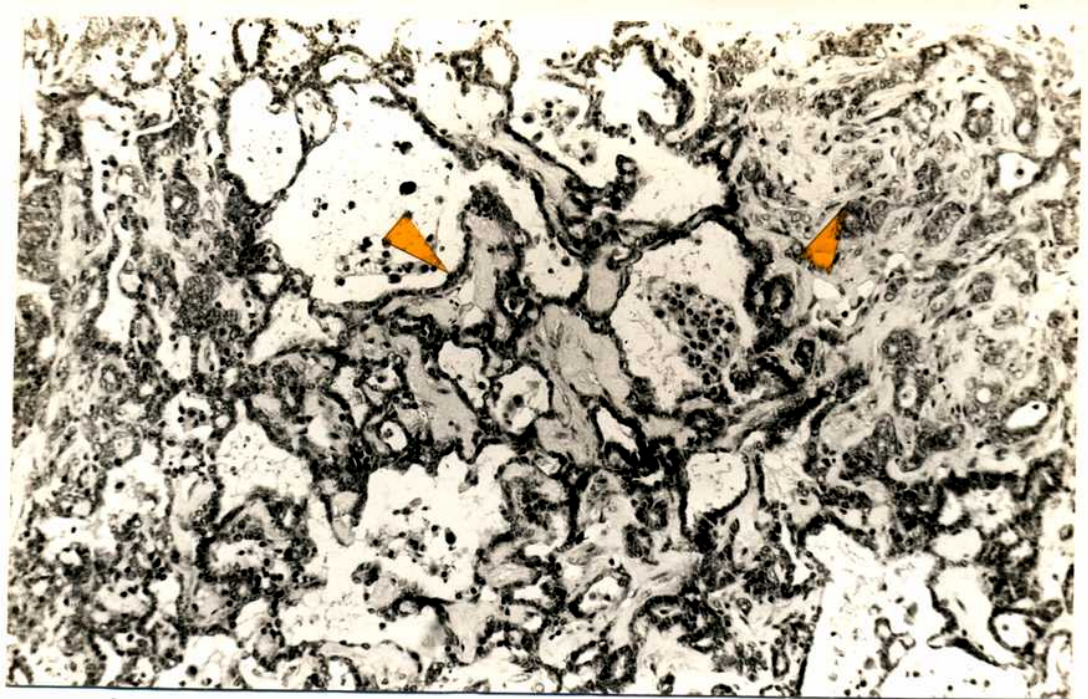


Fig. 35

En este adenocarcinoma mamario se han diferenciado estructuras glandulares que aparecen como canales interconectados que originan formaciones pseudopapilares con estroma hialino. En un extremo (flecha) se observa abundante estroma hialino en el que se insertan formaciones glandulares o sólidas pequeñas. Este área presenta similitud con los focos desmoplásicos que aparecen algunos carcinomas humanos (H&E, 100x)

Fig. 36

Adenocarcinoma mamario con extensa metaplasia pavimentosa. Los fenómenos de metaplasia pavimentosa de extensión y morfología variable constituyen una característica distintiva de los carcinomas de mama inducidos por MNU. En este caso se observa la formación en el centro de las masas adenocarcinomatosas, de estructuras de tipo 'perla córnea' (flecha) con fenómenos de paraqueratosis (H&E, 100x).

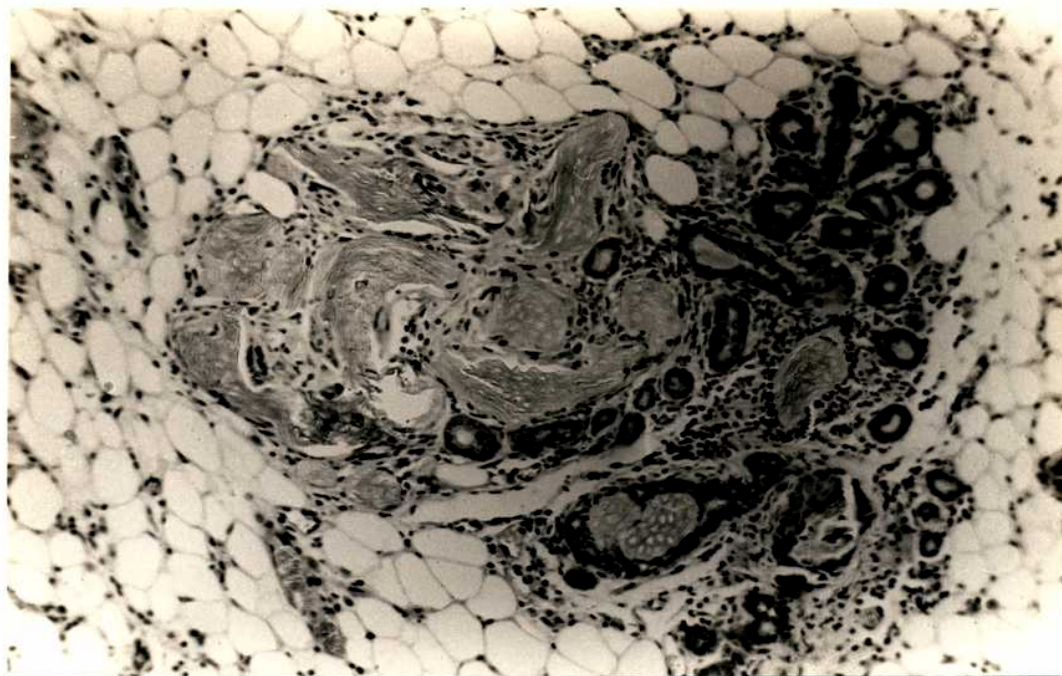


Fig. 37 Metaplasia pavimentosa en un carcinoma de mama inducido por MNU. Obsérvese la casi ausencia de transición entre la morfología glandular y los fenómenos de metaplasia. Se pueden adivinar en las áreas metaplásicas, áreas claras ovoides que impresionan como imágenes negativas de núcleos celulares (H&E, 100x).



Fig. 38 Extensa metaplasia pavimentosa en un adenocarcinoma mamario inducido por MNU. Estos focos presentan diferenciación centrípeta con formación de cavidades que contienen numerosas laminillas córneas. Existen fenómenos de paraqueratosis. En focos la queratinización impresiona como de tipo tricolemal por la ausencia de células con queratohialina (H&E, 100x).

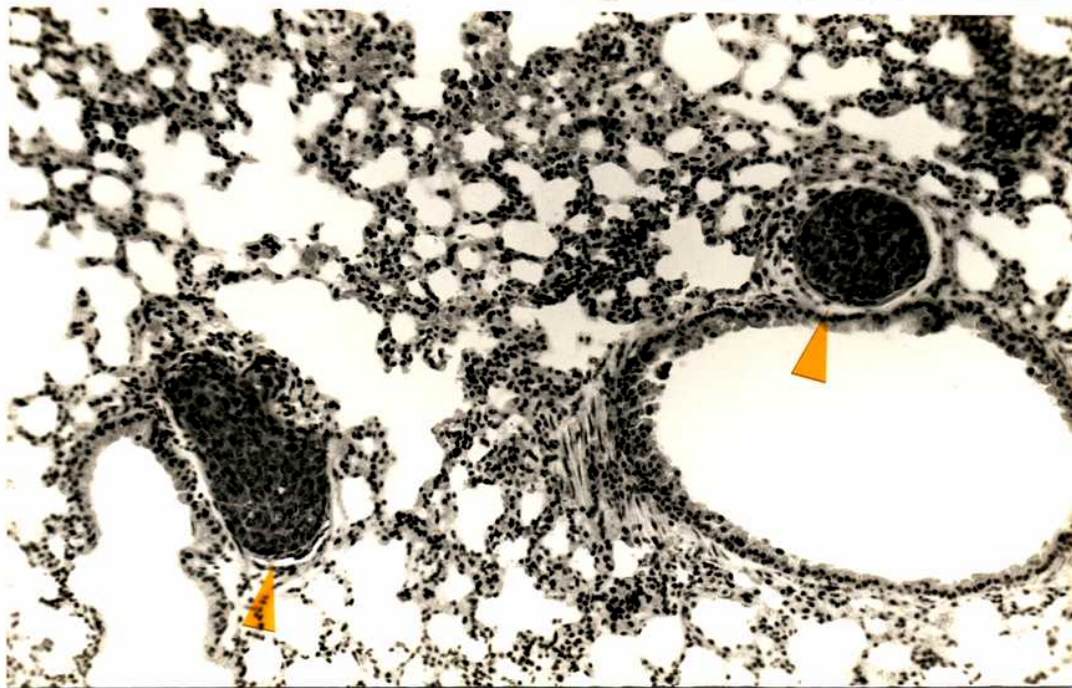
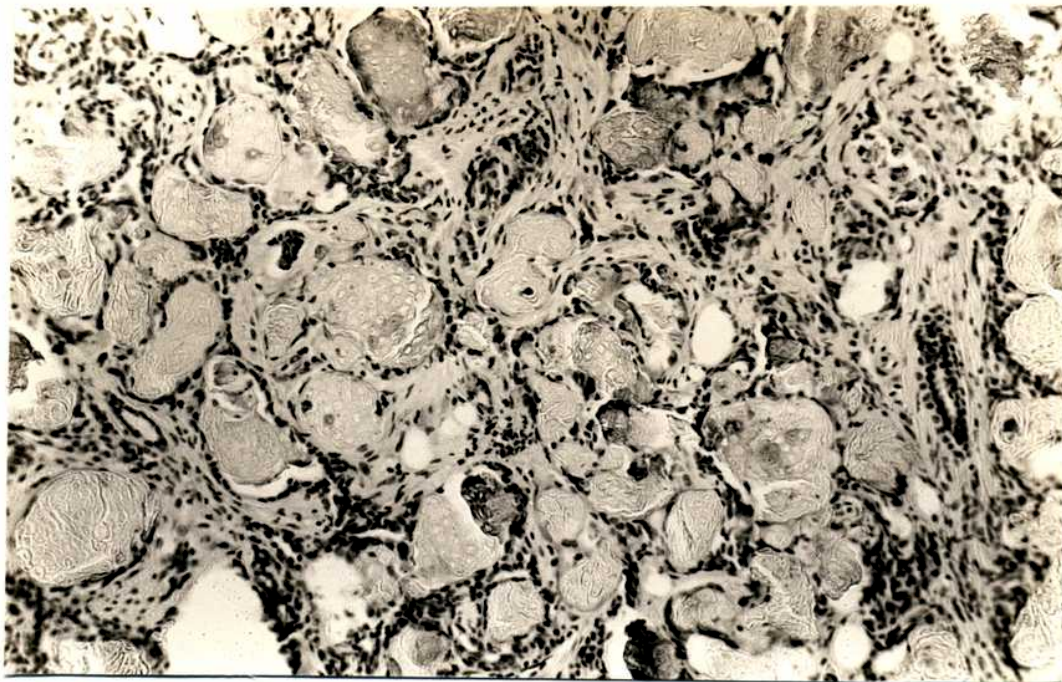


Fig. 39 Extensa metaplasia pavimentosa en un carcinoma de mama inducido por MNU. En estas áreas la lesión se encuentra casi íntegramente constituida por masas córneas con las imágenes negativas de núcleos celulares, previamente descriptas. Existen elementos celulares con queratohialina. En otros focos la lesión era francamente adenocarcinomatosa (H&E, 100x).

Fig. 40 La foto muestra crecimiento tumoral de un carcinoma de mama, en el centro, ramas de la arteria pulmonar que corren paralelas a los bronquios. La histología y localización de estas lesiones difiere significativamente de característica similares de los carcinomas pulmonares primarios inducidos por MNU (H&E. 100x).

1. Efecto promotor del MPA.

a. Incidencia tumoral

Con el fin de investigar si el MPA tiene efecto promotor en el modelo de cocarcinogénesis de MPA y MNU se utilizó MNU en dosis única de 50 mg/kg ya que a esta dosis se comporta como iniciador exclusivo en otros modelos experimentales (Zarbl H. y col., 1985; Waldmann V. Rabes H.M., 1992). En estas condiciones, la administración de MNU no induce tumores de mama durante el tiempo de observación de este experimento (**Figura 41**). Por el contrario, en animales tratados con MPA en forma continua antes o después de MNU la incidencia de adenocarcinomas mamarios es significativamente alta ($p < 0.05$), lo que sugiere que el MPA tiene un rol promotor. El hecho de que la incidencia sea mayor en el grupo pretratado con MPA que en el grupo al cual se agregó MPA a la semana, sugiere que además de un efecto promotor el MPA podría afectar al proceso de iniciación; sin embargo, la diferencia de incidencias actuariales no es significativa. Sí lo es la diferencia entre el número total de tumores surgidos ($p < 0.05$). No se observaron tumores de mama inducidos exclusivamente por MPA durante este período de observación. La incidencia tumoral en ratones tratados con MPA por dos meses (Grupo 5) es baja; esto sugiere que el efecto promotor requiere de un estímulo hormonal constante o por lo menos mayor a dos meses.

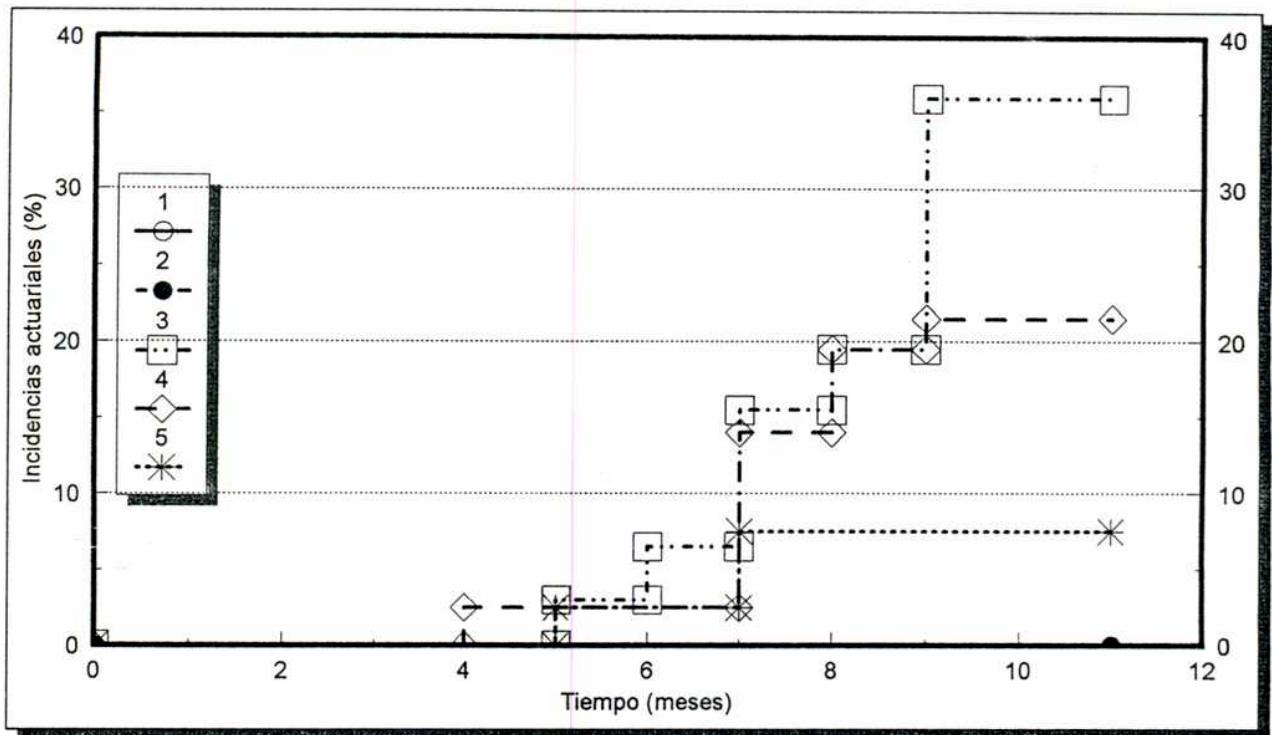
Como ya se explicó, al darse por finalizado el experimento (9 meses) no se habían originado tumores en el grupo tratado con una sola dosis de MNU. Estos animales fueron divididos en dos grupos: Grupos 6, que fue tratado con MPA y Grupo 7 (**Figura 42**) controles no tratados. En el Grupo 6 aparecieron 4/14 tumores, aproximadamente 3 meses luego de la inoculación del MPA vs ninguno en el grupo control. Si bien la cantidad de animales utilizados no fue suficiente para un análisis estadístico apropiado, estos resultados aportan más evidencias a favor del efecto promotor del MPA.

Las diferencias de tiempos de latencia entre los distintos grupos no fueron estadísticamente significativas.

b. Histología de los tumores.

En la **Figura 41** se puede observar que no hay diferencias significativas en la morfología de los adenocarcinomas mamarios inducidos en los distintos grupos experimentales (proporción de

FIGURA 41
Evaluación del efecto promotor del MPA.
Incidencia y latencia de carcinomas de mama.



PROTOCOLO	RT/RI*	TUMORES**	Histología TIPOS I/II	Latencia de aparición Días (0±ds)	Incidencia Actuarial %
1 ☐ _____	0/43	0	-	0	0
2 ____ ↓ ____ ↓ ____	0/22	0	-	0	0
3 ____ ↓ ☒ ____ ↓ ____	16/44	23	12/1	222,7±34	36
4 ____ ☒ ____ ↓ ____ ↓ ____	9/43	10	5/3	210,8±38	21
5 ____ ☒ ____ ↓ ____ ☐ ____	3/42	3	3/0	199,5±5	7

* : N° ratones con tumor /N° inicial
de ratones

** : N° total de tumores

☒ : MNU 50 mg/kg

↓ : implante de MPA depot 40 mg

☐ : extracción de MPA depot 40 mg

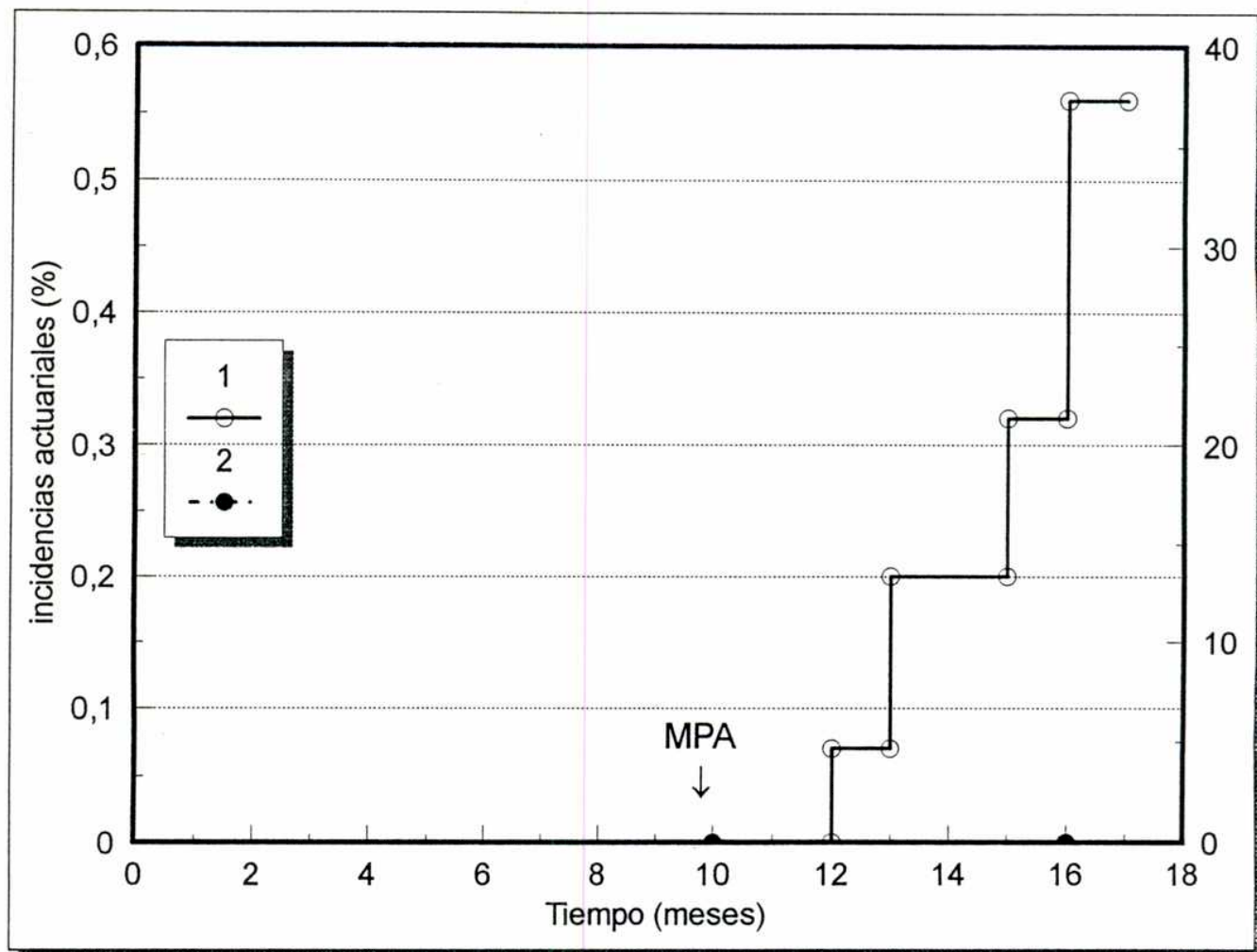
Incidenias actuariales:

p<0.05: 3 y 4 vs 1 y 2. - p<0.01: 3 vs 5

Tumores totales:

p<0.05: 3 y 4 vs 1 y 2. - p<0.01: 4 vs 5

FIGURA 42
Evaluación del efecto promotor del MPA agregado a los 10 meses de iniciado el tratamiento.
Incidencia y latencia de carcinomas de mama.



PROTOCOLO	RT/RI*	TUMORES**	Histología TIPOS I/II	Latencia de aparición Días (0±ds)	Incidencia Actuarial %
1 _ [X] _ ↓	4/14	4	3/1	378±50	56
2 _ [X] _	0/5	0	-	0	0

* : N° ratones con tumor / N° inicial de ratones
 ** : N° total de tumores
 [X] : MNU 50 mg/kg
 ↓ : implante de MPA depot 40 mg

tumores tipo I y II).

2. Efecto de la sialoadenectomía.

a. Niveles de EGF en suero (EGF-S).

En los ratones intactos o con operación simulada que recibieron una dosis de 40 mg de MPA, se observó que el nivel de EGF-S comenzaba a aumentar después de los 20 días del inóculo de hormona, alcanzándose los valores máximos a los 40 días (120 ng/ml) (**Tabla 2**). Estos valores fueron significativamente distintos a los observados en los animales sialo con el mismo tratamiento ($p < 0.05$); evidentemente el MPA, en ausencia de las glándulas salivares, no produce un aumento sérico de EGF. No existieron variaciones entre los niveles de EGF-S de ratones sialo (0.35 ± 0.035 ng/ml) con respecto a ratones con operación simulada de sialo y sin tratamiento hormonal (0.32 ± 0.018 ng/ml). Los resultados demuestran en forma concluyente que MPA incrementa significativamente el EGF-S en ratones hembras de la cepa BALB/c y que la sialoadenectomía previene este efecto.

b. Montaje total de las glándulas mamarias de ratones tratados con MPA sialoadenectomizados o no.

Las glándulas mamarias de los ratones sialo tratados con MPA mostraron mucho menos ramificaciones que los respectivos controles. Las imágenes que se muestran en las **Figuras 18 y 19** corresponden a dos meses de tratamiento con MPA, que es aproximadamente el momento en que se inoculó el MNU.

c. Incidencia tumoral.

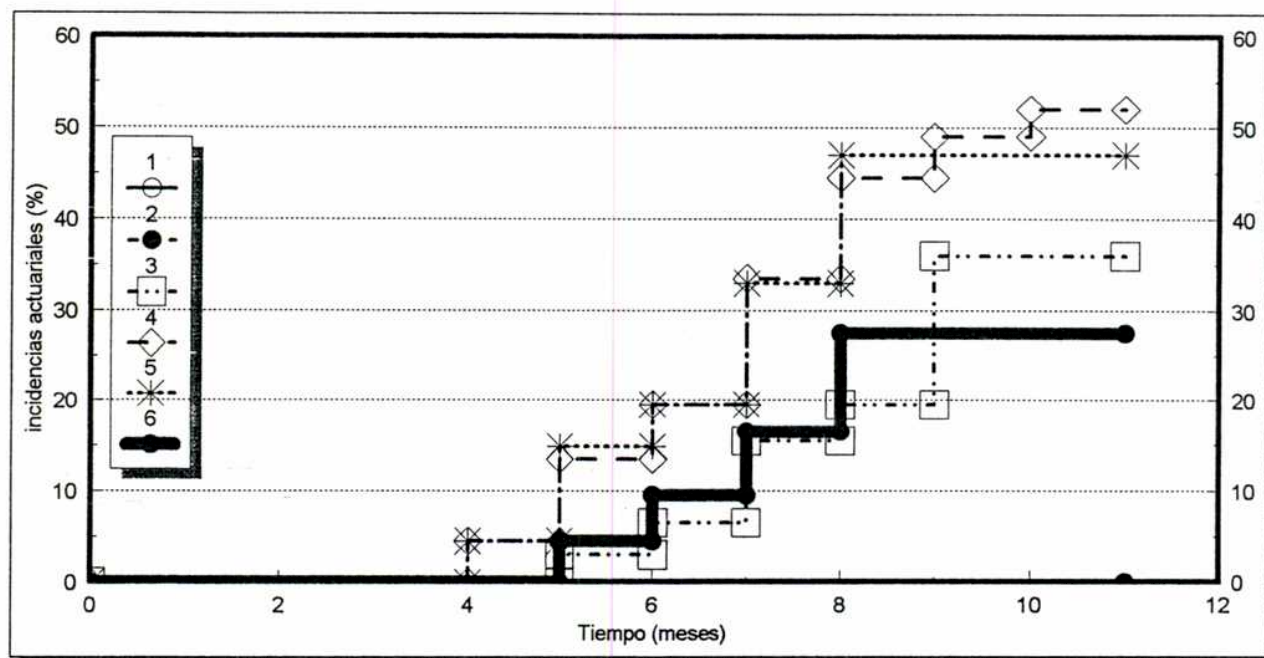
El objetivo de este experimento fue demostrar si la sialo afecta la incidencia de adenocarcinomas mamarios en este modelo experimental. Efectivamente, la sialo se asocia con una incidencia disminuída de los tumores mamarios, de manera significativa respecto al grupo de operación simulada (sham) ($p < 0.05$) (**Figura 43**). La diferencia entre el control sin operación simulada (Grupo 5) y el sialo (Grupo 6), resultó marginalmente significativa; sin embargo, ya que no hay

TABLA 2
NIVELES SÉRICOS DE EGF.

PROTOCOLO	MEDIANA Y [RANGO] ng/ml.	n ¹
SIALO con MPA	1.051 [0.68 - 1.69]*	5
SHAM con MPA	3.6 [3 - 4.92]*	3
CONTROL con MPA	9.13 [2.58 - 120]**	20
CONTROL sin MPA	1.68 [0.95 - 1.95]**	6

¹: número de muestras * :p<0.05 respecto control con MPA

FIGURA 43
Efectos de la sialoadenectomía en la inducción tumoral por MPA+ MNU
Incidencia y latencia de carcinomas de mama.



PROTOCOLO	RT/RI*	TUMORES**	Histología TIPOS I/II	Latencia de aparición Días (0±ds)	Incidencia Actuarial %
1 — [X] — —	0/43	0	-	0	0
2 — ↓ — ↓ —	0/22	0	-	0	0
3 — ↓ [X] — ↓ —	16/44	23	12/1	222,7±34	33
4 — ↓ [X] — ↓ sham	22/42	24	12/12	157±33	52
5 — ↓ [X] — ↓ contr ol	19/41	19	12/7	139,2±55	47
6 — ↓ [X] — ↓ sialo	11/40	11	7/5	162,5±20	28

⊛ : N° ratones con tumor /N° inicial

[X] : MNU 50 mg/kg

⊞ : N° total de tumores

↓ : implante de MPA depot 40 mg

Incidenias actuariales:
 p<0.01: 4, 5, 6 vs 1, 2 - p<0.05: 4 vs 6;
 6 vs 4+5

Latencia: p<0,01: 4,5 y 6 vs 3

Histología, tipo I y II: p<0.05: 3 vs 4

diferencias entre el grupo sham y el control, la diferencia se hace significativa ($p < 0.05$) si se juntan los valores de ambos grupos. Si se comparan los resultados obtenidos en el Grupo 3 con el 5 que solo difieren en el tiempo previo de exposición al MPA antes del inóculo de MNU, se observa que el número de tumores de mama inducidos es similar; teniendo en cuenta que en el momento del inóculo de MNU en el Grupo 3 no hay todavía niveles séricos de EGF elevados como sucede después del mes, parecería que la influencia del EGF sérico sería más marcada en la etapa de promoción tumoral que en la etapa de iniciación; estas observaciones no son concluyentes debido a que ambos grupos también difieren en los niveles de progestágeno circulantes en el momento del inóculo del MNU.

La latencia de aparición de los tumores fue mayor en el Grupo 3 (MPA una semana antes que MNU) que en el 4, 5 y 6 (donde el MPA se inoculó 2 meses antes) ($p < 0.01$). Esto está posiblemente ligado a que se tomó como día 0 el día de inóculo de MNU. Si consideráramos como día 0 la fecha de inóculo de MPA ya no habría diferencias de latencia entre los distintos grupos. Esto nos indicaría nuevamente la importancia del tiempo de exposición a la hormona.

d. Histología de los tumores.

En el Grupo 3, cuando MPA se inoculó 1 semana antes que el MNU hay un predominio muy marcado de tumores tipo I, cuando el MPA fue inoculado 2 meses antes que MNU se ve un aumento de casos que presentan metaplasia pavimentosa (Carcinomas Tipo II). Las diferencias de proporciones son significativas entre el Grupo 3 y el 4 ($p < 0.05$) y entre el Grupo 3 y la suma de los datos entre el 4, 5 y 6 ($p < 0.05$). No hubo diferencias entre el grupo sham y los controles.

3. Efecto de la ovariectomía en la inducción de tumores mamarios por MNU.

a. Incidencia tumoral.

Se utilizaron 3 dosis de MNU de 50 mg/kg espaciadas por 1 mes que se inocularon en animales previamente ovx, pretratados o no con MPA. Por otro lado se eligió la dosis única de MNU y el MPA en las condiciones demostradas anteriormente que actuaría como promotor. En animales ovx el MNU no indujo tumores de mama (grupo 5) mientras que en estas dosis en animales enteros

fue débilmente carcinogénico (grupo 6) (**Figura 44**). Cuando se comparan los Grupos 3 y 4, (MPA como promotor) se observa que no aparecieron tumores en los animales ovx, y son significativas ($p<0.01$) las diferencias obtenidas con respecto a los controles enteros. Curiosamente, en animales pretratados con MPA, si bien en el grupo ovx aparecieron menos tumores, las diferencias con los enteros no son significativas. Esto sugiere que la acción proliferativa del MPA reemplazaría en la mama los efectos de la función ovárica.

En cuanto a las latencias de aparición, existen diferencias significativas ($p<0.05$) entre los grupos con 3 dosis de MNU, tratados con MPA, ovx o no con respecto a los controles sin MPA. En este último los 2 tumores que aparecieron surgieron antes de los 6 meses.

A partir de los datos presentados se confirma que el pretratamiento con MPA aumenta la incidencia de tumores de mama inducidos por MNU ($p<0.05$ grupos 1 vs 5) y que el "modelo" se mantiene en animales ovx ($p<0.01$, grupos 2 vs 6).

b. Histología tumoral.

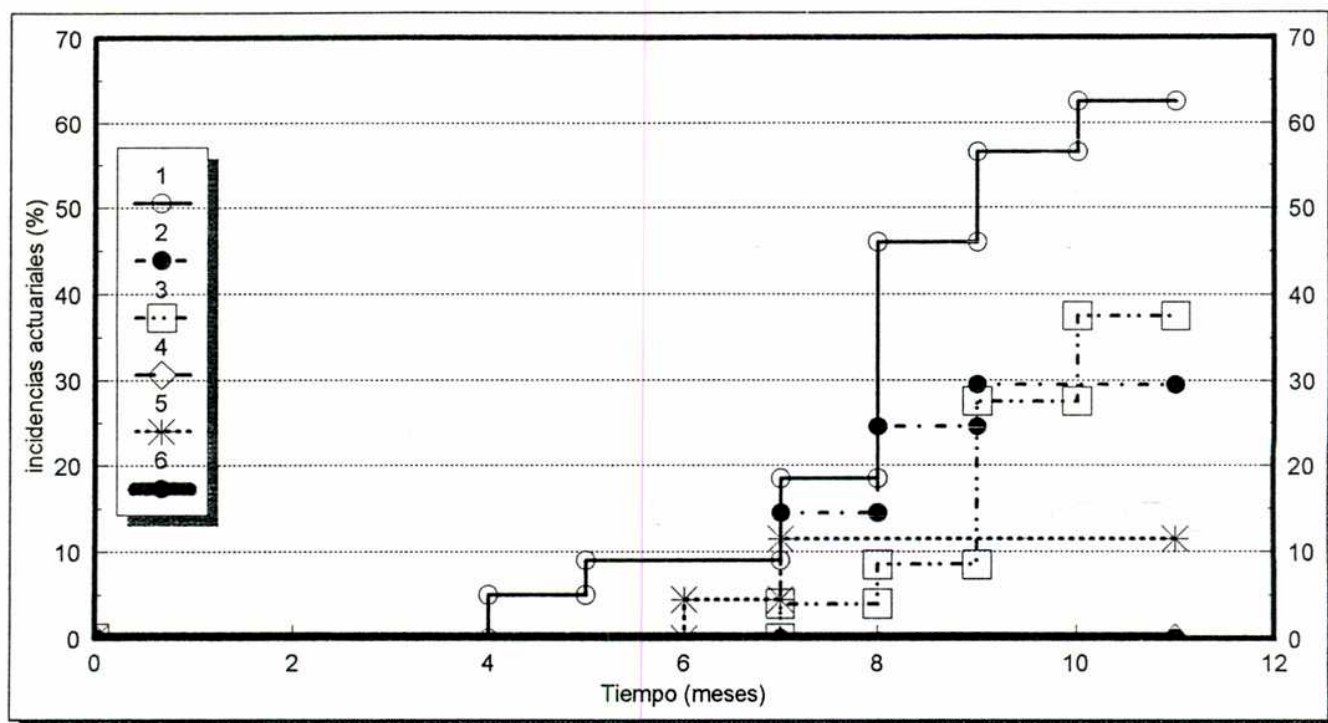
Los dos únicos tumores que aparecieron en animales tratados con MNU son histológicamente adenocarcinomas tipo II. En todos los grupos que recibieron 3 dosis de MNU se observó un aumento de proporción de tumores considerados tipo II con respecto al tipo I. Si se comparan la proporción de tipo II en el Grupo I (**Figura 44**) con respecto al Grupo 3 (**Figura 41**) (tratamientos comparables de MPA, 3 dosis de MNU vs 1 dosis de MNU) las diferencias entre proporción I vs II son significativas ($p<0.05$). No se ven cambios de proporción I y II entre tumores surgidos en animales enteros vs ovx. El conjunto de estas observaciones parece demostrar que cuanto más acción MNU hay, se hace mayor la incidencia de tumores de tipo II.

4. Efecto de MNU en ratones expuestos temporalmente a MPA.

a. Incidencia tumoral.

Cuando se efectúan experimentos de iniciación y promoción, se diseñan habitualmente grupos experimentales en donde se intercambia el orden de los agentes. En este caso, por tratarse de una

FIGURA 44
Efectos de la ovariectomía en la inducción tumoral por MPA + MNU
Incidencia y latencia de carcinomas de mama.



PROTOCOLO	RT/RI*	TUMORES**	Histología TIPOS I/II	Latencia de aparición Días (0±ds)	Incidencia Actuarial %
1 ↓_☒_☒_☒_↓_	13/22	15	1/15	235±15	63
2 ↓_☒_☒_☒_↓_ovx	8/22	8	1/5	236±24	30
3 _☒_↓_↓_	9/22	11	6/1	271±13	38
4 _☒_↓_↓_ovx	0/19	0	-	0	0
5 _☒_☒_☒_	2/22	2	0/2	184±16	11
6 _☒_☒_☒_ovx	0/22	0	-	0	0

* : N° ratones con tumor /N° inicial
de ratones.

** : N° total de tumores.

☒ : MNU 50 mg/kg

↓ : implante de MPA depot 40 mg

Incidenias actuariales:
 $p < 0.01$: 3 vs 4; 1 vs 5; 2 vs 6
 $p < 0.05$: 1 vs 2 y 3 vs 5

hormona, resulta algo difícil establecer el tiempo adecuado de exposición a la hormona en que se consideraría que podría actuar como iniciadora.

Por otro lado se ha demostrado que los agentes iniciadores son menos carcinogénicos en tejidos diferenciados. Hemos elegido para estos experimentos un tiempo de pretratamiento de dos meses de MPA, porque consideramos que es un tiempo similar al de una preñez y lactancia, suficiente para demostrar si el MPA tiene un efecto protector o no de la carcinogénesis por MNU.

En la **Figura 45** se muestran todos los grupos en los cuales se efectuó un pretratamiento de MPA, se esperó que volvieran a ciclar las hembras (15-20 días) y luego se inoculó el MNU. Tanto en el Grupo 1 (1 dosis de MNU) y en el Grupo 2 (3 dosis de MNU) se obtuvieron más tumores que en los controles (grupos 5 y 6 respectivamente) pero las diferencias no son estadísticamente significativas, debido a que hay un número muy bajo de tumores en todos los grupos.

En el análisis de los datos también se comprueba nuevamente la importancia de los ovarios en el momento del inóculo de MNU: el pretratamiento con MPA durante dos meses en animales ovx no conduce al desarrollo de tumores de mama ($p < 0.05$).

Son significativas las diferencias de latencias de aparición entre Grupo 2 y el 5 ($p < 0.05$).

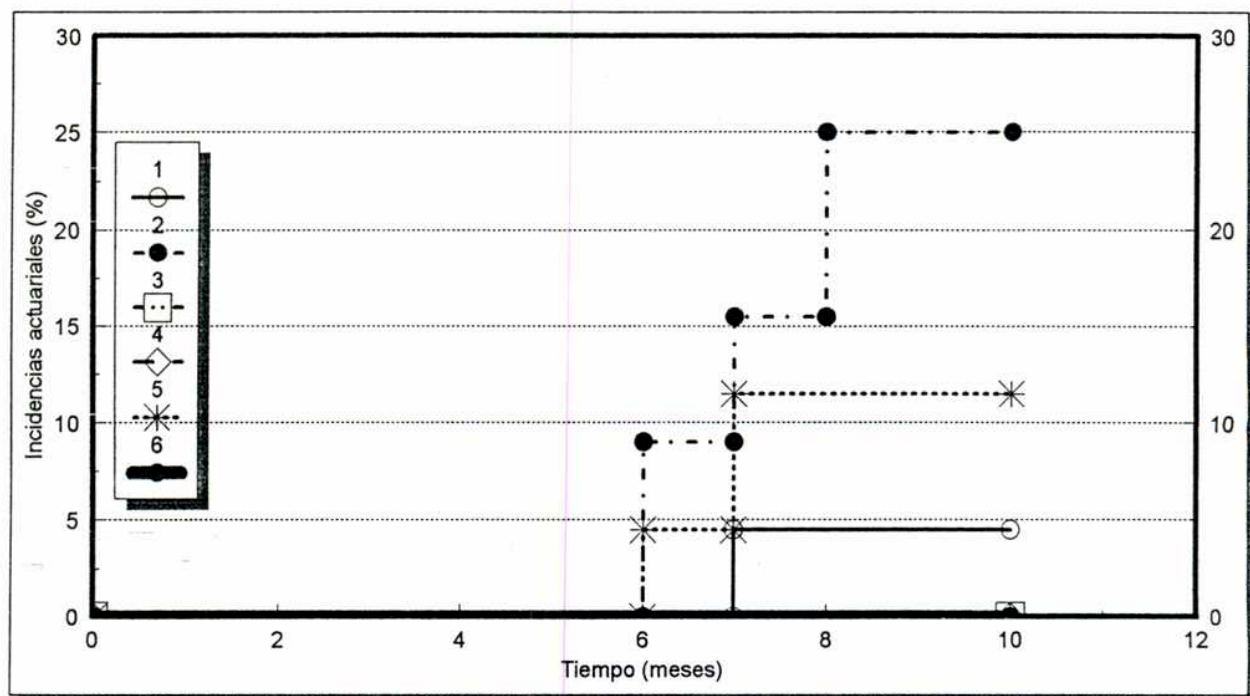
b. Histología tumoral.

El número de tumores surgidos en estos grupos es escaso como para efectuar un análisis adecuado. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, se observa la tendencia de que a menor estímulo hormonal se observan más adenocarcinomas del tipo II.

C. Influencia del estadio del ciclo estral en el momento de la aplicación del carcinógeno sobre la incidencia tumoral.

En los protocolos experimentales en los cuales el primer tratamiento fue una dosis única de MNU se decidió evaluar en qué etapa del ciclo estral estaban los animales en el momento del inóculo para poder correlacionar estos parámetros con la incidencia tumoral. La distribución de animales en cada estadio no fue pareja. La posibilidad de dividir los animales en 4 grupos y administrarles MNU en

FIGURA 45
Efecto de MNU sobre la glándula mamaria murina pretratada con MPA.
Incidencia y latencia de carcinomas de mama.



PROTOCOLO	RT/RI*	TUMORES**	Histología TIPOS I/II	Latencia de aparición Días (0±ds)	Incidencia Actuarial %
1 ↓ □ [X] _____	2/42	2	1/1	207±1	5
2 ↓ □ [X] [X] [X] _____ —	5/22	5	1/2	220±10	25
3 ↓ □ [X] [X] [X] <u>ovx</u> —	0/22	0	—	0	0
4 [X] _____	0/43	0	—	0	0
5 [X] [X] [X] _____	2/22	2	0/2	184±16	11
6 [X] [X] [X] <u>ovx</u>	0/22	0	—	0	0

* : N° ratones con tumor /N° inicial de ratones.

** : N° total de tumores.

[X] : MNU 50 mg/kg

↓ : implante de MPA depot 40 mg

□ : extracción de MPA depot 40 mg

Incidenias actuariales:

p<0.05: 2 vs 3

Latencia: p<0,05: 2 vs 5

tiempos diferentes no pareció apropiada porque preferimos que todos los animales recibieran la misma preparación de MNU, debido a la inestabilidad de la droga.

En la **Tabla 3** se observa la proporción de tumores surgidos del total de animales en cada estadio. Los resultados sugieren que el metaestro sería el estadio reproductivo que más favorece a la incidencia de tumores. Si bien las diferencias entre grupos son estadísticamente significativos, debido a la disparidad de grupos, estos datos sólo nos sugieren que, al repetir estos experimentos convendría utilizar los animales cuando la mayor parte de los mismos se encuentra en metaestro.

D. Caracterización de los tumores.

Teniendo en cuenta que los adenocarcinomas mamarios inducidos después de una larga latencia por MPA son principalmente ductales, expresan RE y RP, presentan en su mayoría un comportamiento progestágeno-dependiente y retrogradan con tratamiento estrogénico, se evaluó con fines comparativos estos parámetros en el modelo de cocarcinogénesis MPA y MNU. Por otra parte como MNU es un carcinógeno químico y la mayoría de los tumores inducidos por agentes químicos suelen ser inmunogénicos, se decidió además investigar el grado de inmunogenicidad de estos tumores.

1. Receptores hormonales.

Se estudió la expresión de RE y RP en 22 adenocarcinomas mamarios surgidos en ratones tratados con MNU y MPA y en los 2 únicos tumores inducidos por MNU sólo.

Como se observa en la **Tabla 4** sólo 1 de los tumores inducido por MNU y MPA expresa alto contenido de RE y RP. Este tumor fue clasificado como lobulillar tipo I. Los otros, incluyendo los dos inducidos por MNU o no expresan RE y RP o expresan valores bajos.

2. Hormono-dependencia.

a. Sensibilidad al MPA

Se transplantaron un total de 74 tumores para evaluar su hormono-dependencia, incluyendo los

TABLA 3
EFFECTO DEL ESTADÍO DEL CICLO ESTRAL EN LA
INDUCCIÓN TUMORAL POR MNU.

GRUPOS	N°de tumores/animales en cada estadio			Tumores totales/ animales totales
	diestro	proestro	estro	metaestro
	[*] 2/23	¹ 3/13	1/3	^{*1} 3/3
	2/16	1/12	0/7	0/3
				9/42
				3/38

¹: p<0.05 metaestro y proestro

^{*}: p<0.01 metaestro y diestro.

TABLA 4
CONTENIDO DE RECEPTORES DE ESTRÓGENO (RE) Y
PROGESTERONA (RP) Y HORMONO DEPENDENCIA.

PATRÓN DE CRECIMIENTO SINGENEICO	NÚMERO DE MUESTRAS	RE (fmol/mg.prot.)	RP (fmol/mg.prot.)
MPA-DEPENDIENTE	1	58	66
MPA-AUTONOMO	13	0 - 13	0 - 20
NO CRECIERON	10	0 - 23	0 - 15

2 únicos tumores surgidos con MNU sólo, en animales pretratados o no con MPA.

Sólo 1 de los tumores surgidos en un ratón tratado primero con MPA y luego con MNU a la semana fue MPA-dependiente (MPA-D). Quince tumores no crecieron y 59 mostraron un patrón de crecimiento autónomo, aunque en muchos casos el crecimiento tumoral fue un poco más rápido en presencia de progestágeno.

En la **Figura 46** se observa las curvas de crecimiento tumoral del tumor MPA-D y de un tumor autónomo.

b. Sensibilidad a los estrógenos.

En la **Figura 47** se observan las curvas de crecimiento correspondientes a uno de los tumores autónomos creciendo en presencia o ausencia de MPA y de un tumor MPA-D creciendo con MPA. Se puede observar que la administración de E_2 (pellet de 5 mg) cuando los tumores tienen un tamaño aproximado de 100 mm² no produce ninguna alteración en el crecimiento del tumor autónomo mientras que inhibe significativamente el crecimiento del tumor MPA-D. En forma similar, cuando el tratamiento estrogénico se realizó antes del implante tumoral, no hubo alteraciones en el crecimiento en los tumores autónomos (**Figura 48**) mientras que el tumor MPA-D, aún en presencia de MPA, no creció hasta después de 90 días (**Figura 49**).

3. Inmunogenicidad de tumores inducidos por MNU o MNU+MPA.

Mediante el test de implante y escisión se evaluó el índice de inmunogenicidad de un tumor inducido por MNU y de uno inducido por MNU y MPA. Este índice es un cociente entre la dosis tumoral 50 obtenida en animales inmunizados y la misma obtenida en animales no inmunizados. En la **Tabla 5** se observa que los índices son bajos y corresponden a la clasificación de tumores medianamente inmunogénicos. En nuestro laboratorio los tumores considerados como no inmunogénicos tales como la línea LB de leucemia espontánea murina y la M3 de cáncer mamario espontáneo tienen un índice de 0.95 y 2.3 respectivamente y los altamente inmunogénicos como los fibrosarcomas inducidos por metilcolantreno tienen índices que oscilan entre 45 y >50 (Ruggiero R. y col., 1985). Los tumores inducidos por MPA son considerados como débilmente inmunogéni-

FIGURA 46
CRECIMIENTO DE TUMORES AUTÓNOMOS Y MPA-DEPENDIENTES (MPA-D).

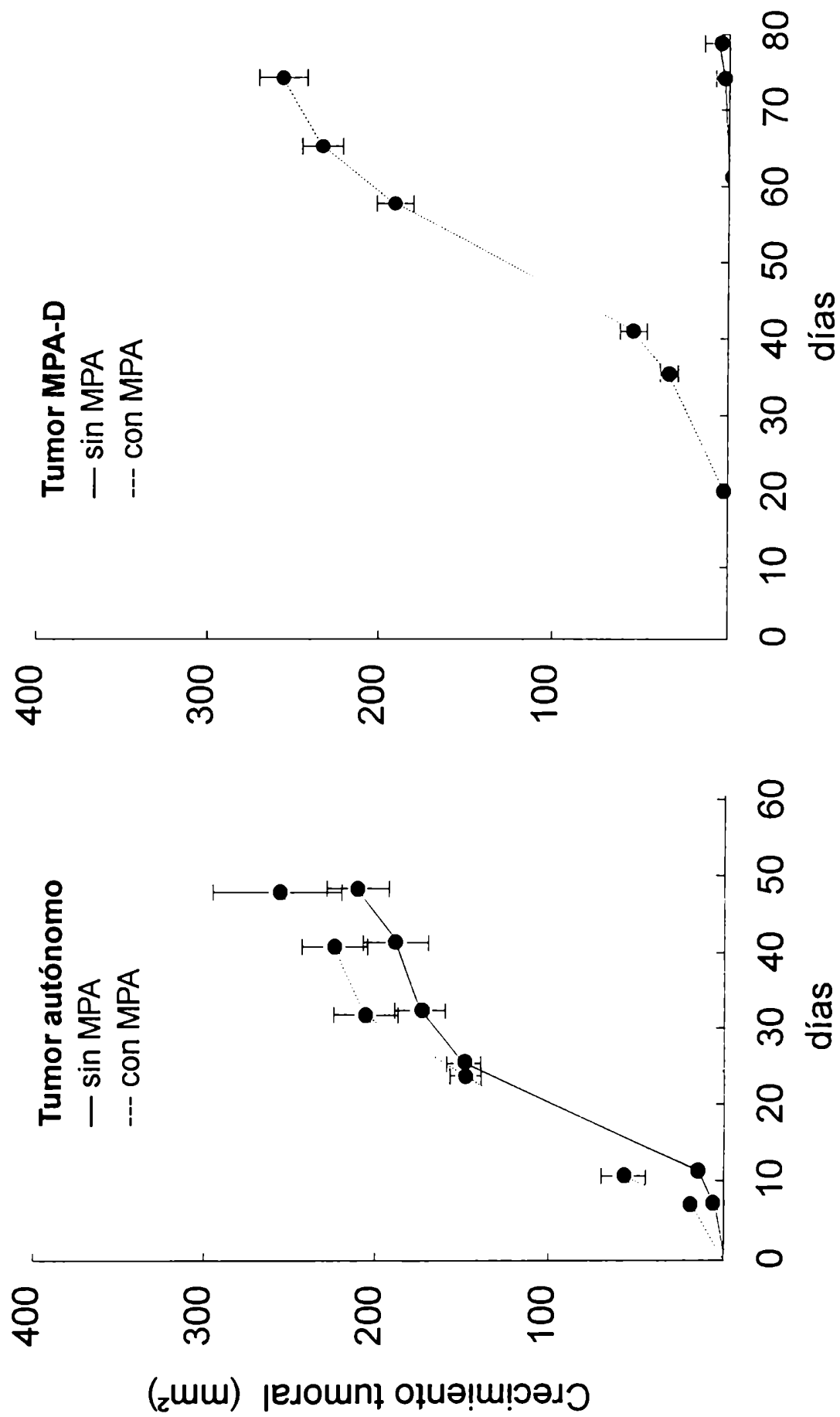


FIGURA 47
EFFECTO DEL 17- β -ESTRADIOL EN TUMORES AUTÓNOMOS
Y MPA-DEPENDIENTES (MPA-D) EN CRECIMIENTO.

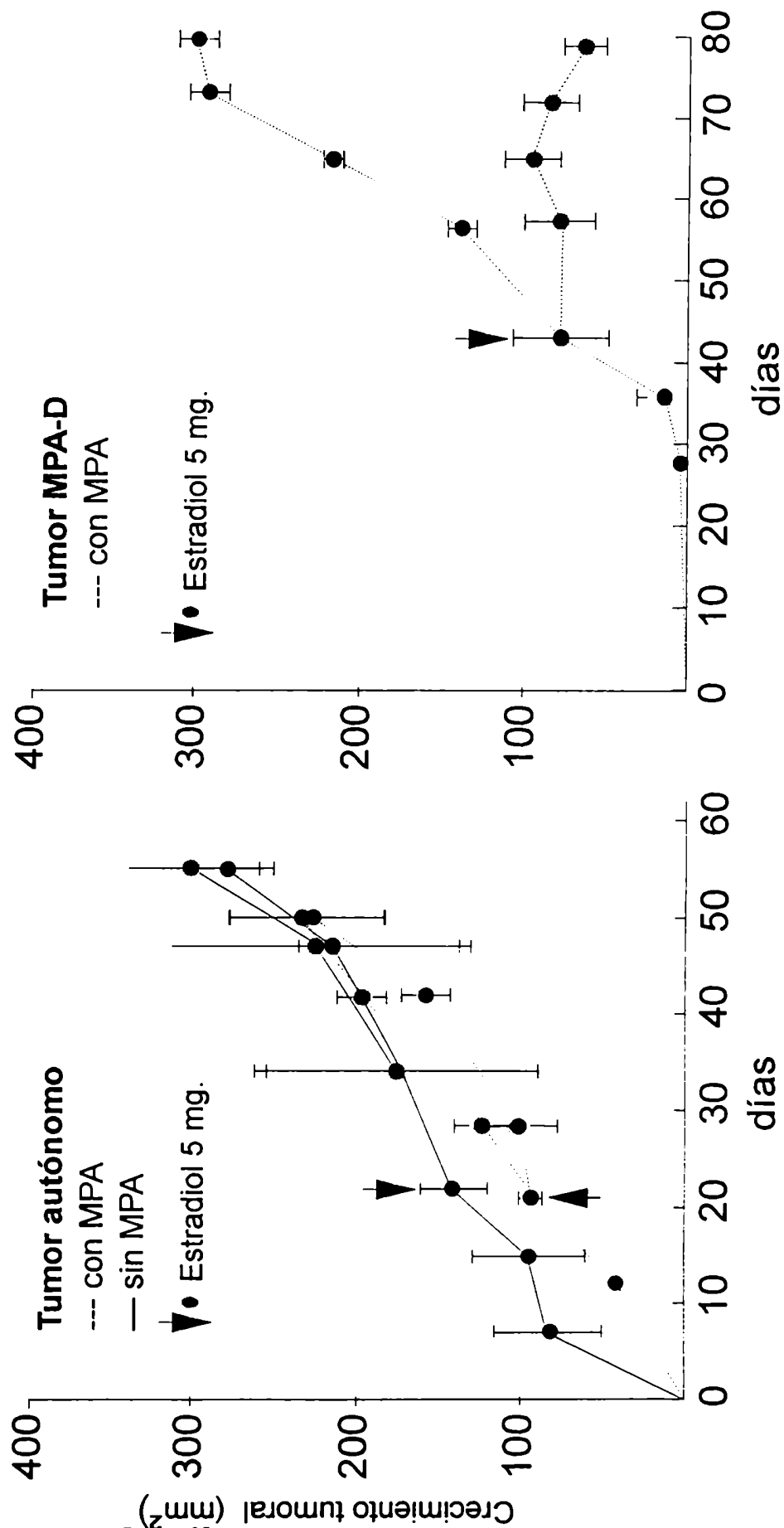


FIGURA 48
EFECTO DEL 17- β -ESTRADIOL EN TUMORES AUTÓNOMOS.

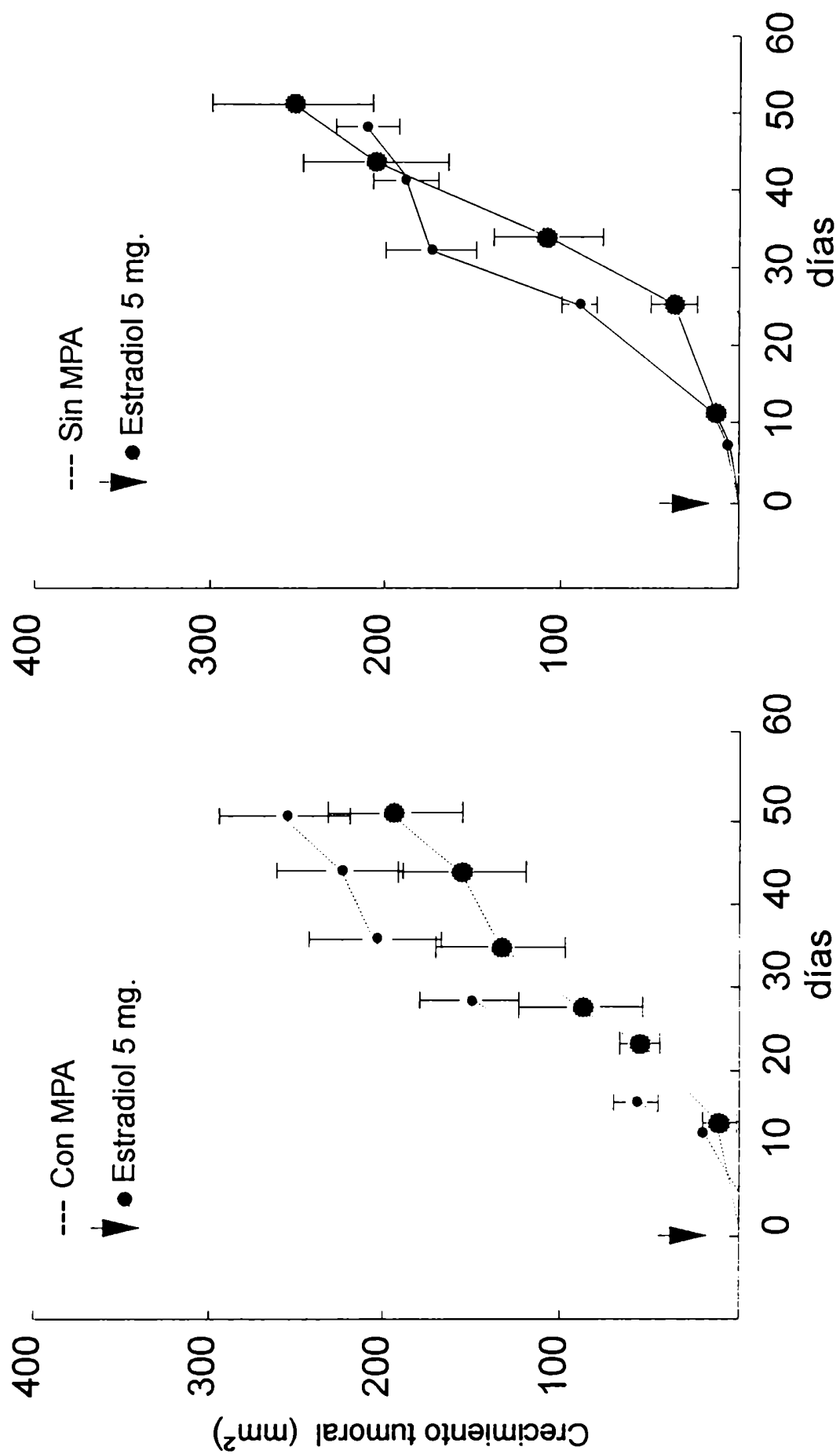


FIGURA 49
 EFECTO DEL 17- β -ESTRADIOL SOBRE EL IMPLANTE DE UN TUMOR
 CON COMPORTAMIENTO MPA-DEPENDIENTE (MPA-D).

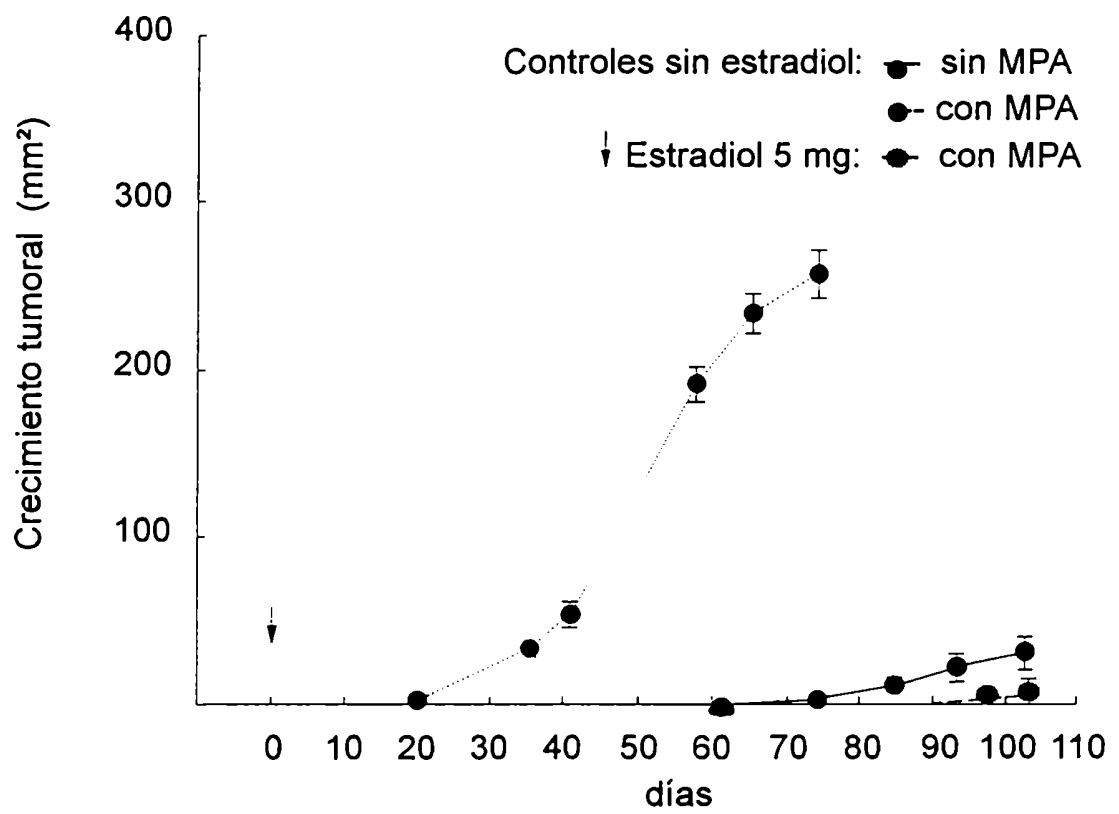


TABLA 5
ÍNDICE DE INMUNOGENICIDAD (II) DE LOS TUMORES
INDUCIDOS POR MNU Y MPA.

TUMORES	DT50 GRUPO CONTROL.	DT50 GRUPO INMUNIZADO.	ÍNDICE
MPA + MNU	43x10 ³ ± 1160	4x10 ± 51x10 ⁵ *	9.56
MNU	46x10 ³ ± 7110	19x10 ± 48x10 ³ *	4.3

*: p<0.05

COS.

El conjunto de estos resultados demuestra que los adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA y MNU o MNU sólo son similares y diferentes que los inducidos por MPA después de una larga latencia. La mayoría son adenocarcinomas mamarios de probable origen lobulillar que presentan distintos grados de diferenciación pavimentosa, no expresan RE ni RP y son insensibles al tratamiento con progestágenos o estrógenos. Cabe recordar que la mayoría de los tumores inducidos por MPA después de una larga latencia son ductales, MPA-D, con altos niveles de RE y RP y la mayor parte de los inducidos por Pg son lobulillares sin metaplasia pavimentosa, autónomos y sin RE y RP (Kordon E. y col., 1994).

IV. Lesiones uterinas inducidas por MNU y/o MPA.

Se estudiaron los úteros de la mayoría de los animales con adenocarcinomas mamarios que fueron autopsiados y de los que fueron sacrificados al finalizar el experimento, es decir, los resultados que se expondrán constituyen hallazgos de autopsia.

Las distintas lesiones uterinas fueron clasificadas en:

Lesiones epiteliales endometriales.

Hiperplasias glánduloquísticas, con o sin hiperplasia epitelial (Grado I).

Hiperplasia epitelial adenomatosa (Grado II)

Hiperplasia adenomatosas con atipías (Grado III)

Carcinoma de endometrio (Grado IV).

Lesiones del estroma endometrial.

Hiperplasias deciduales/deciduomas.

Hiperplasia glanduloquística (HGQ) con o sin hiperplasia epitelial.

Esta alteración se caracteriza por presentar distintos grados de dilatación de los espacios glandulares endometriales, que van desde una dilatación leve localizada, hasta la presencia de numerosas cavidades quísticas que tienden a atrofiar la estructura parietal del útero (**Figura 50**). De acuerdo al grado de dilatación de estas glándulas, pueden estar tapizadas por epitelio cilíndrico o cúbico bajo, que puede ocasionalmente presentar cambios secretorios (**Figura 51**). En ocasiones

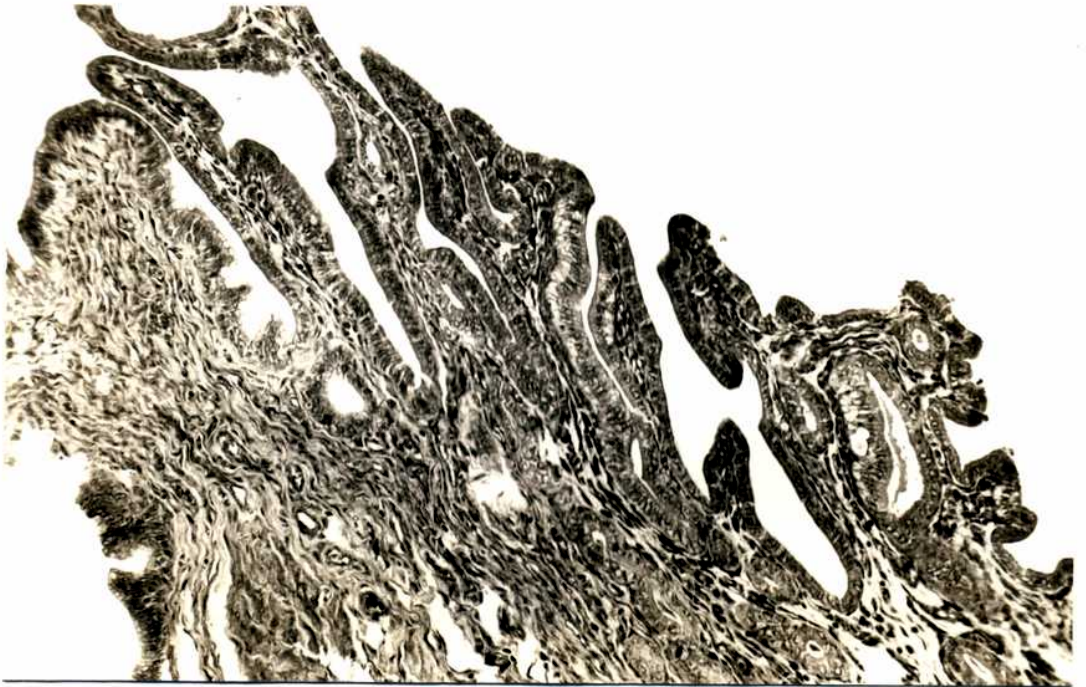
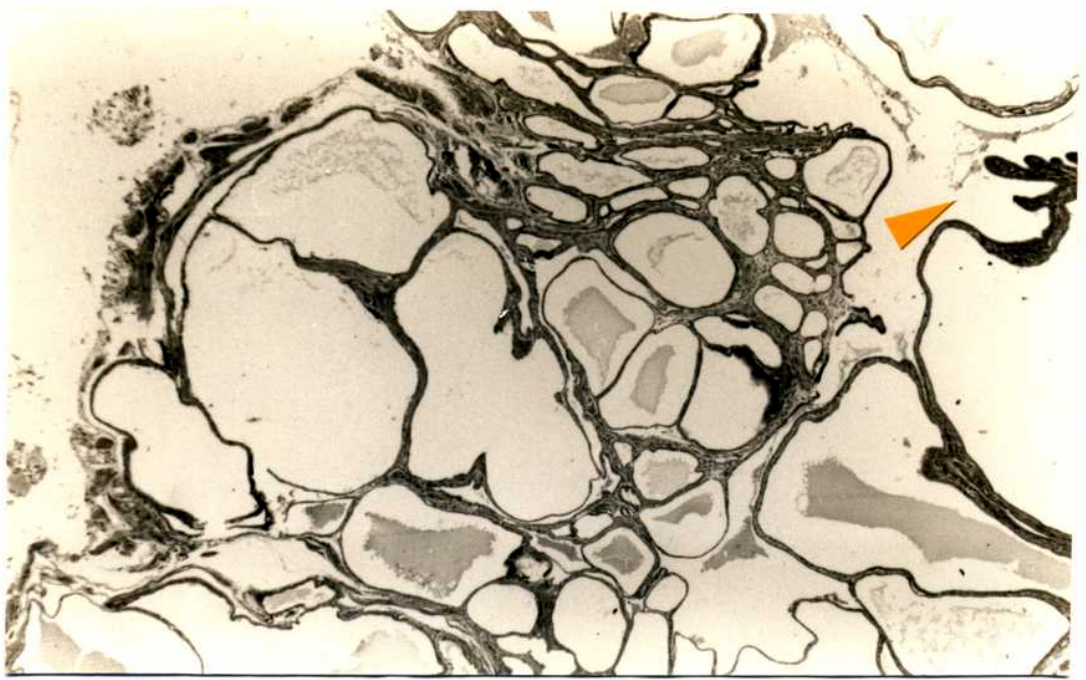


Fig. 50 Imagen característica de una hiperplasia glanduloquística de endometrio. En la lesión predominan los fenómenos de dilatación quística, con muy pocos focos de hiperplasia epitelial (flecha: hiperplasia papilar) (H&E, 25x).

Fig. 51 Otro aspecto de una imagen hiperplásica, en la que es evidente el estroma densamente fibroblástico. En focos, el epitelio cilíndrico proliferante presenta vacuolas subnucleares, remedando la imagen de un endometrio al principio de la fase secretoria (H&E, 100x).

este epitelio se desprende y deja desnudo un corion fibroblástico. La capa muscular puede presentar distintos grados de atrofia. Las cavidades quísticas pueden contener secreción serosa, seromucoide, mucoide o sanguinolenta en su interior; como consecuencia de la distorsión de la estructura del útero, el drenaje de estas cavidades es obliterado y la secreción puede infectarse, originándose una piometra. Sobre la base de esta lesión pueden asentar distintos grados de hiperplasia epitelial. La hiperplasia epitelial simple que suele acompañar a las HGQ se caracteriza por un discreto aumento del número de estructuras glandulares (**Figura 51**) o por la presencia de lesiones papilares (**Figura 52**) o pólipos verdaderos (**Figura 53**). El epitelio de revestimiento es siempre típico y maduro y puede presentar cambios secretorios (**Figura 52**).

Hiperplasia adenomatosa

El aumento del número de glándulas es más conspicuo; pueden observarse en ocasiones glándulas densamente dispuestas, sin estroma, originando la imagen que se conoce como espalda contra espalda. En el caso de la **Figura 54** coexistían amplias áreas de hiperplasia adenomatosa sin atipias con lesiones más graves (Tipo III). Aunque existe una marcada distorsión de la histoarquitectura, no existen atipias en esta lesión, sin bien puede ocasionalmente verse un aumento del número de mitosis.

Hiperplasia adenomatosa con atipias o carcinoma in situ.

La imagen dominante es de densa hiperplasia epitelial focal o difusa, con numerosas glándulas y la imagen típica de 'espalda contra espalda' (**Figura 54**), pero con una marcada atipia epitelial y un significativo aumento del número de mitosis (**Figura 55**). Se pueden observar mitosis atípicas. No existe en este tipo de lesiones signo alguno de infiltración del estroma. Todas las lesiones de este tipo observadas en este experimento fueron glandulares; no se observaron lesiones papilares.

Adenocarcinomas de endometrio.

Esta lesión se caracteriza por la presencia de células glandulares atípicas que infiltran el estroma y que pueden o no diferenciar estructuras glandulares o papilares o formar masas sólidas sin signos de diferenciación (**Figura 56**). En general, los carcinomas de endometrio surgidos de este modelo muestran una marcada anaplasia con un gran número de mitosis (**Figura 57**). Esta



Fig. 52 Area hiperplásica papilar creciendo dentro de una cavidad. (H&E, 100x). Obsérvese la imagen de vacuolización subnuclear, al igual que en la figura anterior.

Fig. 53 En esta figura se muestra un pólipo de gran tamaño que crece dentro de la cavidad uterina dilatada (flecha) (H&E, 25x).

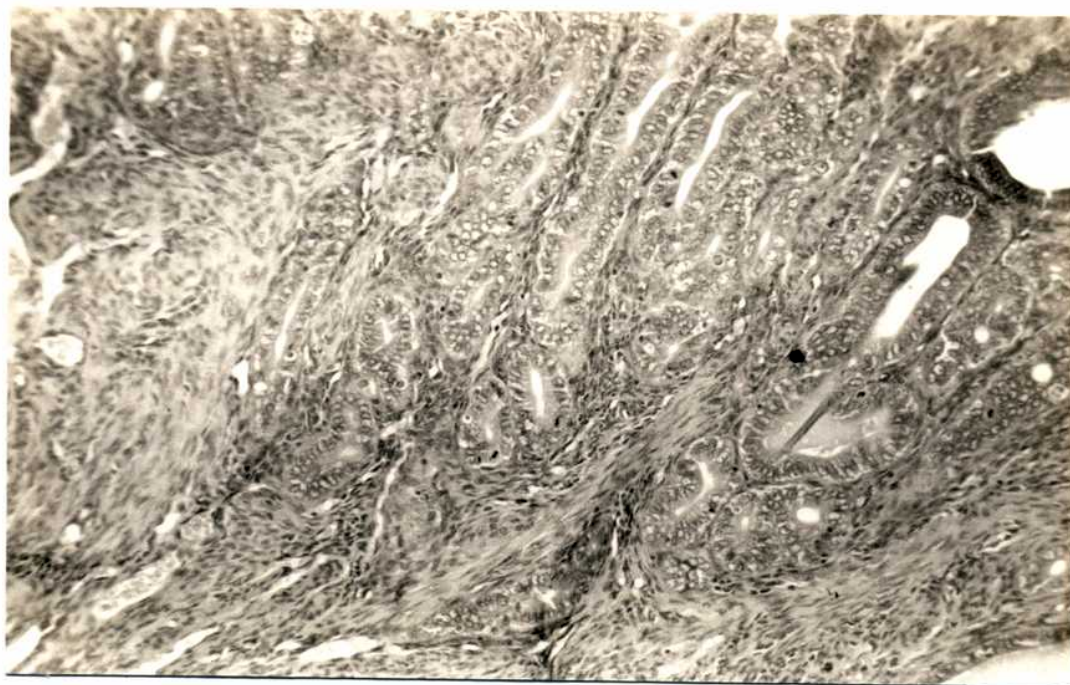
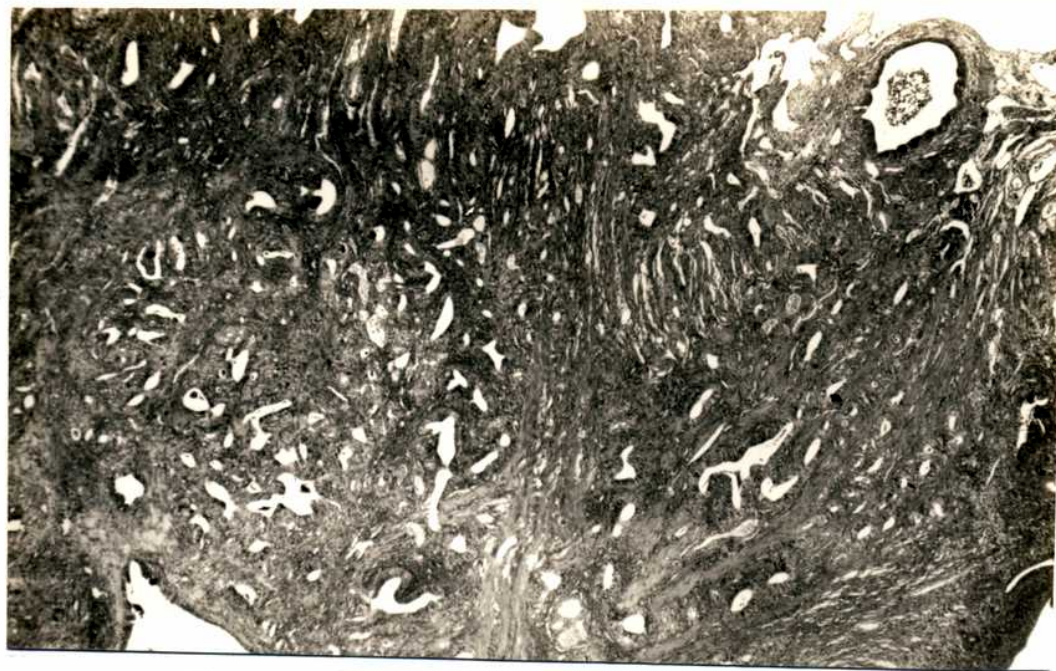


Fig. 54 Hiperplasia adenomatosa que compromete todo el endometrio. La lesión no es infiltrativa (H&E, 25x).

Fig. 55 Hiperplasia adenomatosa a mayor aumento. Las glándulas se disponen con poco estroma interpuesto ("espalda contra espalda"). Su trayectoria es irregular y se encuentra tapizada por epitelio cilíndrico atípico, en el que se observan numerosas mitosis. El estroma es escaso y fibroblástico (H&E, 100x).



Fig. 56 Imagen a bajo aumento de un carcinoma de endometrio. El crecimiento es sólido y lobulado y compromete todo el espesor de la pared uterina. Existen grandes áreas de necrosis. En la esquina inferior derecha existe un área de útero no neoplásico remanente (H&E, 25x).

Fig. 57 Area a mayor aumento de la figura anterior. La lesión es sólida, con escaso estroma. Se observan numerosas atipías y figuras mitóticas (H&E, 100x).

lesión, según la definición de cáncer, debería ser capaz de dar metástasis. En nuestro modelo no las hemos encontrado, y es probable que esto se deba a que como la mayor parte del experimento se dio por terminado antes del año, no hubo tiempo suficiente para completar el desarrollo del proceso neoplásico.

Deciduomas

Esas lesiones se caracterizan por la hiperplasia de células deciduales, que comienza alrededor de los vasos y crece hasta transformarse en verdaderas lesiones tumorales (**Figura 58 A y B**). En algunos deciduomas, las células proliferantes adquieren caracteres francamente atípicos, que impresionan más como alteraciones regresivas, que como un fenómeno neoplásico verdadero. En ocasiones las lesiones experimentan extensa transformación vascular, con desarrollo de cordones sólidos separados por canales tapizados por células de aspecto endotelial, dando la imagen de una proliferación hemangiopericitomatosa. Aparentemente el crecimiento de estas lesiones es autolimitado, ya que nunca vimos lesiones mayores que cierto tamaño, no se observaron lesiones infiltrativas y no se hallaron metástasis. Las lesiones más grandes experimentan fenómenos de necrosis de coagulación, que en ocasiones comprometen todo el deciduoma.

En la **Tabla 6** se muestran las lesiones observadas en cada grupo experimental. En cada grupo, la distribución de fechas de autopsias de los animales no fue diferente significativamente entre sí lo que permite cierta posibilidad de comparación.

La presencia de MPA es condición necesaria para el desarrollo de deciduomas, cuya incidencia parece depender del tiempo de exposición; no apareció ninguna de estas lesiones en los grupos que no recibieron MPA. Por otra parte tanto MPA como MNU inducen HGQ y no hay diferencias significativas entre los distintos grupos. Los resultados más conflictivos se observan al evaluar las hiperplasias epiteliales. Parecería que en este modelo de carcinogénesis endometrial MNU se comporta como iniciador exclusivo en las dosis elegidas, ya que no apareció ninguna lesión endometrial epitelial en los grupos tratados sólo con MNU. Una dosis sola sería suficiente para inducir el genotipo transformado. MPA se comporta como promotor típico, con excepción de los grupos en los que el tiempo entre la administración de MPA y la administración de la primera dosis de MNU era muy corto (Grupos 3 y 4) en los que la administración de la hormona parece

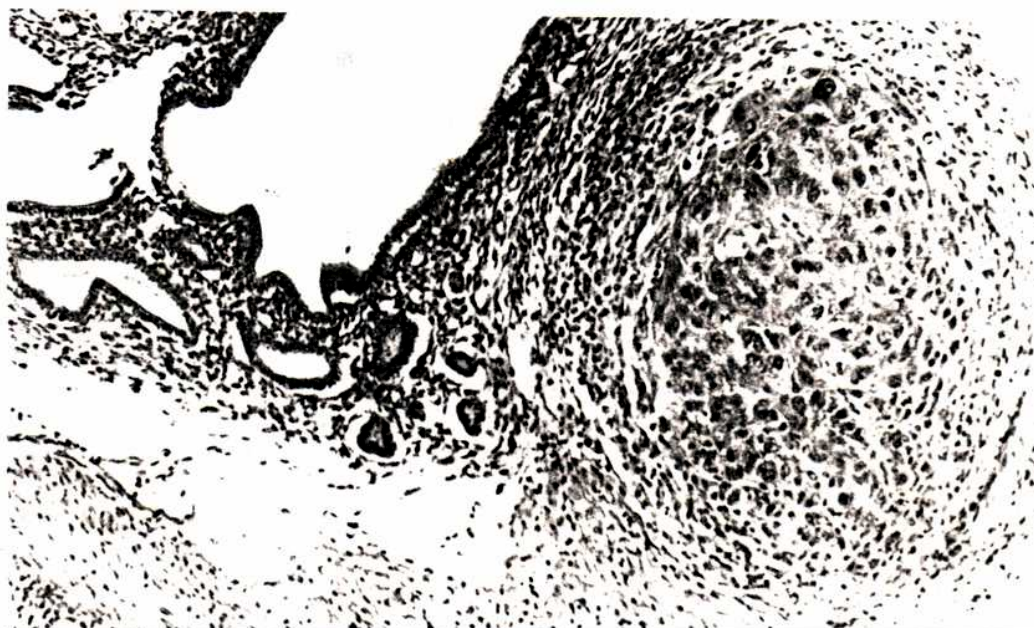
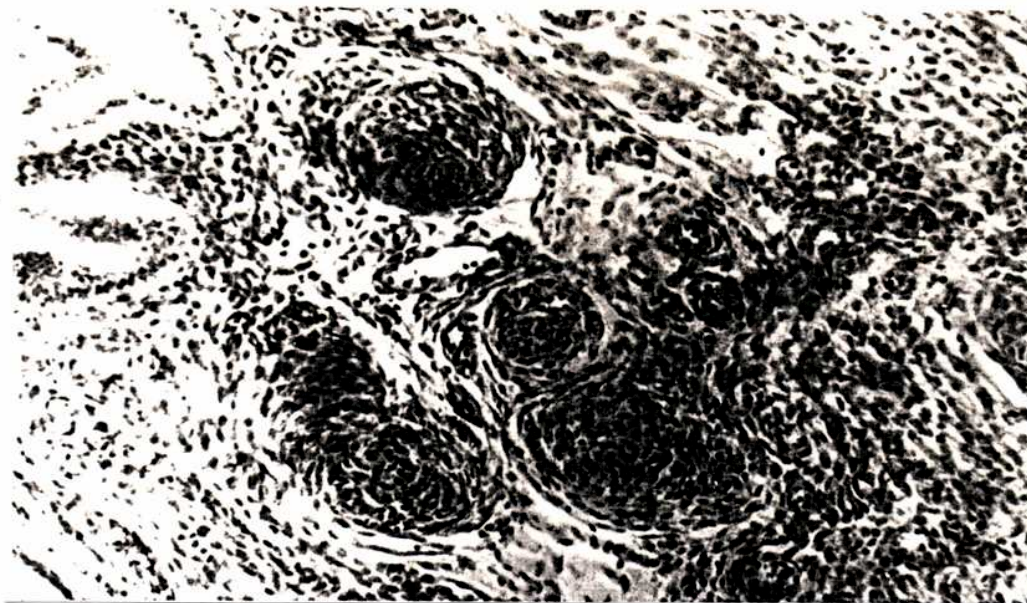


Fig. 58A Deciduoma creciendo en uno de los cuernos uterinos, con un foco de necrosis. Obsérvese la buena delimitación del tejido adyacente y la atrofia por compresión (H&E, 25x)

Fig. 58B En esta imagen a mayor aumento de un deciduoma, se observa una marcada anisocariosis, con picnosis e irregularidades nucleares que otorgan a la lesión un aspecto sarcomatoide (H&E, 100x)

Tabla 6

Protocolos	Total de casos	Deciduomas	HGQ e Hiperplasias I	Hiperplasias II	Hiperplasias III y Carcinomas
1. ---X-----	11	0 (0%)	7 (63%)	2 (18%)	0 (0%)
2. ---X--X--X-----	3	0 (0%)	2 (66,6%)	0 (0%)	0 (0%)
3. --↓-X--↓----	28	7 (25%)	22 (78,5%)	1 (3,5%)	0 (0%)
4. -↓-X-X-X-↓--	12	9 (75%)	8 (66%)	0 (0%)	0 (0%)
5. -↓-----X--↓- sham	23	15 (65,2%)	20 (86,9%)	6 (26%)	3 (13%)
6. -↓-----X--↓- sialo	12	6 (50%)	10 (83,5%)	1 (8,3%)	1 (8,33%)
7. -↓-----X--↓- control	14	7 (50%)	13 (92,8%)	2 (14,2%)	5 (35,7%)
8. -X-↓-----↓-	40	16 (40%)	34 (85%)	6 (15%)	5 (12,5%)
9. -↓--↑-----X---	23	2 (8,6%)	15 (65,2%)	7 (30,4%)	9 (39,1%)
10. -X---↓--↑-----	17	1 (5,8%)	12 (70%)	9 (52,9%)	4 (23,5%)
11. -↓--X-X-X-↓- ovx	6	2 (33%)	4 (66,6%)	0 (0%)	0 (0%)
12. -X-↓-----↓- ovx	12	5 (41,6%)	4 (33,3%)	0 (0%)	0 (0%)
13. -↓--↑-X-X-X- ovx	1	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)

Deciduomas

1 vs 4 p < 0,0003
 1 vs 5 p < 0,0005
 1 vs 6 p < 0,01
 1 vs 7 p < 0,007
 1 vs 8 p < 0,01

Lesiones Epiteliales

1 vs 7 p < 0,04
 1 vs 9 p < 0,01

proteger. El efecto promotor del MPA en la carcinogénesis endometrial depende de la presencia de un ovario funcionante, como lo demuestra el hecho de que no haya surgido ningún tumor en los animales ovx. Sin embargo en estos grupos sí surgieron decíduomas e hiperplasias glándulo-quísticas, lo que sugiere que en este caso el efecto ovárico no es necesario.

El tiempo de exposición a la hormona no parece ser de importancia crucial en la aparición de las lesiones endometriales, si el MPA ha estado presente al menos durante dos semanas, y mayores dosis no parecen aumentar significativamente la incidencia. La notable incidencia de tumores en el Grupo 9, en el cual el MPA fue eliminado y el MNU inyectado cuando los animales comenzaron a ciclar parecería indicar que la hormona ejercería un efecto inductor en este protocolo en particular.

Algún factor dependiente de las glándulas salivares modula la carcinogénesis endometrial, ya que la incidencia de lesiones II y IV de endometrio es menor en los animales sialo que en los controles.

V. Otros tumores

Los tumores de pulmón inducidos por MNU han sido ya extensamente descriptos por otros autores (Lijinsky W. y col., 1988), y su incidencia en nuestro experimento fue de un 100% en los grupos tratados con MNU (**Tabla 7**). Brevemente, se trata de lesiones neoplásicas de localización periférica, muchas veces de localización subpleural, con las características histológicas de un adenocarcinoma.

Macroscópicamente se identifican como lesiones nodulares de tamaño variable y color blanquecino, aunque las lesiones más voluminosas pueden presentar una coloración oscura debido a la presencia de fenómenos hemorrágicos. Microscópicamente están compuestos por células poligonales de tamaño relativamente uniforme, núcleo pequeño central y citoplasma eosinófilo. Las células muestran pocas atipias y un índice mitótico relativamente bajo. Los elementos celulares proliferantes constituyen, en general, masas sólidas y pueden diferenciar estructuras glandulares o pseudoglandulares con el aspecto de rosetas, en general sin luz central (**Figura 59 y 60**). Pueden también identificarse ocasionalmente imágenes papilares o pseudopapilares, algunas de las cuales pueden ser un artefacto, producto de la disgregación tisular prefijación o de la retracción secundaria a la deshidratación e inclusión en parafina.

TABLA 7

Determinación de incidencias de tumores de pulmón y leucemias en los distintos grupos experimentales.

PROTOCOLOS	Incidencia T. Pulmón	%	Incidencia de Leucemias	%
×	24/28	86	18/28	65
× × ×	12/13	95	6/13	43
▼ × ▼	31/35	88	7/35	19*
▼ × × × ▼	25/26	98	9/26	37
▼ × ▼ SHAM	27/32	84	1/32	3*
▼ × ▼ SIALO	16/20	80	1/20	5*
▼ × ▼ Control	17/20	86	2/20	10*
× ▼ ▼	44/50	89	7/50	15*
▼ ▲ ×	28/31	89	5/31	17*
▼ ▲ × × ×	13/14	92	4/14	28
× ▼ ▲	23/27	85	7/27	26*
× × × OVX	13/15	87	10/15	67
▼ × × × ▼ OVX	11/13	85	3/13	23
× ▼ ▼ OVX	11/14	78	2/14	14*
▼ ▲ × × × OVX	10/12	82	4/12	14

× :MNU 50 mg/kg.

▼ :implante de MPA depot 40 mg.

* :p <0.01 respecto
del primer grupo

▲ :extracción de MPA depot 40 mg.

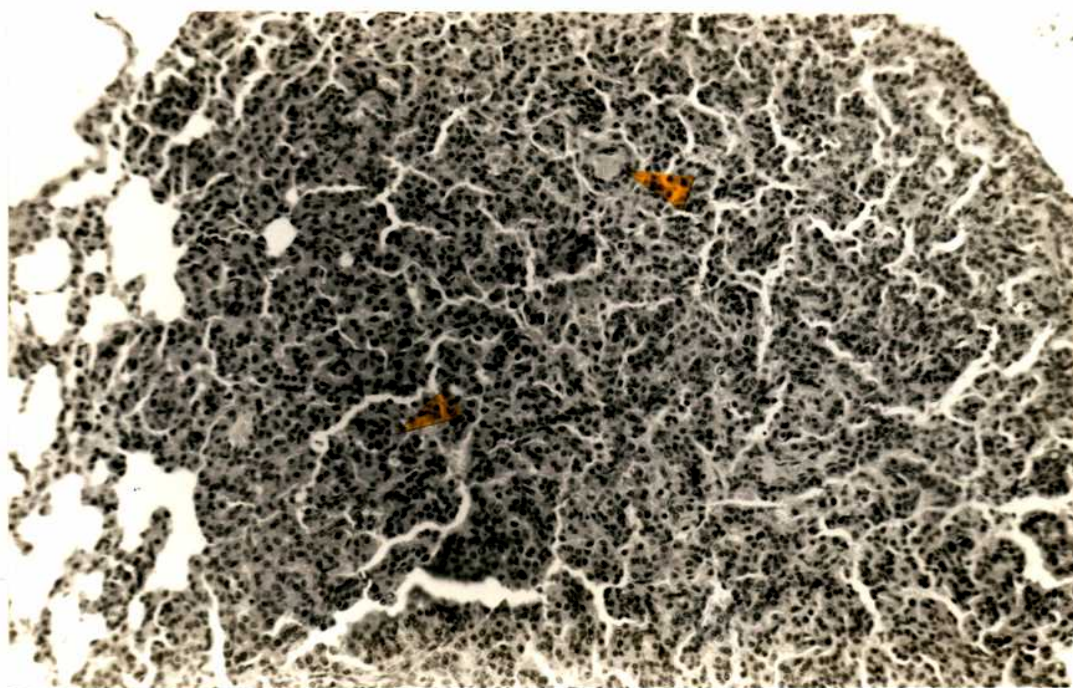
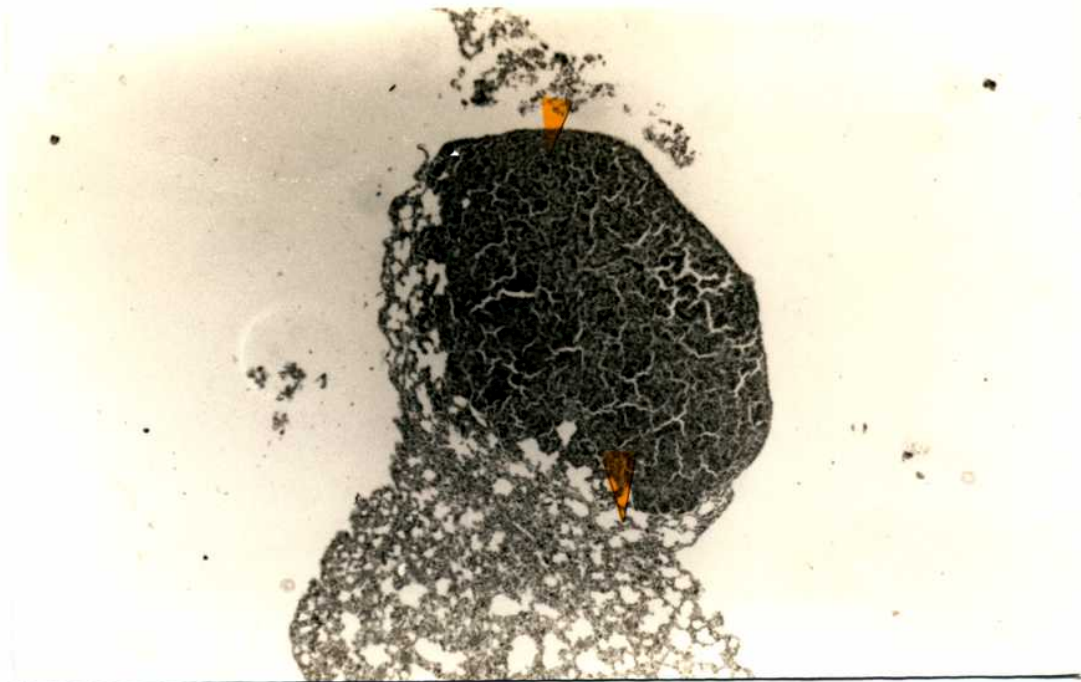


Fig. 59 Abajo aumento se observa un carcinoma primitivo de pulmón inducido por MNU. La lesión es ovoide de citología relativamente uniforme y límites aparentemente netos. Obsérvese la localización subpleural (H&E, 25x).

Fig. 60 Area a mayor aumento de la figura anterior. La neoplasia es sólida y está compuesta por células glandulares neoplásicas poligonales sin marcadas atipias (H&E, 100x).

Los adenocarcinomas pulmonares crecen manteniendo una forma ovoide, con límites relativamente netos y comprimiendo los tejidos circundantes, los que al atrofiarse forman una pseudocápsula. Esto otorga a la lesión, a bajo aumento, un aspecto encapsulado.

Si bien al comienzo se observa en general una lesión única, luego de algún tiempo de evolución aparecen lesiones múltiples, las que por su aspecto constituyen tumores primitivos, no diseminación intrapulmonar de la/las primeras lesiones. En el tiempo de seguimiento de este experimento no se observaron metástasis a distancia.

Además de los descriptos se observaron numerosas leucemias (**Tabla 7**), que en general se habían diseminado en el momento de la autopsia. La mayoría de los animales tenían compromiso parcial o difuso hepático, pulmonar, y esplénico y en ocasiones diseminación a otros órganos. La imagen es típica de un proceso proliferativo linfocitario, con infiltración tisular difusa por células linfoides atípicas, de aspecto redondeado, de gran tamaño, que terminan destruyendo las estructuras adyacentes. Se identifican mitosis con frecuencia. No se caracterizaron estas leucemias en cuanto a su origen B o T.

Se observaron también carcinomas pavimentosos de la región anal o perianal, y en una ocasión de vagina, en general bien diferenciados, con extensa infiltración. Microscópicamente mostraban una morfología "epidermoide" con presencia de un epitelio acantopapilomatoso y numerosas perlas córneas. No se observaron metástasis de estos tumores, los que podían crecer hasta alcanzar gran tamaño.

Otras lesiones que se observaron ocasionalmente fueron sarcomas de tipo fibroblástico, subcutáneos. Estas lesiones son francamente atípicas e infiltran extensamente.

VI. Estado inmunológico de los ratones tratados con MNU y/o MPA.

Teniendo en cuenta que los tumores de mama inducidos en este modelo de co-carcinogénesis tienen una inmunogenicidad moderada, y que existen trabajos describiendo un posible efecto inmunosupresor del MPA (Turcotte J. y col., 1968) nos pareció importante explorar la posibilidad de que en lugar de tratarse de un efecto promotor del MPA se tratara de un efecto inmunosupresor. Para ello se evaluó el estado inmunológico de los animales con distintos tratamientos mediante el desafío con glóbulos rojos de carnero y posterior evaluación de la respuesta inmune humoral y celular.

A. Medición del título de anticuerpos anti glóbulos de carnero en ratones tratados con MNU, MPA y MNU+MPA.

1. Respuesta primaria (7 días después del inóculo de GRC).

En La **Figura 61A** se muestra el título de anticuerpos hemaglutinantes en ratones tratados con MPA, MNU, MPA+MNU o controles, a los 7 días de iniciado los tratamientos. Se observa una disminución significativa del título de anticuerpos en ratones tratados con MNU con respecto al control ($p < 0.05$) y una significativa estimulación ($p < 0.01$) en ratones tratados con MPA. El tratamiento con MPA revirtió la inmunodepresión ocasionada por MNU ($p < 0.05$).

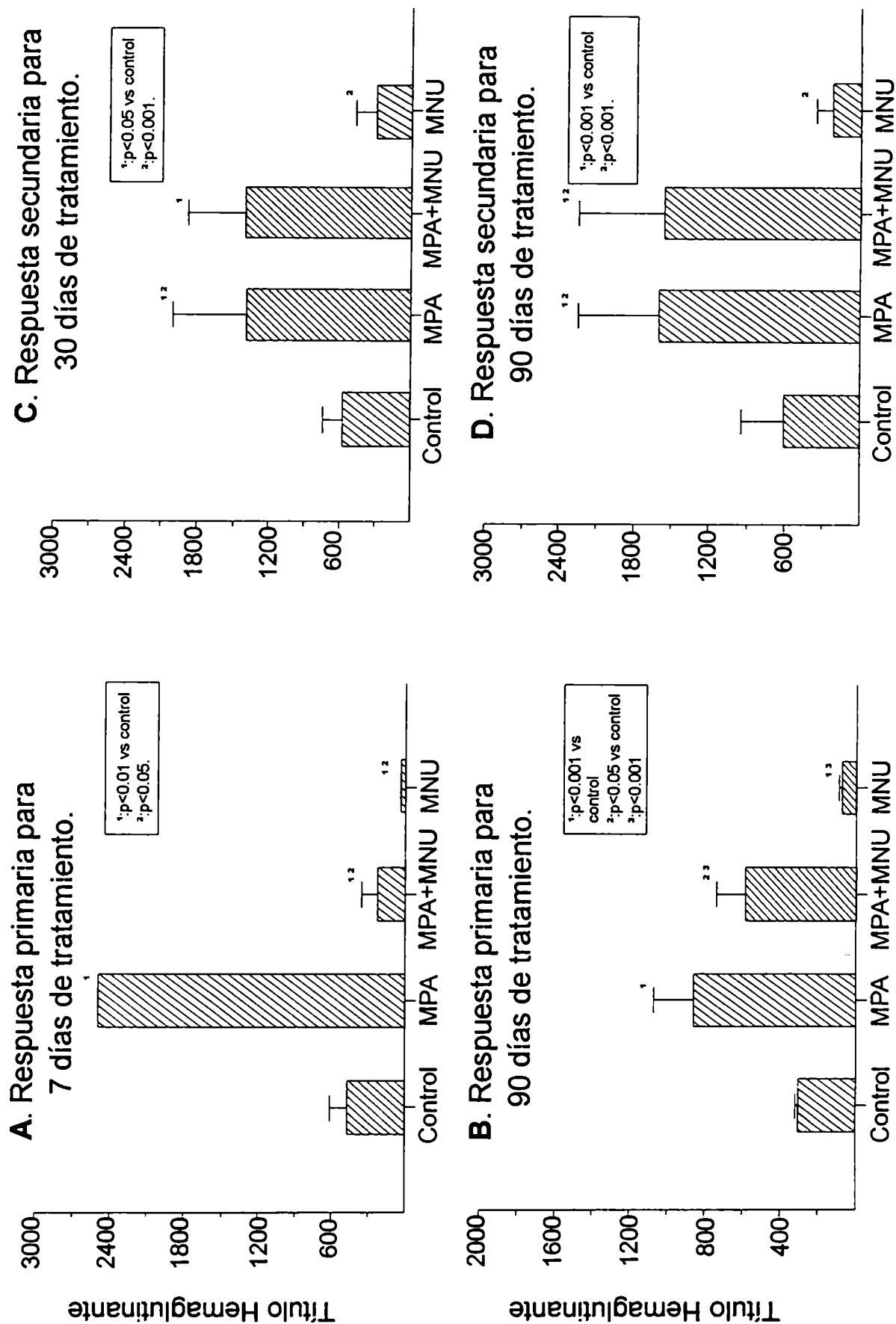
Los mismos experimentos se repitieron a los 90 días de haberse iniciado los tratamientos. Como se observa en la **Figura 61B** se obtuvieron resultados muy similares. En este caso el MNU no indujo un descenso del título de anticuerpos tan marcado como a la semana pero igualmente las diferencias fueron significativas con el control ($p < 0.05$). Los ratones tratados con MPA o MPA + MNU no mostraron diferencias entre sí y mostraron una fuerte inmunoestimulación con respecto al control ($p < 0.001$ y $p < 0,05$ respectivamente).

2. Respuesta secundaria (30 días después del inóculo de GRC).

Se evaluó el título de anticuerpos en ratones tratados durante 2 meses con MPA, MNU, MNU + MPA o controles. Al mes se inyectaron por segunda vez los GRC y se sangraron después de una semana de inyectar los GRC. En este caso, como se ve en la **Figura 61C**, los animales tratados con MNU y MPA se encuentran tan inmunoestimulados como los tratados con MPA sólo ($p < 0.05$ entre MPA + MNU y control).

Se evaluó también la respuesta secundaria en ratones inmunizados a los 3 meses de tratamiento y reestimulados con GRC 1 mes después; o sea sangrados a los 4 meses de iniciar los tratamientos (**Figura 61D**). Nuevamente los resultados obtenidos mostraron que el título de anticuerpos es significativamente mayor en los tratados con MPA y MNU+MPA que en los controles ($p < 0.001$) siendo también significativa la diferencia entre MNU+MPA y MNU ($p < 0.001$) (**Figura 61C**).

FIGURA 61



En conclusión, MNU actuaría como un inmunosupresor cuyo efecto sería más notorio en la respuesta primaria de anticuerpos. MPA ejercería un efecto inmunoestimulador ya evidente a los 7 días y constante capaz de revertir el efecto inhibitorio del MNU. Para etapas tempranas del tratamiento MPA revirtió sólo parcialmente el efecto inmunosupresor del MNU sobre la respuesta primaria. En cambio, para tratamientos prolongados, la reversión fue total e incluso la respuesta de anticuerpos fue superior a la del control.

B. Comparación entre la acción del MPA depot y MPA pellet.

Como el efecto inmunoestimulador tan marcado del MPA fue mayor del esperado, cabía la posibilidad de que el excipiente del MPA estuviera actuando como adyuvante. Para verificar que se trataba de un efecto hormonal se repitieron los ensayos usando animales tratados con MPA en forma de pellet. Como se ve en la **Figura 62**, el MPA administrado sin el excipiente también en tiene un efecto inmunoestimulador.

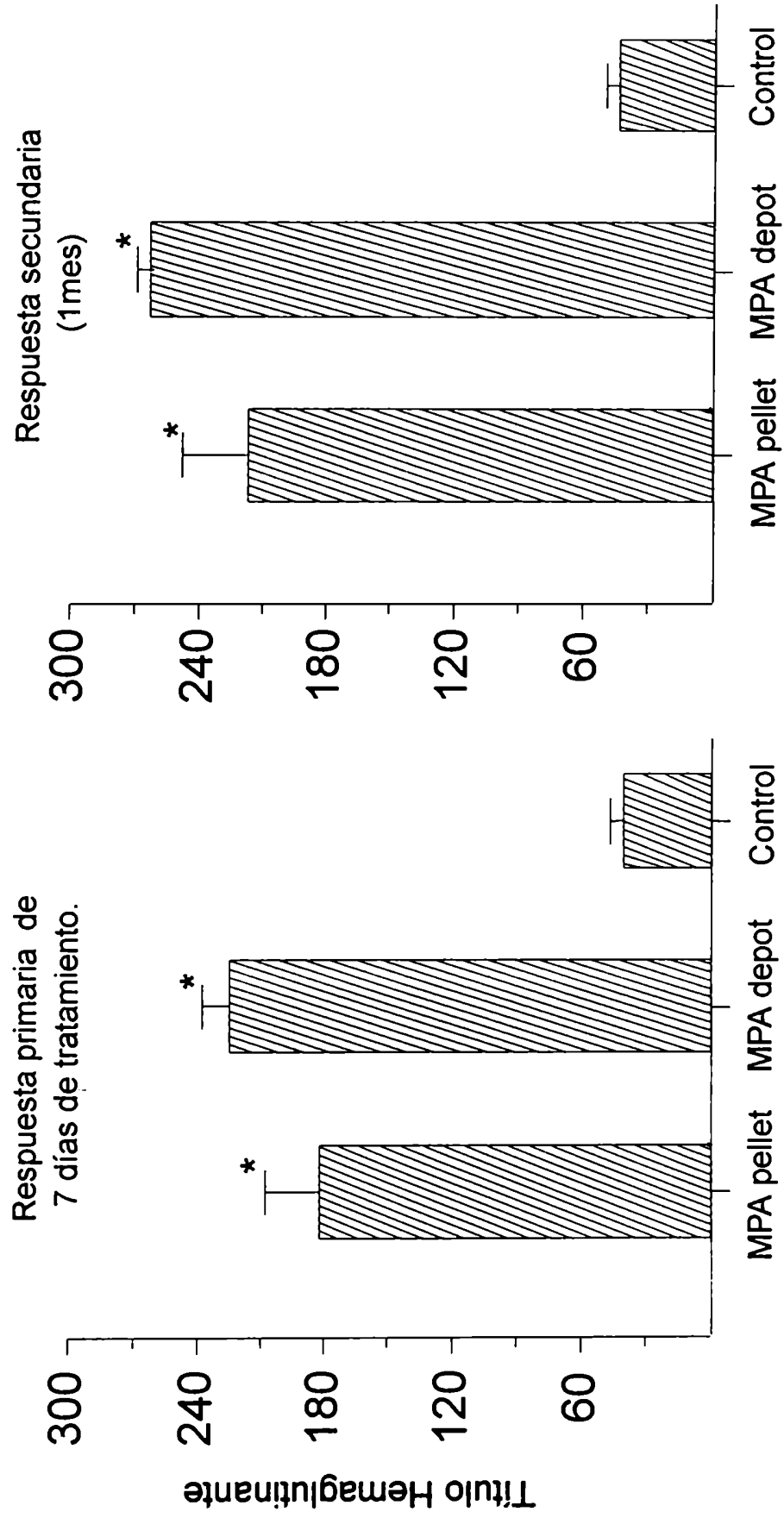
C. Efecto de un antiprogestágeno sobre la estimulación inducida por MPA.

Se evaluó la capacidad del antiprogestágeno onapristona (onaP) para inhibir el efecto inmunoestimulador del MPA. El objetivo fue confirmar que se trata de un efecto hormonal y no de un efecto alostérico de la molécula de MPA. Se repitieron los mismos ensayos usando ratones tratados con MPA que recibieron también un pellet de 1,7 mg de onaP. Como se observa en la **Figura 63**, a la semana de tratamiento la onaP tuvo un efecto inmunosupresor de la respuesta primaria de anticuerpos por sí mismo ($p < 0.01$), además de disminuir el efecto inmunoestimulador del MPA ($p < 0.05$). En cuanto a la respuesta secundaria, el onaP sólo inhibió el efecto estimulador del MPA ($p < 0.05$). Estos resultados demuestran que el efecto del MPA observado sería de tipo hormonal.

D. Reacción de hipersensibilidad retardada.

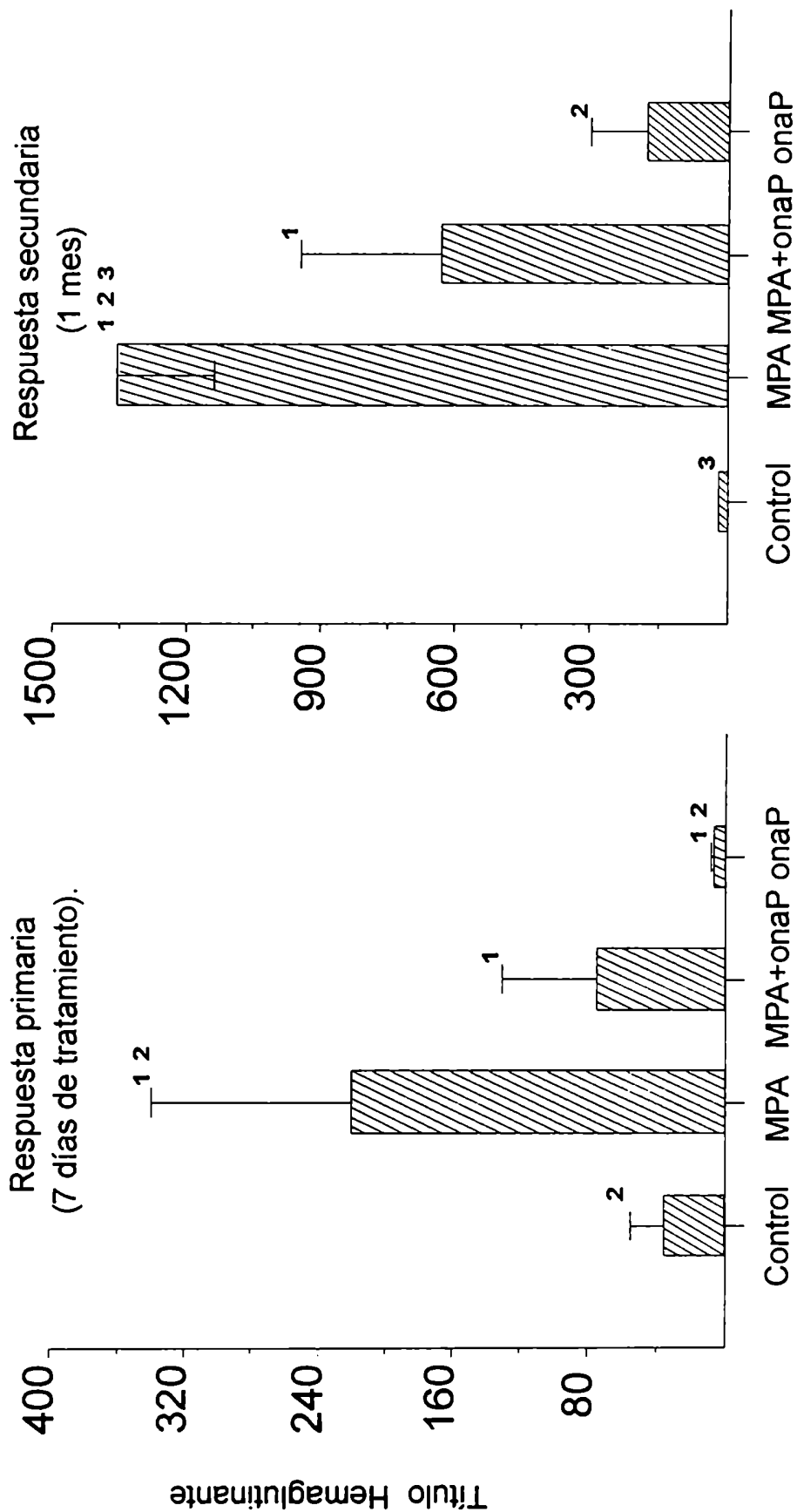
Para evaluar la respuesta celular se investigó la reacción de hipersensibilidad retardada en estos ratones inmunizados con GRC y tratados con MNU, MPA ó MNU + MPA. Como se observa en la **Figura 64**, las diferencias entre los índices de hipersensibilidad retardada de los distintos grupos

FIGURA 62
COMPARACIÓN ENTRE LA ACCIÓN DEL MPA pellet y MPA depot.



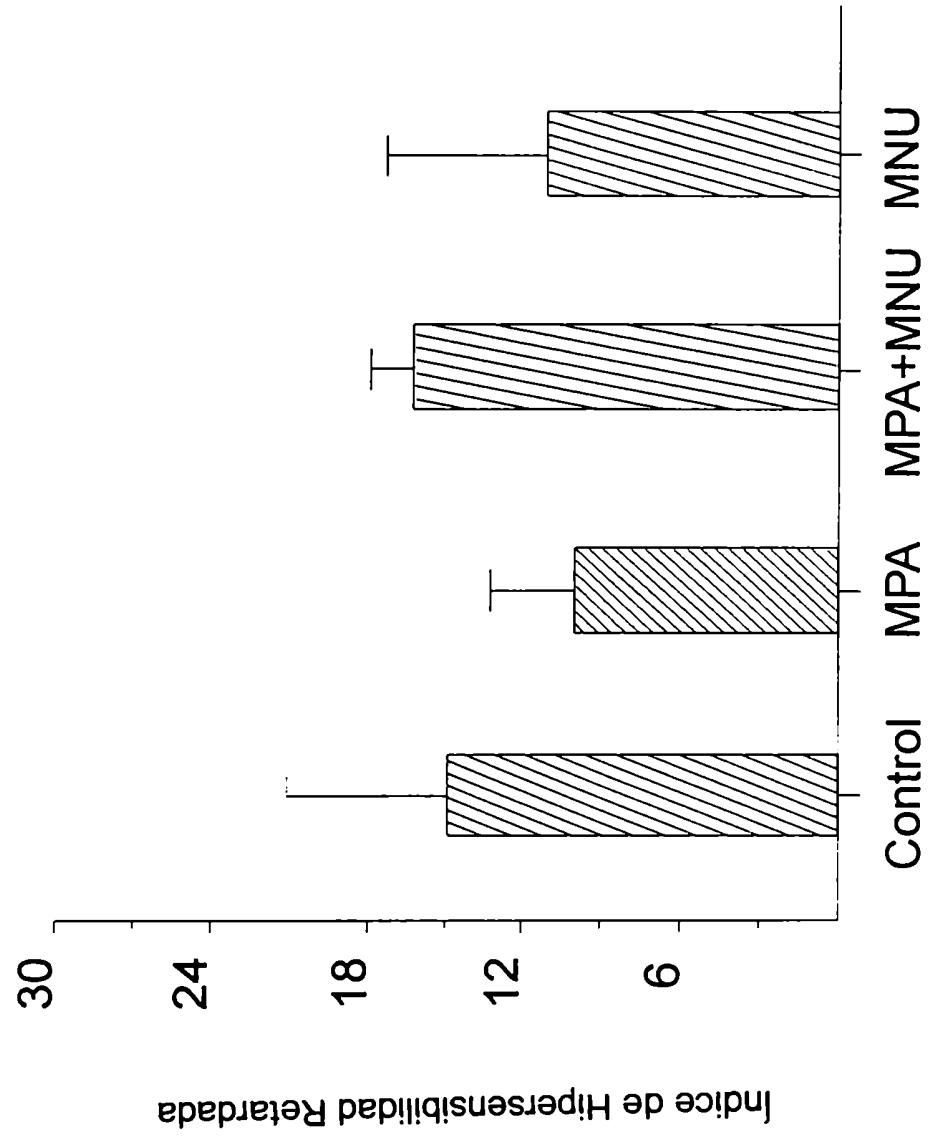
p: pellets de silastic. d: suspensión acuosa
*: $p < 0.001$, experimental vs control.

FIGURA 63
EFFECTO DEL ANTIPROGESTÁGENO ONAPRISTONA (onaP)
EN LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA DE BALB/c.



¹:p<0.05 todos vs control, ²:p<0.01 y ³:p<0.001 vs control

FIGURA 64
MEDICIÓN DE REACCIÓN DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA.



no fueron estadísticamente significativas. Este índice se calculó sustrayendo el grosor de la almohadilla plantar de la pata derecha inoculada con SF al de la pata izquierda inoculada con los GRC.

El conjunto de estos resultados demuestra que MNU induce una supresión marcada de la respuesta humoral, mientras que el MPA por el contrario, induce una fuerte estimulación. Por otra parte los animales tratados con MPA logran revertir la inmunosupresión de MNU. Este efecto del MPA estaría dado por sus efectos hormonales y no por una potencial actividad adyuvante del excipiente. Estos resultados implican que el aumento de tumores observado en animales tratados con MPA y MNU no se debería a que estos animales estuvieran más inmunodeprimidos que los de MNU, confirmándose así el efecto promotor del MPA.

DISCUSSION

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la importancia del entorno hormonal *in vivo* en la inducción de tumores de mama en el modelo de cocarcinogénesis por MNU y MPA. Se demuestra por primera vez el efecto promotor del MPA en la carcinogénesis y se sugiere que esta hormona puede jugar, además, un rol permisivo.

El MPA se comporta como carcinógeno mamario completo en ratones hembra de la cepa BALB/c (Lanari C. y col., 1986). Las lesiones mamarias inducidas por MPA sólo (en su gran mayoría ductales) son morfológica y biológicamente diferentes de las inducidas por MNU y MPA + MNU (lobulillares con distintos grados de metaplasia pavimentosa), lo que demuestra que los mecanismos de carcinogénesis mamaria son sumamente complejos y operan no sólo a través de distintas vías, directas o indirectas, sino probablemente sobre distintas células blanco o bien induciendo sobre las mismas células blanco madre cambios genéticos diferentes que las llevan a proliferar diferenciándose en distintos sentidos. En nuestro modelo, MNU actuaría como iniciador induciendo determinados cambios genéticos y MPA actuaría favoreciendo la expansión de esta población celular.

El desarrollo de la glándula mamaria a través de un estroma adiposo es un modelo ideal para el estudio de mecanismos de invasión. Durante este desarrollo, la proliferación celular ductal y la penetración del tejido fibroadiposo circundante es rápida y agresiva, incluso si se compara con lesiones malignas; sin embargo, este crecimiento es regulado estrechamente a nivel tisular por factores homeostáticos (Daniel C.W. y Silberstein G.B., 1987). Muchas observaciones sugieren que existe una subpoblación de células madre a lo largo de la glándula mamaria. El ciclo del desarrollo mamario -preñez, lactancia e involución- involucra replicaciones celulares masivas, diferenciación y muerte que pueden ser repetidos numerosas veces durante la vida reproductiva. La presencia de células indiferenciadas todo a lo largo de la glándula mamaria, que son capaces de responder a diversos estímulos ha sido sugerida en experimentos de trasplante. Diversos autores han demostrado que el trasplante de células obtenidas de cualquier región del árbol mamario pueden regenerar en otros huéspedes glándulas mamarias completas con capacidad de lactar (DeOme K.B y col., 1959; Daniel C.W. y col., 1968). Estas células madre pluripotenciales han sido denominadas "cap cells", lo que se puede traducir como células del casquete (Daniel C.W. y Silberstein G.B., 1987). No se sabe si estos elementos celulares primitivos de los brotes terminales de segunda generación surgen por dediferenciación de células mioepiteliales o ductales, o bien representan una población residual de

células madre indiferenciadas, que carecen de características morfológicas distintivas (Daniel C.W. y Silberstein G.B. 1987).

Una característica notable del epitelio mamario es su relación íntima con el estroma. Se ha demostrado que si se pone en contacto con estroma de glándula salivar, epitelio mamario de un neonato, se desarrolla un epitelio salivar característico, que sin embargo conserva su capacidad de sintetizar caseína bajos estímulos hormonales (Kratochwil K., 1969). Estos datos nos sugieren que estas células pluripotenciales son muy primitivas.

El carcinógeno MNU es ampliamente utilizado en distintas especies y su actividad tumorigénica puede ser observada sobre casi todos los tejidos y órganos, tanto *in vivo* como *in vitro*, por diferentes vías de administración y a distintas dosis (Hass H. y col., 1973; IARC., 1979). Anteriormente comentamos que previo a nuestros ensayos, no existían en bibliografía datos que demostraran que MNU actuara *in vivo* sobre la glándula mamaria de ratón (IARC., 1979; Lijinsky W. y Reuber M., 1988). Nuestros experimentos mostraron que MNU en tres dosis de 50 mg/kg era capaz de inducir adenocarcinomas mamarios en alrededor de 11-15% y que si se administraba MPA, en forma continua a lo largo de todo el experimento, la incidencia ascendía a 63-79%. (Pazos P. y col., 1992). Otros autores demostraron que en un modelo semejante, la acción conjunta de MNU y hormonas hipofisarias induce un alto porcentaje de tumores mamarios en ratones BALB/c (Guzman R. y col., 1992). Si bien hasta ese momento la mayoría de los trabajos sobre el rol de las hormonas como promotores de la carcinogénesis, se centraban en el papel de los estrógenos, hallazgos de nuestro laboratorio y otros (Lanari C. y col. 1986, Nagasawa H. y col. 1988, Russo I. y col., 1989) demostraron que los progestágenos podían participar positivamente en procesos de carcinogénesis en la glándula mamaria en el ratón .

Con el fin de poder separar el efecto iniciador de MNU del postulado efecto promotor del MPA elegimos un protocolo en el cual se empleó una dosis única de MNU de 50 mg/kg (Zarbl H. y col., 1985). Efectivamente, esta dosis resultó ser **iniciadora** en nuestro modelo, pues no indujo la aparición de carcinomas mamarios (Waldmann V. y Rabes H., 1992; Monis B. y Valentich M., 1993).

La proliferación celular en tejidos y órganos es esencial para la carcinogénesis (Pitot H.C., 1978; Sutherland D., 1987). En el caso del tejido mamario las hormonas mamotróficas son imprescindibles

para el desarrollo normal y pueden eventualmente actuar como promotores tumorales sobre células iniciadas en la carcinogénesis con distintos agentes: virus, radiaciones y químicos (Li J.J., 1991). En el momento del nacimiento, el epitelio mamario consiste en un cordón de células conectadas al pezón que termina en una estructura ramificada en el extremo distal. El desarrollo hasta este estadio estaría influenciado por estímulos mesenquimáticos y por la hormona de crecimiento. La fase siguiente del desarrollo transcurre durante la maduración sexual (4-7 semanas), donde ocurre un desarrollo muy rápido, alométrico, como consecuencia de una actividad mitótica muy intensa a nivel de brotes terminales. Aparentemente, el requerimiento hormonal mínimo en este período es de estrógenos y PRL o GH. En este período hay muy poco desarrollo alveolar. La última fase del desarrollo es la de la preñez, con el desarrollo de estructuras lobuloalveolares que llenan los espacios interductales, desarrollo que requiere además de las hormonas citadas, la presencia de P (Topper Y.J. y Freeman C.S., 1980). Se ha detectado la presencia de RE en las células luminales del brote terminal, en células ductales y en células estromales vecinas a las células "cap" que son las que tienen una alta tasa de proliferación (Daniel C.W. y col, 1997). Estas observaciones sugieren que los estrógenos actúan vía intermediarios estromales, y han sido apoyadas por estudios *in vitro* (McGrath C.M., 1983; Haslam S.Z. y Levely M.L, 1985). Estudios realizados por el grupo de Haslam (Haslam S.Z., 1988) han demostrado que los estrógenos actúan en forma diferente en la glándula inmadura, en la que tienen un efecto directo, que en la glándula de animales ya maduros, actuando en este caso por vía sistémica probablemente estimulando la secreción de PRL. La P por otra parte, no mostró tener efectos en la glándula inmadura mientras sí estimuló notablemente la proliferación en la glándula madura. Este efecto era sinergizado con estrógenos probablemente por la inducción de RP por estos últimos.

Otro de los factores que intervienen en el desarrollo normal de la glándula mamaria es el EGF. Daniel y col. (Daniel C.W. y Silberstein G.B, 1987) demostraron que el EGF es capaz de estimular en forma dosis-dependiente el crecimiento de los brotes terminales. Los R-EGF estaban localizados principalmente en el estroma que rodea la región de las células cap. Estos datos sugieren que el estroma parece ser el sitio de acción del EGF. Sin embargo, no se puede descartar que ese factor actúe directamente sobre las células epiteliales, cuyos receptores no pueden ser detectados debido a una regulación negativa. Los niveles de receptores serían mayores en las vírgenes y en la primer parte del embarazo, declinando en las últimas etapas de la gestación y lactancia lo que sugiere que el EGF es un factor mamotrófico ductal. Todos estos datos nos llevan a pensar que, tanto los estímulos

hormonales en el momento de la iniciación, como el estado de madurez de la glándula mamaria juegan un rol clave en la evolución del proceso de carcinogénesis.

El modelo de carcinogénesis mamaria por MNU en la rata ha sido considerado siempre como un modelo clásico (Gullino P. y col., 1975). En este modelo, la administración de MNU en animales intactos u ovariectomizados tratados con estrógenos (Sukumar S., 1990) o prolactina (Davio C. y col., 1991) induce una alta incidencia de adenocarcinomas mamarios. Los tumores, sin embargo, son morfológica y biológicamente diferentes a los del modelo presentado en este trabajo de tesis. Los tumores son ductales aunque pueden presentar metaplasia pavimentosa, la mayoría retrograda al ovariectomizar los animales y expresan altos niveles de RE, mientras que los inducidos por MNU + MPA o MNU en nuestro modelo son carcinomas lobulillares de crecimiento autónomo, con distintos grados de metaplasia pavimentosa, sin receptores hormonales.

Si bien en este trabajo de tesis no presentamos resultados sobre activación de oncogenes en estos tumores, en estudios previos realizados en colaboración con el laboratorio del Dr. EH Charreau, demostramos que el c-erbB2 se encuentra amplificado en un alto porcentaje de los tumores inducidos por MNU y MPA, no así en los dos únicos tumores inducidos por MNU (Gravano M. y col., 1993). Esta sobreexpresión no está asociada a la morfología tumoral, ya que de los tumores inducidos por MNU y MPA algunos eran adenocarcinomas con metaplasia pavimentosa (tipo II) como los inducidos por MNU sólo (resultados no publicados).

En los trabajos experimentales del grupo de Nandi se describen carcinomas mamarios similares a los obtenidos por nuestro grupo, son hormono-independientes y presentan metaplasia pavimentosa (Guzmán R. y col., 1992). Estos tumores se obtienen tratando con MNU *in vitro* células de mama de ratón BALB/c, las que luego se inoculan a los ratones que son tratados con distintos promotores. Cuando utilizaron P y PRL, obtuvieron carcinomas lobulillares con metaplasia pavimentosa, en cambio, cuando se usó EGF, la incidencia tumoral fue mucho menor y los carcinomas fueron de tipo ductal. Los tumores del grupo P + PRL expresaban el c-Ki-ras mutado en el codón 12, a diferencia de los tumores inducidos en rata los cuales tienen el c-Ha-ras activado (Sukumar S. y col., 1988). En experimentos realizados posteriormente inoculando MNU a ratones que tenían implantadas hipófisis en la cápsula del bazo para aumentar los niveles de Pg y PRL, los tumores fueron más heterogéneos

y sólo el 17% expresó el c-Ki-ras mutado. Estos resultados sugieren que los eventos que están ocurriendo en la glándula mamaria en el momento de la iniciación son claves para el desencadenamiento del proceso de carcinogénesis y son, aparentemente, mucho más complejos *in vivo*. No sólo es importante el estado proliferativo de la glándula mamaria sino también la calidad de los estímulos proliferativos que pueden estar expandiendo distintas células o estimulando a las mismas células a diferenciarse en distintos sentidos.

En otros trabajos también se ha observado sinergismo entre ras y c-erbB2 (Janes P. y col., 1994). El hecho de que hay algunos tumores biológicamente similares que no tienen el c-erbB2 amplificado, sumado a que Nandi y col. encontraron que sólo que el 17% de los tumores tienen el ras mutado, sugiere que existen otros oncogenes involucrados en este modelo de cocarcinogénesis, una hipótesis que había sido previamente considerada por otros autores (Magues y col., 1994).

En nuestros experimentos hemos demostrado la capacidad del MNU de inducir poblaciones celulares en una glándula mamaria normal, sin influencias hormonales exógenas, que después el MPA exógeno fue capaz de promover. Al medir en qué etapa del ciclo estral estaban los animales en el momento de inyectar MNU comprobamos que en los 3 únicos casos en que los ratones estaban en metaestro aparecieron tumores de mama. Si bien estas diferencias fueron estadísticamente significativas, el diseño experimental no nos permite tratar a este resultado con mucho rigor estadístico. Esto coincidiría en que los picos de progesterona más altos se han detectado en proestro tardío y en metaestro (Anderson C.H. y Battie C.W., 1992). En el modelo de rata en cambio se ha detectado mayor incidencia de tumores cuando MNU se inyectó en estro o proestro (Ratko T. y col, 1988; Anderson C.H. y col., 1991). Los tumores inducidos cuando se administró primero MNU y luego MPA tuvieron diferenciación pavimentosa, característica aparentemente que identifica al MNU. Cuando el MNU se aplicó una semana antes que el MPA, o sea a una glándula mamaria con células blanco de MPA proliferando, si bien la incidencia tumoral fue mayor, los tumores fueron principalmente de tipo I o sea más indistinguibles de los que la progesterona es capaz de inducir por sí sola después de una larga latencia (Kordon E. y col., 1993). En cambio cuando el MNU se aplicó dos meses después de haberse iniciado el tratamiento con MPA, o sea que las concentraciones de MPA son más bajas y las de EGF más altas vuelve a manifestarse el fenómeno de metaplasia pavimentosa. Si bien desconocemos los fenómenos que subyacen a esta diferencia, los resultados avalan los postulados de Nandi y col. acerca

de la importancia del entorno hormonal que modula el proceso de iniciación, ya que en estos 3 protocolos experimentales el esquema de promoción es relativamente similar (Nandi S. y col, 1995).

Al finalizar el experimento, a los 9 meses, quedaban bastantes animales vivos del grupo inoculado con una dosis de MNU, grupo en el cual no aparecieron tumores. Tuvimos que tomar la decisión de elegir entre autopsiarlos a todos para estudiar los úteros o estudiar una de las propiedades que caracterizan a los promotores que es la capacidad de actuar aún mucho tiempo después que actuó el agente iniciador (Beremblum I., y Shubik P., 1947; Pitot H. 1978). Efectivamente el MPA indujo la aparición de tumores a los 3 meses aproximadamente (4/4 vs 0/5) aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Estas observaciones apoyan los resultados anteriores que demuestran que el MPA actúa como promotor.

En los protocolos experimentales en los cuales se inoculó primero la hormona y después el carcinógeno químico se evalúa la suma de por lo menos dos acciones de la hormona, que se reflejan en el aumento de la incidencia, una actividad de promotor y una de agente permisivo. Un agente permisivo es aquel que provoca un cambio en la célula que favorece la acción de un carcinógeno o simplemente aumenta el número de ellas haciendo más probable que éste actúe sobre algunas (Pike M. y col., 1983; Sutherland D., 1987). Este efecto permisivo también se evaluó en animales ovx. Curiosamente no hubo diferencias significativas entre animales ovx y enteros cuando el MPA estuvo inoculado antes que el MNU. Por el contrario, MPA no tuvo efecto promotor en ratones ovx inoculados con MNU. Estos hallazgos nos señalan por un lado la importancia de la presencia de una mama no atrófica en el momento de la iniciación y por otro lado la capacidad del MPA de inducir proliferación en la glándula mamaria aún en ausencia de ovarios. Estos datos se correlacionan con las observaciones de las glándulas mamarias en los estudios de montaje total y coincide con los resultados de otros autores sobre los efectos proliferativos de la P sobre la glándula mamaria (Haslam S.Z., 1988).

En otros modelos experimentales el estudio de la acción de la ovx sobre la carcinogénesis y especialmente con MNU, ha demostrado la importancia de las hormonas gonadales tanto en la inducción como en el mantenimiento en pasajes de líneas tumorales *in vivo*, sobre todo teniendo en cuenta que en estos modelos los tumores suelen ser hormono-dependientes (Gullino P. y col., 1975; Arafah B. y col., 1980; Sukumar S., 1990). En ratones también se ha demostrado la estimulación prolongada con hormonas favorece la inducción de tumores mamarios por carcinógenos químicos

aunque la mayoría no depende de ellas para su crecimiento (Medina D., 1981; Nandi S. y col., 1995). En el modelo de inducción de carcinomas mamarios con MPA, pudimos observar que la ovx previa al tratamiento disminuye significativamente la capacidad tumorigénica de MPA y previene el crecimiento de los tumores MPA-D transplantados (Lanari C. y col., 1989). Los ovarios, además de ser la fuente principal de estrógenos y progesterona, producen factores como TGF-beta, activinas e inhibinas, todos ellos moduladores de la producción de sustancias mamotróficas en hipófisis, gónadas y placenta (Massagué J. y col., 1992).

Como ya se mencionó anteriormente, entre los factores mamotróficos relacionados con la proliferación de células mamarias se encuentra el EGF, un polipéptido sintetizado en varios órganos y especialmente por las glándulas salivares de roedores (Bullock L. y col., 1975; Carpenter G. y Cohen S., 1979). Se sabe que en la glándula mamaria de ratón su síntesis está regulada por hormonas lactogénicas como PRL e hidrocortisona (Fenton S. y Sheffield L., 1991; DiAgustine R. y col., 1992). Este factor estimula el epitelio mamario inclusive se ha logrado medir un aumento de los niveles intracelulares de AMP cíclico (Yang J. y col., 1980). Distintos trabajos muestran que la sialo afecta al desarrollo de la mama normal (Okamoto y Oka, 1984; Fisher y Lakshmanan, 1990); como así también al desarrollo de tumores mamarios en ratones de las cepas C3H, SHN y GR (Kurachi H. y col., 1985; Inui T. y col., 1989).

Hace algunos años se ha demostrado que el MPA puede unirse a los receptores de andrógenos en las glándulas submaxilares de ratón induciendo un aumento de síntesis de EGF (Bullock y col., 1975).

El rol del EGF sérico sobre la mama ha sido un tema discutido, si bien normalmente el EGF se encuentra elevado en plasma en ratones preñadas y en nodrizas, este aumento es muy poco notorio aunque la sialo logra revertirlo (Kurachi H. y col., 1985b). Perheentupa J. y col.(1984), encontraron que el aumento de EGF-GS no contribuye significativamente al contenido de EGF-S en ratones de la cepa BALB/c y por lo tanto le restaron importancia en la regulación del crecimiento de otros órganos distintos a las salivares. Al medir nosotros la concentración de EGF-S en animales sialo y normales tratados con MPA comprobamos que la sialo provoca una caída a valores inferiores de los normales y que el progestágeno genera un incremento sostenido en los niveles séricos de este factor. Este aumento se hace evidente a partir de las 3 ó 4 semanas de comenzado el tratamiento con MPA y

aparentemente es como si un mecanismo de control fuera sobrepasado por la continua presencia del esteroide. Los valores de niveles de EGF-S fueron similares a los obtenidos por otros autores en machos después que han sido sometidos a una estimulación alfa-adrenérgica (Fisher D. y Lakshmanan J., 1990).

Nosotros hemos comprobado también la importancia de las salivares en la inducción de tumores mamarios por MPA en hembras BALB/c, ya que la sialo previa a la administración de MPA, disminuye significativamente la incidencia de adenocarcinomas mamarios respecto a los controles (Kordon E. y col., 1994). En este trabajo demostramos que las glándulas mamarias de ratones sialo tratados con MPA tienen una hipotrofia muy marcada con respecto a los respectivos controles tratados con MPA. Esta diferencia de desarrollo entre ratones controles y sialo podría ser suficiente como para justificar para la observada reducción de la incidencia tumoral. En el modelo de cocarcinogénesis de MPA+MNU las glándulas mamarias hipertróficas estarían por un lado más expuestas a la iniciación de MNU y por otra parte estarían expuestas permanentemente a la acción de MPA junto con la acción de EGF salivar, favoreciéndose la fase de promoción. El hecho que las diferencias entre el número de tumores inducidos en el grupo que recibió MPA una semana antes de MNU (todavía no hay aumento de EGF sérico) y MPA 2 meses antes de MNU (cuando los niveles de EGF sérico son altos) sugerirían que el efecto de EGF estaría dado principalmente en la fase de promoción. Obviamente estos grupos difieren entre sí no sólo en la concentración de EGF circulantes sino también en las concentraciones de MPA circulantes en el momento del inóculo de MNU que probablemente sean diferentes a la semana que a los 2 meses; si bien se trata de sistemas de liberación lenta en los cuales el depósito de MPA dura más de 3-4-meses (Molinolo A.A. y col., 1987). La interpretación es aún más compleja si se tiene en cuenta que en la salivar se producen otros factores como NGF, renina, calicreína y proteasas, cuya actividad podría también facilitar la tumorigénesis mamaria (Fisher D. y Lakshmanan J., 1990) y cuya acción no se ha evaluado, sólo permite inferir estos resultados.

Probablemente EGF y MPA actúen sinérgicamente induciendo la proliferación del epitelio mamario, como demostraron otros autores en estudios *in vitro* (Imagawa W. y col., 1985) o bien que el EGF provoque un aumento en el contenido de RP en las células epiteliales, como se evidenció en útero (Sumida S. y col., 1988).

Independientemente de cuáles sean las vías que potencien la cocarcinogénesis mamaria, los

tumores surgidos en los animales sialo no fueron distintos en morfología o comportamiento biológico al resto de los grupos.

Hemos evaluado también el efecto de la exposición al MPA previo al inóculo de MNU. Cuando el objetivo es definir el rol promotor o iniciador de un compuesto cualquiera en el proceso carcinogénico, resulta imprescindible cambiar el orden de los agentes. Tratándose de una hormona que podría tener, hipotéticamente, por sí misma efectos iniciadores resulta muy difícil pensar cual sería el tiempo de exposición necesario para provocar este efecto. Cuando se trata de iniciadores químicos generalmente se habla de mutágenos, agentes de acción instantánea, sin embargo, cuando se habla de que las hormonas podrían tener acción iniciadora, es decir que tienen la capacidad para formar aductos con el DNA o proteínas se supone que esto no es un fenómeno instantáneo. Se ha descrito la capacidad de metabolitos del E₂ derivados de la vía de la 16-alfa-hidroxilación que tienen cierta capacidad de formar aductos con proteínas y con DNA (Fishman J. y Suanek G.D., 1992). Se ha asociado una mayor incidencia de cancer en pacientes con esta vía aumentada y en experimentos *in vitro* se ha comprobado esta asociación (Telang N. y col., 1992). Sin embargo se supone que estos pacientes están expuestos durante mucho tiempo a estos metabolitos. Establecer el tiempo de exposición al MPA para evaluar una posible acción iniciadora separada de su acción hormonal nos pareció casi imposible. Evaluamos por lo tanto el efecto de inocular durante 2 meses el MPA, eliminar el efecto hormonal removiendo el depósito de MPA y recién en ese momento inoculamos el carcinógeno químico. Con este experimento podíamos investigar si el tratamiento con progestágeno previo inducía una diferenciación de la glándula mamaria que la hacía más refractaria al tratamiento con MNU, o por el contrario si favorecía la carcinogénesis por MNU. En general se ha postulado que la diferenciación de la glándula mamaria disminuye la cantidad de células madre (Russo J. y col., 1982). Sin embargo este concepto tan tradicional ha sido cuestionado recientemente por el grupo de Nandi donde se sugiere que sería el descenso de los niveles de GH característico de ratas multíparas, lo que causaría una disminución de la susceptibilidad de la glándula mamaria, posiblemente disminuyendo los niveles de RE y de EGF (Thordarson G. y col., 1995). En nuestros grupos experimentales en los cuales el progestágeno fue administrado antes, se observó mayor número de tumores que en los respectivos controles, pero las diferencias no alcanzaron a ser estadísticamente significativas. Estos resultados implicarían que el MPA, favorecería la exposición de mayor número o distinta calidad de células más sensibles al MNU, pero la falta de acción promotora sería la causa del bajo número en general de

tumores.

Los estudios de montaje total de las glándulas mamarias no suministraron datos muy interesantes. Hubiéramos deseado encontrar lesiones características de MPA, diferentes a las de MNU+MPA y a las de MNU. Si bien se pudieron establecer algunas diferencias que caracterizaran a cada agente carcinogénico; en muchas lesiones no fue posible identificar por la descripción de la mama a qué grupo pertenecía. En general las mamas tratadas con una dosis de MNU no mostraron diferencias con las de una vírgen lo cual es bastante razonable si pensamos que los agentes iniciadores no producen cambios morfológicos, son solo mutágenos. En cambio, las mamas de los ratones tratados con 3 dosis de MNU, algunos no mostraron cambios mientras que otros experimentaban cambios que podrían ser considerados como hormonales ya que había mayor grado de ramificaciones y dilataciones de los conductos. En algunos trabajos se ha descrito que el MNU podría tener efectos estrogénicos (Kodama M. y col., 1991). Es un poco difícil explicar que un agente que es metabolizado en 15 minutos tenga efectos estrogénicos u hormonales prolongados que se traduzcan en cambios morfológicos. Quizás, parte de la acción del MNU sea formar aductos con proteínas receptoras hormonales o involucradas en la vía de la acción de la hormona. Las lesiones típicas de MPA se caracterizan por hiperplasias de tipo ductal con ensanchamientos irregulares de los conductos con a su vez el desarrollo lobulillar característico de la acción hormonal del MPA. Los animales tratados con MNU además de MPA experimentan estos mismos cambios morfológicos con la diferencia que en algunos casos se observan hiperplasias de tipo lobulillar atípicas. Caracteriza también a este grupo la observación de escamas o perlas córneas en lobulillos donde todavía no hay desarrollo de adenocarcinomas invasores, con lo cual se verifica que esta característica del MNU es previa al desarrollo de la lesión neoplásica completa.

El hallazgo de metaplasia pavimentosa en un adenocarcinoma no es un fenómeno raro en tumores humanos y ha sido descrito para la mama y otras lesiones (Robbins S.T, 1989; Harb J.M. y col., 1995, Albores-Saavedra J. y Young R., 1989). En el caso de los tumores inducidos por MNU en nuestro modelo, resulta curiosa la extensión en algunos de estos tumores de los fenómenos metaplásicos y el hecho que en ciertas lesiones se observe queratinización del tipo llamado tricolemal, que es el tipo de queratinización característica del pelo. A diferencia de la que existe en los epitelios pavimentosos de revestimiento, no se observa en ella la presencia de una capa de células granulosas, con gránulos de queratohialina. La queratinización es directa, sin ninguna transición visible (Alan S. y Lowe J., 1992). Otro

aspecto llamativo de algunos de estos adenocarcinomas mamarios fue la presencia de extensas masas cornificadas en las que se podía identificar la imagen “negativa” de los núcleos, un cuadro que recuerda al del pilomatrixoma o tumor de Malherbe, un tumor de piel humano que se considera que se diferencia en sentido piloso (Kaddu S. y col., 1994).

Otro cuadro interesante en la interpretación del probable origen de estos tumores es el que se muestra en las figuras 33 y 34, que se describieron en la página 74, en el cual la lesión remeda la formación de largas estructuras ductales que terminan en una dilatación o botón terminal. La generación de este tipo de estructuras es característica de las etapas finales de la embriogénesis de la glándula mamaria.

Durante la carcinogénesis tiene lugar un proceso de derepresión genómica que continúa a lo largo de la progresión de la neoplasia. Esta derepresión puede objetivizarse por cambios fenotípicos y funcionales que frecuentemente hacen que las características de la célula neoplásica se vaya apartando de las de la célula original, para expresar patrones morfológicos y funcionales que representan más genéricamente a la estirpe; un proceso normal que podría ejemplificar este proceso sería la transdiferenciación que ocurre durante el fenómeno conocido con el nombre de metaplasia. Este fenómeno consiste en la transformación de un tejido adulto y diferenciado en otro tejido adulto y diferenciado. Es éste un proceso adaptativo muy frecuente en diferentes tejidos, y especialmente en epitelios glandulares como el endocervix (epitelio cilíndrico mucíparo) y el epitelio bronquial (epitelio cilíndrico ciliado pseudoestratificado con células caliciformes), en los cuales el epitelio glandular primitivo es reemplazado por epitelio pavimentoso. Este proceso se dispara como respuesta a alteraciones del medio, el ectropion en el caso del endócervix y en el caso de los pulmones la agresión constante del tabaquismo (Robbins S.T., 1989). En otros casos como el la metaplasia apocrina que se observa en las displasias mamarias (Page D. y Anderson T., 1987), resulta menos clara la causa de la metaplasia, y probablemente forme parte de alteraciones de la diferenciación que pueden ocurrir en el seno de patologías que cursan con proliferación celular. Para tomar como ejemplo la metaplasia pavimentosa del epitelio endocervical o bronquial, el proceso implica un cambio en el programa de diferenciación de un grupo de células basales, que constituyen las células primitivas del epitelio, cuya dirección normal de diferenciación es hacia epitelio glandular. Este proceso transcurre a través de etapas morfológicamente reconocibles, la primera de las cuales es la llamada hiperplasia de células

basales, que constituyen las células primitivas del epitelio, cuya dirección normal de diferenciación es hacia epitelio glandular. Es decir, existe en estos epitelios glandulares una población de células primitivas que retiene por lo menos una bipotencialidad de diferenciación, potencialidad ésta que nunca se verifica, a menos que exista un cambio en el medio. Sin embargo, nunca se observa a partir de estas células primitivas basales, la diferenciación hacia estirpes celulares epiteliales más alejadas morfológica, funcional o embriológicamente, por ejemplo hepatocitos, o pelos, o células adrenales.

Podría teorizarse entonces, teniendo como ejemplo el proceso de metaplasia, que las alteraciones de los programas de diferenciación típicos de la estirpe que aparecen en las neoplasias malignas, dependerán del estadio de compromiso "commitment" en el que se encuentre la célula blanco del agente carcinogénico y eventualmente de su interacción con elementos "diferenciadores" del medio, como por ejemplo hormonas y factores de crecimiento, electrolitos como el calcio, vitaminas y sus análogos, como los retinoides, etc. De esa manera, por ejemplo es probable que una célula madre comprometida para generar epitelios de origen ductal diferencie primero estructuras características de su programa de diferenciación más avanzado, y así un carcinoma ductal se caracterice por la aparición de conductos o papilas y una célula madre lobulillar acinos o estructuras pseudolobulillares. A medida que el proceso progresa, y la población neoplásica se amplifica, es posible esperar una mayor divergencia morfológica y funcional, producto de las numerosas alteraciones del genotipo que suelen acompañar a la progresión de las neoplasias malignas.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto nosotros creemos que podrían existir por lo menos dos posibilidades en lo que respecta al origen celular de los carcinomas de mama inducidos por MNU. En la glándula mamaria coexisten estirpes celulares epiteliales de función muy distinta, como las células que tapizan los conductos, las células mioepiteliales y las células lobulillares o acinares, cada una de ellas dependiente de un programa de diferenciación específico y probablemente de un comportamiento específico de células madre. La interpretación más evidente es que la célula blanco afectada sea una célula muy primitiva de la glándula que aún retiene aunque sea parcialmente información para diferenciarse en sentido epidérmico, incluyendo estructuras relacionadas con la epidermis, como son los pelos. Por alguna razón ciclos celulares más cortos con menos posibilidad de reparar daños en el DNA, inmadurez del aparato metabólico de reparación u otros, esta célula se encuentra afectada preferentemente. Otra posibilidad sería que el carcinógeno mismo, a través de la

inducción de mutaciones puntuales específicas (Sukumar S., 1990 Guzman R. y col., 1992) influya en la derepresión de programas de diferenciación anómalos. Sin duda, con la capacidad de diferenciar estructuras epidérmicas coexiste la diferenciación en sentido "normal", no sólo se observan en ciertos tumores, estructuras similares a las de la glándula embrionaria, lo cual también estaría indicando la etapa primitiva en la que se encontraría la célula blanco, sino también estructuras acinares o lobulillares similares a las de una mama desarrollada. Cualquiera sea la explicación, un hecho curioso es que este efecto es dosis dependiente, es decir la proporción de tumores con el fenotipo metaplásico es mayor cuanto mayor es el número de dosis de MNU. Quizás la existencia de mutaciones sucesivas de localización similar, en una misma población celular contribuya a reforzar los cambios genotípicos característicos.

Una posible objeción a esta interpretación sería que, teniendo en cuenta que hemos encontrado metaplasia pavimentosa aún en lesiones in situ, es decir no invasoras, este fenómeno podría en realidad constituir también una respuesta adaptativa, como en el caso del epitelio bronquial, a un supuesto estímulo irritativo del carcinógeno o del promotor. Sin embargo, el carcinógeno MNU, muy inestable en soluciones salinas, se metaboliza rápidamente y desaparece de la circulación en cuestión de minutos (Swan P.F., 1968) y la metaplasia como cambio adaptativo requiere de un estímulo persistente (Robbins S.T, 1989). No creemos que el MPA juegue un rol sustancial en este proceso ya que no hemos encontrado fenómenos de metaplasia pavimentosa en animales tratados exclusivamente con MPA, y por otro lado, estos tumores son también característicos de modelos con MNU en los cuales el estímulo promotor está dado por hormonas hipofisiarias (Nandi S. y col., 1995). Sin embargo nuestros resultados indican, que, de alguna manera la relación temporal entre las aplicaciones de MPA y MNU parece contribuir a la modulación de la expresión del fenotipo metaplásico, ya que la proporción de neoplasias de este fenotipo es mayor en los grupos en los que la hormona se inyectó 2 meses antes del MNU, comparado con los grupos en los que la hormona se inyectó 1 semana antes. Se podría teorizar que la hormona induce una amplificación inespecífica del pool de células madre que no va seguida de diferenciación inmediata, como podría esperarse por su acción progestacional. Si así fuera, se deplecionaría del tipo más primitivo de célula blanco al compartimiento sensible a la acción del carcinógeno, y así, cuando la hormona actúa sobre la glándula durante un cierto tiempo aparecerían lesiones sin el fenotipo metaplásico y la inversa ocurriría cuando media muy poco tiempo entre la inyección de la hormona y del carcinógeno.

En modelos de carcinogénesis puramente hormonal que nuestro grupo ha estudiado previamente, han surgido también carcinomas que hemos caracterizado como de tipo lobulillar (Kordon E. y col., 1993). Sin embargo estos carcinomas lobulillares constituyen lesiones de morfología más homogénea que los tumores de MNU no encontrando metaplasia pavimentosa ni estadios embrionarios. De todos modos todos los carcinomas lobulillares comparten algunas características biológicas, como por ejemplo la ausencia de cantidades significativas de RP y RE y la consiguiente falta de hormono-dependencia, a diferencia de los carcinomas ductales.

Recientemente se ha descrito la presencia de MMTV infectivo que no es característico de la cepa BALB/c (Goldman A. y col., 1994). El hecho de que el grupo de Nandi haya obtenido resultados muy similares a los nuestros también en BALB/c, sugiere que estos virus no estarían comprometidos. De todos modos nosotros hemos postulado en trabajos previos que la progesterona induce después de una larga latencia tumores lobulillares semejantes a los que se obtienen con baja incidencia en multíparas, sugiriendo que la progesterona de la preñez podría ser responsable de la aparición de estos tumores (Kordon E. y col., 1993). El rol de los MMTV en la carcinogénesis por progestágeno merece ser más investigado.

Un hallazgo colateral interesante en este modelo es que la combinación MNU + MPA se comporta como carcinógeno uterino, induciendo lesiones preneoplásicas y carcinomas de endometrio. Teniendo en cuenta la escasez de modelos experimentales de carcinoma de endometrio (Niwa K. y col., 1991; Newbold R. y col., 1992; McLachlan J. y col., 1992) este hallazgo es muy interesante y merece ser estudiado. Los autores que han trabajado en glándula mamaria y MNU tampoco mencionan los efectos de este agente en el útero. Nosotros habíamos ya demostrado que MPA por sí mismo era capaz de inducir diferenciación decidual (Molinolo A.A., 1987). Estas células proliferan para constituir primero lesiones hiperplásicas, en general perivasculares, y luego un tumor que suele experimentar diferenciación vascular, y eventual necrosis. Las células que constituyen estos tumores tienen un típico aspecto decidual, con citoplasma amplio y eosinófilo y núcleo ovoide, en general con un nucléolo. En los tumores más grandes muchas de estas células adquieren un aspecto francamente atípico; los núcleos son voluminosos y oscuros, muestran escotaduras y desaparece el nucléolo. Sin embargo, a pesar de la morfología, estos deciduomas son de comportamiento biológico benigno; nunca invaden tejidos adyacentes ni dan metástasis y su crecimiento es aparentemente autolimitado. Sin embargo nunca hemos

visto que MPA produzca lesiones epiteliales, de hecho no las produjo en este experimento, y tampoco la administración de MNU sólo, indujo lesiones uterinas significativas. Lo primero que esto sugiere es que ambas sustancias son cocarcinógenos, y partiendo de los efectos conocidos de ambas drogas, parecería plausible que MNU fuera iniciador y MPA promotor. Sin embargo es probable que los efectos sean algo más complejo que estos, ya que, por ejemplo, observamos un alto porcentaje de tumores en el grupo en el cual el MPA fue eliminado y el MNU inyectado una vez que los animales comenzaron a ciclar, lo cual indica que cualquiera sea la acción de MPA no es necesaria su presencia constante; este patrón de comportamiento no se ajusta exactamente a lo que uno espera de un promotor. El ovario, al igual que en la carcinogénesis mamaria juega un rol preponderante, y no se observaron carcinomas endometriales en los animales ovx; el estímulo hormonal suplido por MPA no fue en este caso capaz de suplantar la acción ovárica. Como ya se mencionó anteriormente se le han atribuido a MNU efectos estrogénicos en el útero, sin embargo estudios preliminares no han mostrado cambios en los ciclos estrales en ratones tratados con MNU. Curiosamente en los grupos experimentales donde el tratamiento de MPA fue constante y 1 semana anterior al MNU se observó casi ausencia de hiperplasias epiteliales uterinas a diferencia de aquellos grupos donde el tratamiento con MPA empezó 2 meses antes. En estos mismos grupos también habíamos notado una diferencia de patrón morfológico en la glándula mamaria según el MPA se había inoculado una semana o 2 meses antes del MNU.

Otro hallazgo que merece ser mencionado es el hecho que el porcentaje de leucemias es mucho menor en los animales tratados con MPA (antes que MNU) y MNU que en los tratados con MNU solo. Resultados similares fueron obtenidos por el grupo de Nandi, ellos demuestran un menor número de leucemias en los ratones que llevan transplantes de hipófisis en la cápsula renal (Guzman R. y col., 1992).

Con respecto a otros tumores obtenidos no hubo ningún resultado muy llamativo. Todos los ratones tratados con MNU presentaron adenomas pulmonares independientemente de los tratamientos hormonales, siendo ésta una característica del MNU (Lijinski W. Reuben M., 1988). Los otros tumores ocasionalmente encontrados no mostraron peculiaridades distintivas.

Por último, teniendo en cuenta que hay trabajos que le atribuyen al MPA un efecto inmunosupresor (Turcotte J. y col, 1968) y siendo los tumores inducidos por MNU y MNU + MPA

medianamente inmunogénicos, resultaba imprescindible descartar la posibilidad que los animales tratados con MNU y MPA tuvieran una mayor incidencia, no por el efecto promotor del MPA sino porque tumores con mayor grado de inmunogenicidad tendrían hipotéticamente mayor probabilidad de surgir en estos animales que en otros con un sistema inmunológico normal capaz de eliminar estas posibles células neoplásicas. Estas premisas son puramente hipotéticas ya que no está demostrado que haya mayor incidencia de tumores de mama en animales inmunosuprimidos y además se ha demostrado la capacidad transformante de estos agentes *in vitro*; sin embargo el rol del sistema inmune en el desarrollo de los tumores ha sido un tema de gran controversia (Welsch C.W., 1985).

Se evaluó la respuesta inmune humoral y celular inoculando como antígenos glóbulos rojos de carnero. Si bien por datos bibliográficos (Nagarkatti M. y col., 1989) esperábamos encontrar que los ratones tratados con MNU estaban inmunosuprimidos, no esperábamos encontrar una inmunestimulación tan marcada de la respuesta humoral por MPA, incluso capaz de revertir los efectos inhibitorios del MNU. Estos resultados remedan los obtenidos con la comparación de pesos de los animales donde se observó que el MPA también era capaz de revertir el descenso de peso inducido por MNU. Se ha visto que cuando se tratan pacientes oncológicos con drogas citotóxicas, el MPA ejercería un efecto mieloprotector lo cual se traduce en un mejor estado general de los pacientes (Amadori D. y col., 1992). Se desconoce el mecanismo por el cual el MPA ejerce este efecto, pero una hipótesis es que induce un arresto de las células hematopoyéticas de modo que no son tan sensibles a la acción de los agentes citotóxicos (Wander H. y col., 1983).

Este efecto tan marcado del MPA nos llevó a pensar que se podía tratar de un efecto adyuvante del excipiente, pero la administración de MPA en forma de pellets de silastic induce también una inmunestimulación semejante. También demostramos que un antiprogéstágeno (onaP) es capaz de revertir el efecto inmuoestimulador del MPA ratificando así el efecto hormonal del MPA involucrado en este fenómeno. Curiosamente en la respuesta primaria el onaP indujo por sí mismo una inmunodepresión que ya no fue evidente al medir la respuesta secundaria. La administración de onaP junto con MPA revirtió el efecto de MPA. La onaP es un antiprogéstágeno el cual se postula que inhibe la unión del complejo hormona-receptor al DNA (Horwitz K., 1993). No hemos encontrado datos bibliográficos acerca de que la onaP fuera un agente inmunosupresor. Los resultados obtenidos en la

evaluación de la respuesta celular indicaron no haber diferencias entre los grupos que merecieran mayor atención. Estos resultados, por un lado confirman el efecto promotor del MPA y por otro lado abren una nueva línea de trabajo que sería investigar cuáles son los mecanismos involucrados en la inmunoestimulación por MPA.

En resumen, creemos que el modelo experimental de cocarcinogénesis de MPA y MNU que hemos desarrollado, resulta una herramienta de valor para el estudio de la modulación hormonal en el proceso carcinogénico.

CONCLUSIONES

- MNU y MPA se comportan como cocarcinógenos en la glándula mamaria de ratones hembra BALB/c y completan las dos etapas clásicas de la carcinogénesis:
 - * **Iniciación:** El *carcinógeno químico MNU* en una dosis única i.p de 50 mg/kg se comporta exclusivamente como **iniciador**.
 - * **Promoción:** El *progestágeno MPA* administrado en forma continua a la semana del MNU actúa como **promotor** tumoral.
- El MPA podría actuar como agente permisivo, favoreciendo el proceso de iniciación.
- Las glándulas salivares modulan la acción carcinogénica de MNU y/o MPA. Esto sugiere un probable efecto promotor del EGF o de otro agente derivado de estas glándulas.
- Es indispensable la presencia de ovarios funcionantes para que el MNU pueda iniciar la glándula mamaria. Sin embargo, el MPA puede reemplazar el efecto de los ovarios.
- Los tumores inducidos por MNU y/o MPA son morfológica y biológicamente diferentes a los inducidos exclusivamente por MPA en el modelo previamente descrito en nuestro laboratorio: son adenocarcinomas lobulillares de comportamiento autónomo (hormono-independientes) con grados variables de metaplasia

pavimentosa y corta latencia, que no expresan RE o RP, mientras que los inducidos por MPA son carcinomas ductales, de larga latencia, hormono-dependientes que expresan niveles altos de RP y RE.

Nuestros resultados indican que en este modelo, las modificaciones cuali y cuantitativas de la relación iniciador/promotor (número de dosis, duración del efecto hormonal), tienen una profunda influencia en la morfología de las lesiones originadas.

- Hemos caracterizado parcialmente lesiones endometriales premalignas y malignas que aparecen en animales tratados con MPA + MNU lo que sugieren que estos compuestos son también cocarcinógenos uterinos.
- El MPA inhibe ~~con~~ el efecto leucemogénico del MNU.
- MPA ejerce un efecto inmunoestimulador.

Los resultados aquí presentados indican que el MPA ejercería un rol promotor en órganos regulados hormonalmente siendo diferente su papel en la mama que en el útero. Hemos diseñado un modelo experimental en el cual se pueden disecar con certeza los dos pasos clásicos de la carcinogénesis mamaria.

REFERENCIAS

Abes S., Sasaki M. (1977). Chromosome aberrations and sister chromatide exchanges in chinese hamster cells exposed to various chemicals. J. Natl. Cancer Inst. 58:1635-1641.

Adamson R., Kolikowsky F., Correa P., Sieber S., Dalgard D. (1977). Carcinogenicity of 1-methyl-1-nitrosourea in nonhuman primates. J. Natl. Cancer Inst. 59:415-422.

Adlercreutz H., Gorbach S., Goldin B., Woods M., Dwyer J. (1994). Estrogen metabolism and excretion in oriental and caucasian women. J. Natl. Cancer Inst. 86:1076-1082.

Alan S. Lowe J. Histology. Gower Medical Publishing, 1992.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. (1994). En: Molecular Biology of The Cell, tercera edición, Garland Publishing, Inc, New York.

Albores-Saavedra J., Young R. (1995). Transitional cell neoplasms (carcinomas and inverted papillomas) of the uterine cervix. A report of five cases. A. J. Surg. Pathol. 19:1138-1145.

Alexander R., Buxbaum J., Raicht R. (1992). Oncogene alterations in rat colon tumors induced by N-methyl-N-nitrosourea. Am. J. Med. Sci. 3(1):16-24.

Amadori D., Frassinetti G., Flamini E., Falcini F., Maltoni M., Nanni O., Riccobon A., Piccinini C. (1992). Clinical and laboratory evaluation of the myeloprotective effect of medroxyprogesterone acetate in head and neck cancer. Eur. J. Cancer 28A:1331-1334.

Anderson C., Hussain R., Han M., Beattie C. (1991). Estrous cycle dependence of nitrosomethylurea (NMU)-induced preneoplastic lesions in rat mammary gland. Cancer Letters 56:77-84.

Archer M. (1987). Chemical carcinogenesis. En: The basic science of oncology, Cap.6: N-nitroso-N-methylurea, Pergamon Press, pp. 89.

Arrick B., Korc M., Derynck R. (1990). Differential regulation of expression of three transforming

- growth factor beta species in human breast cancer cells lines by estradiol. *Cancer Res.* 50:299-303.
- Bacus S., Huberman E., Chin D., Kiguchi K., Simpsom S., Lippman M., Lupu R. (1992). A ligand for the erbB-2 oncogene product (gp30) induces differentiation of human breast cancer cells. *Cell Growth Differ.* 3(7):401-411.
- Beatson G.T. (1896). On the treatment of inoperable cases of carcinomas of the mamma: Suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. *Lancet* 2:104.
- Berenblum I., Shubik P. (1947). A new quantitative approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse's skin. *Br. R. Cancer* 1:383-391.
- Bischoff F., Bryson G. (1977). Medroxyprogesterone administration in female MARSH mice (Abstract No 9). *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 18:3-9.
- Bishop D.T. (1994). BCRA1, BCRA2, BCRA3... A myriad of breast cancer genes. *Eur. J. Cancer* 30(a):1738-1739.
- Bishop J. (1987). The molecular genetics of cancer. *Science* 235:305-311.
- Biskin M., Biskin G.R. (1944). The development of tumors in rat's ovaries after transplantation into the spleen. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 55:176-178.
- Boffa L., Mariani M., Carpaneto E. (1992). Effects of N-methyl-N-nitrosourea on transcriptionally active and inactive nucleosomas: Macromolecular damage and DNA repair. *Mol. Carcinogenesis* 5:174-177.
- Borek C. (1979). Malignant transformation in vitro: Criteria, biological markers, and application in environmental screening of carcinogens. *Radiat. Res.* 79:209-232.
- Boutwell R. (1964). Some biological aspects of skin carcinogenesis. *Progr. Exp. Tumor Res.* 4:207.

Citado por: Pitot H.C. En: Fundamentals of Oncology, Marcel Dekker Inc., New York.

Bradlow H., Fischman J., Telang N., Osborne M. (1994). Estrogen metabolism and excretion in oriental and caucasian women. J. Natl. Cancer Inst. 86:1643-1645.

Breznick T., Cohen J. (1982). Altered methylation of endogenous viral promoter sequences during mammary carcinogenesis. Nature 295:255.

Brown M. (1994). Estrogen receptor molecular biology. Breast Cancer Res. Treat. 8:101-112.

Buell P. (1973). Changing incidence of breast cancer in japanese-american women. J. Natl. Cancer Inst. 51:1479-1483.

Bullock L., Barthe P., Mowszowicz I., Orth D., Bardin C. (1975). The effect of progestins on submaxillary gland epidermal growth factor: Demostration of androgenic, synandrogenic and antiandrogenic actions. Endocrinology 97:189-195.

Calandra R., Charreau E., Royer de Giaroli M., Baldi A., Calvo J., Pujato D., Arrighi L. (1980). Receptores para esteroides y prolactina en carcinomas mamarios humanos. Medicina 40:718-725.

Callahan R., Gallahan D., Smith G., Cropp C., Merlo G., Diella F., Liscia D., Lidereau R. (1993). Frequent mutations in breast cancer. En: Breast cancer: From biology to therapy (Squartini F., Bevilacqua G., Conte P., Surbone A., eds), Annals of the New York Academy of Sciences , Vol. 698, pp. 21-30.

Carpenter G., Cohen S. (1979). Epidermal growth factor. Annu. Rev. Biochem. 48:193-216.

Coffin J.M. (1991). Retroviridae and their replication. En: Fundamental Virology, segunda edición (Fields B.N., Knipe D.N., eds), Raven Press, New York, pp. 645-697.

Colomer R., Lupu R., Baccus S.S., Gelmann E. (1994). erbB-2 antisense oligonucleotides inhibit the

proliferation of the breast carcinomas cells with erbB-2 oncogene amplification. Br. J. Cancer 70(5):819-825.

Concannon P., Altszuler N., Hampshire, J., Butler W., Hansel W. (1980). Growth hormone, prolactin, and cortisol in dogs developing mammary nodules and an acromegaly-like appearance during treatment with medroxyprogesterone acetate. Endocrinology 106:1173-1177.

Cooper G.M. (1990). En: Oncogenes, Parte cuatro: Oncogene and proto-oncogen functions ,primera edición (Cooper G.M., ed.), Jones and Bartlett Publishers, Boston, pp. 163-277.

Cortes Funes H., Madrigal P., Perez Mangas G., Gardner W.U. (1983). Hormonal imbalances in tumorigenesis. Cancer Research 8:397-399.

Craddock U., Frei J. (1974). Induction of liver cell adenomata in the rat by a single treatment with NMU given various times after partial hepatectomy. Brit. J. Cancer 30:503-511.

Danguy A., Legros N., Devleeschouwer N., Heuson-stennon J., Heuson J. (1980). Effects of medroxyprogesterone acetate (MPA) on growth of DMBA-induced rat mammary tumours: Histo-pathological and endocrine studies. En: Role of medroxyprogesterone in endocrine related tumors (Jacobelli S., Di Marco A., eds.), Raven Press, New York, pp 21-28.

Daniel C.W., DeOme K.B. (1965). Growth of mouse mammary glands in vivo after monolayer culture. Science 149:634-636.

Daniel C.W., Silberstein G.B. (1987). Postnatal development of the rodent mammary gland. En: The mammary gland, Parte I: Developmental biology of the mammary gland (Neville M.C., Daniel C.W., eds.), Plenum Press, New York, pp. 3-36.

Davies B., Dulbecco R., Eisen H., Ginsberg H.S. (1984). Virus Oncogénicos. En: Tratado de Microbiología, capítulo 66 (SALVAT, eds), Barcelona, pp. 998-1023.

Davio C., Boccio J., Martín G., Rivera E., Castellani E., Bergoc R. (1991). Dependencia a prolactina de una adenocarcinoma mamario experimental. *Medicina* 51:434.

Denlinger R., Koestner A., Wechsler W. (1974). Induction of neurogenic tumors in C3HeB/FeJ mice by nitrosourea-derivates: Observation by electron microscopy, tissue culture and electron microscopy. *J. N. Cancer* 13:559-571.

DeOme K.B., Faulkin L.J., Bem H.A. (1959). Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer Res.* 19:515-520.

Dexter D., Kowalski H., Blazer B., Fligiel Z., Vogel R., Heppner G. (1978). Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 38:3174-3181.

DiAgustine R., Snedeker S., Jahnke G. (1992). Functional aspects of EGF-like peptides in ovarian-steroid responsive organs. En: *Hormonal Carcinogenesis*, Cap. 17 (Li J., Nandi S., Li S., eds.), Springer-Verlag, New York, pp. 172-181.

Dickson R., Lippman M.E. (1987). Estrogenic regulation of growth and polypeptide growth factor secretion in human breast carcinoma. *Endocrine Rev.* 8:29-41.

Dunn K. (1977). Breast cancer among american japanese in the San Francisco Bay area. *Natl. Cancer Inst. Monograph.* 47:157.

Egawa K., Yoshiwara M., Nose K. (1994). Effect of radical scavenger on TNF alpha-mediated activation of the uPA in culture cells. *Experientia* 50:958-962.

El Etreyby M., Graf K., Gunzel P., Neumann F. (1979). Evaluation of effects of sexual steroids on the Hypotalamic-pituitary systems of animals and man. En: *Mechanism of toxic action on some target organs.* *Arch. Toxicol. Suppl.* 2:11-39.

- Elledge R., Fuqua S., Clark G., Pujol P., Allred D. (1993). The role and prognostic significance of p53 gene alteration in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 27:95-102.
- Escot C., Theillet C., Lidereau R., Spyrtos F., Champeme M., Gest J., Callahan R. (1986). Genetic alteration of the c-myc protooncogene (MYC) in human primary breast carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:4834-4838.
- Fan T., Jaggard R., Bicknell R. (1995). Controlling the vasculature: Angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting of gene therapy. *TIPS* 16:57-66.
- Farber E. (1982). Chemical carcinogenesis. A biologic perspective. *Am. J. Pathol.* 106:269-296.
- Fenton S., Sheffield L. (1991). Lactogenic hormones increase epidermal growth factor messenger RNA content of mouse mammary gland. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 181:1063-1069.
- Fisher D., Lakshmanan J. (1990). Metabolism and effects of epidermal growth factor and related growth factor in mammals. *Endocrine Rev.* 11(3):418-442.
- Fishman J., Swaneck G. (1992) Hormonal Carcinogenesis, Cap. 9 (Li J., Nandi S., Li S., eds.), Springer-Verlag, New York, pp. 95-103.
- Freiss G., Prebois C., Vignon F. (1993). Control of breast cancer cell growth by steroids and growth factors: Interactions and mechanisms. *Breast. Cancer Res. Treat.* 27:57-68.
- Gambrell R.D. (1988). Hormonal medication and mitogenic dangers. En: *Endocrine Management of Cancer*, Vol. 2 (Stoll B.A., ed.), Karger, New York, pp.126-143.
- Gehring U. (1988). En: *Hormones and their actions, Parte I* (Cooke B.A., King R.J.B., van der Molen H.J., eds), Elsevier, Amsterdam, pp. 217-239.
- Goldman A., Buggiano V., Déroche A., Alves Rosa F., Vanzulli S., Nepomnaschy I., Piazzon I. (1994).

Transmisión de un superantígeno MMTV(C3H)-like por ratones BALB/c de nuestra colonia. *Medicina* 54:244.

Golovkina T., Chervonsky A., Dudley J., Ross S. (1992). Transgenic mouse mammary tumor virus superantigen expression prevents viral infection. *Cell* 69:637-45.

Graffi A., Hoffman T., Schutte N. (1967). N-methyl-N-nitrosourea as a strong topical carcinogen when painted on skin of rodents. *Nature* 214:611.

Gravano M., Kornblitt A., Guerra F., Pazos P., Lanari C., Luthy I., Charreau E., Elizalde P. (1993). Amplificación del oncogén erbB-2 en adenocarcinomas mamarios murinos por N-metil-N-nitrosourea y acetato de medroxiprogesterona. *Medicina* 53:138.

Grubbs C., Hill D., Mcdomuogh K., Peckham J. (1983). N-nitroso-N-methylurea-induced mammary carcinogenesis: Effect of pregnancy on preneoplastic cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 71:615-618.

Gullino P., Pettigrew H., Grantham F. (1975). N-nitrosourea as mammary gland carcinogen in rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 54:401-404.

Guzman R., Osborn R., Swanson S., Sakthivel R., Hwang S., Miyamoto S., Nandi S. (1992). Incidence of c-Ki-ras activation in N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinomas in pituitary-isografted mice. *Cancer Res.* 52:5732-5737.

Haenzel W., Kurihara M. (1968). Studies of japanese migrants I. Mortality from cancer and other diseases among japanese in the Unites States. *J. Natl. Cancer Inst.* 40:43-68.

Harb J., Komorowski R., Vitali C. (1995) Metaplastic breast carcinoma invading chest wall. *Ultrastruct. Pathol.* 19:439-443.

Harel J., Rassart E., Joliceur P. (1981). Cell cycle dependence of synthesis of unintegrated viral DNA in mouse cells newly infected with murine leukemia. *Virology* 110:202-207. Citado por Golovkina T.

y col., 1992.

Harris J., Lippman M., Veronesi U., Willett W. (1992b). Breast Cancer. Review Articles. Medical Progress. Thirth of three parts. New Engl. J. Med. 327:473-480.

Harris N., Weiss N., Francis A., Posissar L. (1982). Breast cancer in relation to patterns of oral contraceptives. Am. J. Epidem. 116:643-651.

Harris J., Lippman M., Veronesi U., Willett W. (1992a). Breast Cancer. Review Articles. Medical Progress. Second of three parts. New Engl. J. Med. 327:390-398.

Harris J., Lippman M., Veronesi U., Willett W. (1992). Breast Cancer. Review Articles. Medical Progress. First of three parts. New Engl. J. Med. 327:319-328.

Haslam S. (1988). Progesterone effects on deoxyribonucleic acid synthesis in normal mouse mammary glands. Endocrinology 122:464-470.

Haslam S. (1986). Mammary fibroblast influence on normal mouse mammary epithelial cell responses to estrogen in vitro. Cancer Res. 46:310-316.

Haslam S., Levely M. (1985). Estradiol responsiveness of normal mouse mammary cells in primary cell culture: Association of mammary fibroblasts with estradiol regulation of progesterone receptors. Endocrinology 116:1835-1841.

Hass H., Hilfrich J., Knoch N., Mohr U. (1975). Specific carcinogenic effect of NMU on the midventral sebaceous gland of the gerbil. J. Natl. Cancer Inst. 55:637-640.

Hass H., Mohr U., Kruger F. (1973). Comparative studies with different doses of N-nitrosomorpholine, N-nitrosopiperidine, N-nitrosomethylurea and dimethylnitrosamina in syrian golden hamster. J. Natl. Cancer Inst. 51:1295-1301.

Helmrich S., Shapiro S., Rosenberg L., Kaufman D., Slone D., Bain C., y col. (1983). Risk factors for breast cancer. Am. J. Epidemiol. 117:35-48.

Henderson B., Bernstein L. (1991). The international variation in breast cancer rates: An epidemiological assesment. Breast Cancer Res. Treat. 18:S11-S17.

Herrold K. (1970). Upper respiratory tract tumors induced in syrian hamsters by NMU. Int. J. Cancer 6:215-222.

Horwitz K. (1993). Mechanisms of hormone resistance in breast cancer. Breast Cancer Res. Treat. 26:119-130.

Hynes N., NicMhuiris M., Stiefel U., Tavema D., Ball R., Happ B., Schmitt-Ney M., Groner B. (1992). The v-raf and Ha-ras oncogenes inhibit transcription from beta-casein gene promoter by suppression of mammary gland specific transcription factor. En: Hormonal Carcinogenesis, Cap. 16 (Li J., Nandi S., Li S.,eds.), Springer-Verlag, New York, pp. 164-171.

IARC (1979). International Agency for Research on Cancer Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Sex hormones (II), vol. 21, pp. 327-362, 491-547.

IARC (1977). International Agency for Research on Cancer Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans. Some N-nitroso components, vol.17, pp. 227.

Imagawa W., Tomooka Y., Hamamoto S., Nandi S. (1985). Stimulation of mammary epithelial cell growth in vitro: Interaction of epidermal growth factor and mammogenic hormones. Endocrinology 116:1514-1524.

Inui T., Tsubura A., Morii S. (1989). Incidence of precancerous foci of mammary glands and growth rate of transplantable mammary cancers in sialoadenectomized mice. J. Natl. Cancer Inst. 81:1660-1663.

Ip C. (1996). Mammary tumorigenesis and chemoprevention studies in carcinogen-treated rats. J.

Mammary Gland Biol. Neopl. 1(1):37-47.

Janes P., Daly R., deFazio A., Sutherland R. (1994). Activation for the Ras signalling pathway in human breast cancer cells overexpressing erbB-2. *Oncogene* 9(12):3601-3608.

Jordan V.C. (1995). "Studies on the estrogen receptor in breast cancer" — 20 years as a the target for the treatment and prevention of cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 3:267-285.

Jordan V., Morrow M. (1993). Should clinicians be concerned about the carcinogenic potential of tamoxifen?. *Eur. J. Cancer* 30A:1714-1721.

Jordan V.C. (1994). Molecular mechanism of antiestrogen action in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 31:41-52.

Kaddu S., Soyer H., Cerroni L., Salmhofer W. Hodl S. (1994). Clinical and histopathologic spectrum of pilomatricomas in adults. *Int. J. Dermatol.* 33:705-708.

Kaplan E., Meier P. (1958). Non-parametric estimation for incomplete observation. *J. Am. Stat. Assoc.* 53:457-481.

Katzenellenbogen B., Bhardnaj B., Fang H., Ince B., Pakdel T., Reese J., Schodin D., Wrenn C. (1993). binding and activation by estrogen receptors: Analyses using mammalian and yeast system. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 47:39-48.

Kelly M., O'gara R., Yancey S., Batkin C. (1968). Carcinogenicity of nitrosomethylurea in newborn mice and rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 41:619-626.

Kiss R., Paridaens R., Heuson J., Danguy A.J. (1986). Effect of progesterone on cell proliferation in the MXT mouse hormone-sensitive mammary neoplasm. *J. Natl. Cancer Inst.* 77:172-178.

Knox D. (1976). Carcinogenic nitrosamidas and cell culture. *Nature* 259:671-673.

Kodama M., Kodama T., Kodama M. (1991). Is N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine a hormonal carcinogen? (Review). *Anticancer Res.* 11:941-946.

Kolbye A.C. (1976). Cancer in humans: Exposures and responses in a Real World. *Oncology* 33:90-112.

Kordon E., Guerra F., Molinolo A., Elizalde P., Charreau E., Pasqualini C., Montecchia M., Pazos P., Dran G., Lanari C. (1994). Effect of sialoadenectomy on medroxyprogesterone acetate (MPA)-induced mammary carcinogenesis in BALB/c mice. Correlation between histology and EGF receptor content. *Int. J. Cancer* 59:196-203.

Kordon E., Molinolo A., Pasqualini C., Charreau E., Pazos P., Dran G., Lanari C. (1993). Progesterone induction of mammary carcinomas in BALB/c female mice. Correlation between hormone dependence and morphology. *Breast Cancer Res. Treat.* 28:29-39.

Korenman S., Dukes B. (1970). Specific estrogen binding by the cytoplasm of human breast carcinoma. *J. Clin. Endocr. Metab.* 30:639-645.

Kratochwil K. (1969). Organ specificity in mesenchymal induction demonstrated in the embryonic development of the mammary gland of the mouse. *Dev. Biol.* 20:46-71.

Krieger D., Hauser H., Liotta A., Zelenetz A. (1976). Circadian periodicity of epidermal growth factor and its abolition by superior cervical ganglionectomy. *Endocrinology* 99:1589-1596.

Kurachi H., Oka T. (1985b). Changes in epidermal growth factor concentrations of submandibular gland, plasma and urine of normal sialoadenectomized female mice during various reproductive stages. *J. Endocrinol.* 106:197-202.

Kurachi H., Okamoto S., Oka T. (1985). Evidence for the involvement of the submandibular gland epidermal growth factor in mouse mammary tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:5940-5943.

LA Rocca R., Stein C., Myers CE. (1990). Suramin: Prototype of a new generation of antitumor compounds. *Cancer Cell* 2:106-115.

Lanari C., Kordon E., Molinolo A., Pasqualini C., Charreau E.H. (1989). Mammary adenocarcinomas induced by medroxyprogesterone acetate: Hormone dependence and EGF receptors of BALB/c in vivo sublines. *Int. J. Cancer* 43:845-850.

Lanari C., Kordon E., Molinolo A., Charreau E., Pasqualini C.D. (1987). Inducción de adenocarcinomas de mama por acetato de medroxiprogesterona en ratones hembras C3H. *Medicina* 47:652-653.

Lanari C., Molinolo A., Pasqualini C.D. (1986). Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALB/c female mice. *Cancer Letters* 33:215-223.

Le Marchand L. (1991). Ethnic variation in breast cancer survival: A review. *Breast Cancer Res. Treat.* 19:S23-S29.

Lee E., To H., Shew J., Bookstein R., Scully P., Lee W. (1988). Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. *Science* 241:218-221.

Lee NC. y col. (1987). A case-control study of breast cancer and hormonal contraception in Costa Rica. *J. Natl. Cancer Inst.* 79:1247-1254.

Lijinsky W., Reuber M. (1988). Neoplasms of the skin and other organs observed in SWISS mice treated with nitrosoalkylureas. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 114:245-249.

Lippman M., Bolan G., Huff K. (1976). The effects of estrogens and antiestrogens on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture. *Cancer Res.* 36:4595-4601.

Lippman M., Dickson R., Bates S., Knabbe C., Huff K., Swain S., Mcmanaway M., Bronzert D., Kasid A., Gelmann E.P. (1986). Autocrine and paracrine growth regulation of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 1:59-70.

Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randall R. (1951). Protein measurement with the folin fenol reagent. J. Biol. Chem. 193:262-275.

Lupu R., Lippman M. (1993). The role of erbB2 signal transduction pathways in human breast cancer. Breast Cancer Res. Treat. 27:83-93.

Lupu R., Colomer R., Kannan B., Lippman M. (1992). Characterization of a growth factor that binds exclusively to the erbB-2 receptor and induces cellular responses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(6):2287-2291.

Mangues R., Kahn J., Seidman I., Pellicer A. (1994). An overexpressed N-ras proto-oncogen cooperates with n-methylurea in mouse mammary carcinogenesis. Cancer Res. 54:6395-6401.

Marchetti A., Buttitta F., Miyazaki S., Gallahan D., Smith G., Gallahan R. (1995). Int-6, a highly conserved, widely expressed gene, is mutated by mouse mammary tumor virus in mammary preneoplasia. J. Virology 69:1239-1938.

Margni R.A. (1980). En: Inmunología e inmunoquímica. Fundamentos. Gumersindo F.Fernandez, editor.

Massagué J., Cheifetz S., Laiho M., Ralph D., Weis F., Zentella A. (1992). Transforming growth factor-beta. En: Tumor Suppressor Genes, The Cell Cycle and Cancer, Cancer Surveys, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, vol. 12, pp. 81-103.

Mathieu M., Rochefort H., Barenton B., Prebois C., Vignon F. (1990). Interactions of cathepsina D and IGF-II on the IGF-II/M-6-P receptor in human breast cancer cells and possible consequences on mitogenic activity of IGF-II. Mol. Endocrinol. 4:1324-1335.

McGrath C. (1983). Augmentation of the response of normal mammary epithelial cells to estradiol by mammary estromal. Cancer Res. 43:1355-1360.

McKinley A., Russell S., Spence R., Odling-Smee W., Nevin N. (1995). Hereditary breast cancer and

linkage analysis to BRCA1. Br. J. Surgery 82:1086-1088.

McLachlan J., Newbold R., Nelson K., Korach K. (1992). Control of uterine epithelial growth and differentiation: Implications for estrogen-associated neoplasia. En: Hormonal Carcinogenesis, Cap. 16 (Li J., Nandi S., Li S., eds.), Springer-Verlag, New York, pp. 51-57.

Medina D. (1981). Hormones and mouse mammary tumorigenesis. Cancer Res. 41:3819-3820.

Michalides R., van Ooyen A., Nusse R. (1983). Mouse mammary tumor virus expression and mammary tumor development. En: Mouse mammary tumor virus. Current topics in Microbiology and Immunology., vol.106 (Vogt PK., Koprowski H., eds.), Springer-Verlag, Berlin, pp.57-78.

Miller E.C., Miller J.A. (1966). Mechanisms of chemical carcinogenesis: Nature of proximate carcinogens and interaction of macro-molecules. Pharm. Rev. 18:805-11.

Miller W., O'Neil J.S. (1990). Significance of steroid metabolism in human cancer. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 37:317-25.

Mohr G., Hass H., Hilfrich J. (1974). The carcinogenic effects of dimethylnitrosourea and methylnitrosourea in european hamster. Brit. J. Cancer 29:359-364.

Molinolo A., Lanari C., Charreau E., Sanjuan N., Pasqualini C.D. (1987). Mouse mammary tumors induced by medroxyprogesterone acetate: Immunohistochemistry and hormonal receptors. J. Natl. Cancer Inst. 79:1341-1350.

Moulton B., Khan S. (1992). Progestin and estrogen control of cathepsina-D expression and processing in rat uterine luminal epithelium and stroma-myometrium. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 201(1):98-105.

Murad F., Guilman A. (1975). Estrogens and progestins. En: The pharmacological bases of therapeutics, quinta edición (Goodman L., Gilman A., eds.), Macmillan, New York, pp. 1439-1445.

Muss H. (1992). Endocrine therapy for advanced breast cancer: A review. *Breast Cancer Res. Treat.* 21:15-26.

Muwszowicz I., Bieber M., Chung K., Bullock L., Bardin W. (1974). Synandrogenic and antiandrogenic effect of progestins: Comparison with nonprogestational antiandrogens. *Endocrinology* 95:1589-99.

Nagarkatti M., Toney D., Nagarkatti P. (1989). Immunomodulation by various nitrosoureas and its effect on the survival of the murine host bearing a syngeneic tumor. *Cancer Res.* 49:6587-6592.

Nagasawa H., Aomi M., Sakagami N., Ishida M. (1988). Medroxyprogesterone acetate enhances spontaneous mammary tumorigenesis and uterine adenomyosis in mice. *Breast Cancer Res. Treat.* 12:59-66.

Nagasawa H., Fujii M., Hagiwara K. (1985). Inhibition by medroxyprogesterone acetate of precancerous mammary hyperplastic alveolar nodule formation in mice. *Breast Cancer Res. Treat.* 5:31-36.

Nagasawa H., Yanai R., Nakajima Y., Mori J. (1980). Effects of progesterone on normal and preneoplastic mammary development in mice in relation to prolactin and estrogen. *Eur. J. Cancer* 16:1069-1077.

Nandi S., Guzman R., Yang J. (1995). Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: A unifying hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:3650-3657.

Nebert DW. (1993). Elevated estrogen 16 α -hydroxylase activity: Is this a genotoxic or nongenotoxic biomarker in human breast cancer risk?. *Editorials of J. Natl. Cancer Inst.* 85:1888-1891.

Newbold R., Bullock B., McLachlan A. (1992). Hormone-dependent uterine adenocarcinoma following developmental treatment with diethylstilbestrol: A murine model for hormonal carcinogenesis. *En: Hormonal Carcinogenesis, Cap. 16* (Li J., Nandi S., Li S., eds.), Springer-Verlag, New York, pp. 309-312.

Niwa K., Tanaka T., Mori Y., Kato K., Mori H., Yokoyama Y., Tamaya Y. (1989). An experimental model for uterine neoplasms by intra-uterine injection of N-methyl-N-nitrosourea in rats. Proc. Jpn. Cancer Assoc. 48th Annu Meet., 56. Citado en Niwa y col. 1991.

Niwa K., Tanaka T., Mori H., Yokoyama Y., Furi T., Mori H., Tamaya Y. (1991). Rapid induction of endometrial carcinoma in ICR mice treated with N-methyl-N-nitrosourea and 17- estradiol. Jpn. J. Cancer Res. 82:1391-1396.

Ohba M., Shibamura M., Kuroki T., Nose K. (1994). Production of hydrogen peroxide by transforming growth factor beta1 and its involvement in induction of erg-1 in mouse osteoblastic cells. J. Cell Biol. 126:1079-1088.

Okamoto S., Oka T. (1984). Evidence for physiological function of epidermal growth factor: Pregestational ovariectomy of mice decreases milk production and increases offspring mortality during lactation period. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6059-6063.

Osborne C., Coronado E., Hilsenbeck S., McCue B., Wakeling A., McClelland R., Manning D., Nicholson R. (1995). Comparison of the effects of a pure steroidal antiestrogen with those of tamoxifen in a model of human breast cancer. J. Natl. Cancer Inst. 87:746-750.

Osborne C., Coronado E., Kitten L., Arteaga C., Fuqua S., Ramarshama K., Marshall M., Li C.H. (1989). Insulin-like growth factor-II (IGF-II): A potential autocrine/paracrine growth factor for human breast cancer acting via the IGF-I receptor. Mol. Endocrinol. 3:1701-1709.

Osborne M., Bradlow H., Wong Y., Telang N. (1993). Upregulation of estradiol C16-alpha-hydroxylation in human breast tissue: A potential biomarker of breast cancer risk. J. Natl. Cancer Inst. 85:1917-1920.

Osborne C.K., Arteaga C.L. (1990). Autocrine and paracrine growth regulation of breast cancer: Clinical implications. Breast Cancer Res. Treat. 15:3-11.

Page D., Anderson T. (1987). En: Diagnostic Histopathology of the breast. Primera edición. Churchill Livingstone Inc. New York. Páginas:240, 251, 252.

Pazos P., Lanari C., Meiss R., Charreau E., Pasqualini C. (1992). Mammary carcinogenesis induced by methylnitrosourea and medroxyprogesterone acetate in BALB/c mice. Breast Cancer Res. Treat. 20:133-138.

Perheentupa J., Lakshmanan J., Hoath S., Fisher D. (1984). Hormonal modulation of plasma concentration of epidermal growth factor. Acta Endocrinol. 107:571-576.

Peto R., Pike M., Armitage P., Breslow N., Cox D., Howar S. (1977). Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observations of each patient II. Analysis and examples. Br. J. Cancer 35:1-19.

Pike M., Henderson B., Krailo M., Duke A., Roy S. (1983). Breast cancer in young women and use of oral contraceptive: Possible modifying effect of formulation and age at use. Lancet ii:926-930.

Pitot H. (1981). La etiología del cáncer: Agentes químicos y físicos Cap.3. La etiología del cáncer: Agentes virales. Cap.4. En: Fundamentos de oncología, Editorial Reverté, Barcelona.

Pitot HC. (1978). En: Fundamentals of Oncology, Marcel Dekker Inc. Editor, New York.

Rabes H., Muller L., Hartman A., Kerler R., Schuster C. (1986). Cell cycle-dependent initiation of adenosine triphosphatase deficient populations in adult rat liver by a single dose of NMU. Cancer Res. 46:645-650.

Ratko T., Braum R., Pezzuto J., Blattie C. (1988). Estrous cycle modification of rat mammary gland DNA alkylation by NMU. Cancer Res. 48:3090-3093.

Rauth A.M. (1986). The induction and repair of UV light damage in mammalian cells. En: Radiation carcinogenesis and DNA alterations (Burns F.J., Upton A.C., Silini G., eds.), Plenum Press, New York,

pp.212-226.

Reddy J., Rao M. (1975). Pancreatic adenocarcinoma in inbred guinea pigs induced by NMU. *Cancer Res.* 35:2269-2277.

Reddy J., Svodova D., Rao M. (1974). Susceptibility of an inbred strain of guinea pigs to the induction of pancreatic adenocarcinoma by N-methyl-N-nitrosourea. *J. Natl. Cancer Inst.* 52:991-993.

Ritchie A.C. (1978). En: The clasification, morphology and behavior of tumors. Florey H. Editor, General pathology, Saunders, Philadelphia, 1962, pp.551; citado por Pitot H., Fundamentals of Oncology.

Robbins S.T. (1989). En: Pathologic Basis of Disease. Cuarta edicion (Cotran R., Kumar V., Robbins S.T., eds.), Saunders, Philadelphia.

Roe F., Carter R., Mitchley C., Peto R., Hecker E. (1972). On the persistence of tumour initiation and the acceleration of tumour progression in mouse skin tumorigenesis. *Int. J. Cancer* 9:264-269.

Rous P. (1911). Transmission of a malignant new growth by means of a cell-free filtrate. *JAMA* 56:198.

Ruggiero R., Bustuoabad O., Bonfil R., Meiss R., Pasqualini C. (1985). Concomitant immunity in murine tumours of non-detectable immunogenicity. *Br. J. Cancer* 51:37-48.

Russo I.H., Russo J. (1991). Progestagens and the mammary gland development: Differentiation versus carcinogenesis. *Acta Endocrin. (Suppl.1)* 125:7-12.

Russo I., Tewari M., Russo J. (1992). En: Integument and mammary gland (Jones T.C., Mohr U., Hunt R.D., eds.), Springer-Verlag, Berlin.

Russo I., Gimotty P., Dupuis M., Russo J. (1989). Effect of medroxyprogesterone acetate on the

response of the rat mammary gland carcinogenesis. *Brit. J. Cancer* 59:210-6.

Russo IH., Russo J. (1988). Hormone prevention of mammary carcinogenesis: A new approach in anticancer research. *Anticancer Res.* 8(6):1247-64.

Russo I., Pohorzynsky T., Russo J. (1986). Asynchronous development of the rat mammary glands: A determining factor in carcinogenesis. *Breast Cancer Res. Treat.* 8:108-12.

Russo J., Calaf G., Roi L., Russo I. (1987). Influence of age and gland topography on cell kinetics of normal human breast tissue. *J. Natl. Cancer Inst.* 78(3):413-418.

Russo IH., Russo J. (1982). Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis. *Breast Cancer Res. Treat.* 2:5-73.

Salaman M., Wedderburn N. (1966). The immunodepressive effect of friend virus. *Immunology* 10:445.

Sanders F., Burford B. (1967). Morphological conversion of cells in vitro by N-nitrosomethylurea. *Nature* 213:1171-1173.

Satriano J., Shuldiner M., Hora M., Xing Y., Shan Z., Schlondrff Matsubaram T., Ziff M. (1986). Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines D. Oxygen radicals as second messenger for expression. *J. Immun.* 137:3295-3298.

Schlom J., Michalides R., Kufe D., Hehlmann R., Spiegelman S., Bentvelzen P., Hageman P. (1973). A comparative study of biology and molecular basis of murine mammary carcinoma: A model for human breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 51:541-545.

Schott D., Shyamala G., Schneider W., Parry G. (1991). Molecular cloning, sequence analyses, and expression complementary DNA encoding murine progesterone receptor. *Biochemistry* 30:7014-7020.

Schreiber H., Schreiber K., Martin D. (1970). Experimental tumour induction in a circumscribed region

of the hamster trachea: Correlation of histology and exfoliative cytology. J. Natl. Cancer Inst. 54:187-197.

Schulz K., Schmidt-Rhode P., Sturm G. (1985). High dose medroxyprogesterone acetate in breast cancer-present state of knowledge. En: German-Italian Oncologic Symposium, Venice, 1984 (Robustelli della Cuna G., Nagel G., Lanius P., eds.), Kherer Verlag KG, Freiburg, pp. 21-40.

Schwalbe P.C. (1974). Experience with depo-provera as an injectable contraceptive. J. Reprod. Med. 13:113-118.

Selman P., Mol J., Rutterman G., Rijnberk A. (1991). Progestin and growth hormone excess in the dog. Acta Endocrinol. 125:S142-47.

Sheehan D., Frederick C., Branham W., Heatjth J.E. (1982). Evidence for estrogen promotion of neoplastic lesions in the rat vagina after initiation with N-methyl N-nitrosourea. Carcinogenesis 3:957-959.

Shope R.E. (1933). Infectious papillomatosis of rabbit. J. Exp. Med. 58:608.

Siedel H., Kreja L. (1984). Leukemia induction by methyl nitrosourea (MNU) in selected mouse strains. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 108:214-220.

Singer B. (1979). N-nitroso alkylating agents: Formation and persistence of alkyl derivatives in mammalian nucleic acids contributing factor carcinogenesis. J. Natl. Cancer Inst. 62:1329-1339.

Sobel N., Vuoto H., Matos E. (1984). Epidemiología del cáncer de mama en la Argentina - 770 casos estudiados en el Instituto Oncológico "Angel Roffo". Revista Argentina de Mastología. 3:9-23.

Steeg P., De la Rosa A., Flatow U., MacDonas N., Benedict M., Leone A. (1993). Nm23 and breast cancer metastasis. Breast Cancer Res. Treat. 25:175-187.

Suchy B., Sarafoff M., Kerler R., Rabes H. (1989). Amplification, rearrangements and enhanced expression of c-myc in chemically induced rat liver tumor in vivo and in vitro. *Cancer Res.* 49:6781-6787.

Sukumar S., Armstrong B., Bruyntjes J., Leav I., Bosland M. (1991). Frequent activation of Ki-ras oncogene at codon 12 in N-methyl-N-nitrosourea-induced rat prostate adenocarcinomas and neurogenic sarcomas. *Molecular Carcinogenesis* 4:362-368.

Sukumar S. (1990). An experimental analysis of cancer: role of ras oncogenes in multistep carcinogenesis. *Cancer Cell* 2:199-204.

Sukumar S., Carney W., Barbacid M. (1988). Independent molecular pathways in initiation and loss of hormone responsiveness of breast carcinomas. *Science* 240:524-526.

Sumida C., Lecerf F., Pasqualini J. (1988). Control of progesterone receptor in fetal uterine cells in culture: Effect of estradiol, progestins, antiestrogens and growth factors. *Endocrinology* 122:3-11.

Sun M. (1984). Panel says depot provera not proved safe. *Science* 226:950.

Sutherland D. (1987). Hormones and Cancer. En: *The Basic Science of Oncology* (Tannock L.F., Hill R.P., eds.), Pergamon Press, Toronto, pp.204-222.

Swaneck G.E., Fishman J. (1988). Covalent binding of the endogenous estrogen 16alpha-hydroxyestrone to estradiol receptor in human breast cancer cells: Characterization and intranuclear localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7831-7835.

Swann P. (1968). The rate of methyl methanesulphonate, dimethyl sulfate and N-methyl-N-nitrosourea in the rat. *Biochem. J.* 110:49-52.

Swenberg J., Koestner R., Wechsler W., Bunder M., Abes H. (1975). Differential oncogenic effects of nitrosomethylurea. *J. Natl. Cancer Inst.* 54:89-96.

T'Ang A., Vrley J., Chakraborty S., Murphree A., Fung Y. (1988). Structural rearrangement of the retinoblastoma gene in human breast carcinoma. *Science* 242:263-266.

Tatematsu M., Ogawa K., Hoshiya S., Kato T., Imaida K., Ito N. (1992). Induction of adenocarcinomas in the glandular stomach of BALB/c mice treated with N-methyl-N-nitrosourea. *Jpn. J. Cancer Res.* 83:915-918.

Tavasolli F., Casey H., Morris H.J. (1988). The morphologic effects of synthetic reproductive steroids on the mammary gland of rhesus monkeys. *Am. J. Pathol.* 131:213-219.

Telang N., Suto A., Wong G., Osborne M.P., Bradlow H.L. (1992). Induction by estrogen metabolite 16 α -hydroxyestrone of genotoxic damage and aberrant proliferation in mouse mammary epithelial cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 84:634-638.

Terracini B., Testa M. (1970). Carcinogenicity of a single administration of N-nitrosomethylurea: A comparison between newborn and 5 week-old mice and rats. *Brit. J. Cancer* 24:588-598.

Terracini B., Stromignoni A. (1967). Malignant lymphoma and renal changes in SWISS mice given NMU. *Eur. J. Cancer* 3:435-436.

Thomas D.B. (1991). Rapporteur's report - Epidemiology. *Breast Cancer Res. Treat.* 18:S31-S34.

Thordarson G., Jin E., Guzman R., Swanson S., Nandi S., Talamantes F. (1995). Refractoriness to mammary tumorigenesis in parous rats: Is it caused by persistent changes in the hormonal environment or permanent biochemical alterations in the mammary epithelia?. *Carcinogenesis* 16(11):2847-2853.

Tomatis L., Hilfrich J., Tumsov V. (1975). The occurrence of tumours in F1, F2 & F3 descendents of BD rats exposed to NMU during pregnancy. *Int. J. Cancer* 15:385-390.

Toniolo P., Pasternack B., Shore R., Sonneschein E., Koenig K., Rosenberg C., Strax P., Strax S. (1991). Endogenous hormones and breast cancer: A perspective cohort study. *Breast Cancer Res. Treat.*

18:S23-S26.

Topper Y., Freeman C. (1980). Multiple hormone interaction in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol. Rev.* 60:1049-1106.

Turcotte J., Havies R., Brody G., Meyer T., Schuartz S. (1968). Immunossupression with medroxiprogesterone acetate. *Transplantation* 6:248.

Ustarán J., Bianco M., Meiss R., Rascován S. (1988). Epidemioplogía descriptiva del cáncer de mama (1658 casos nuevos en la Argentina: 1938-1984). *Prensa Médica* 75:73.

van der Burg B. (1991). Sex steroids and growth factors in mammary cancer. *Acta Endocrin. (Suppl. 1)* 125:38-41.

Van Leeuwen. (1991). Epidemiologic aspects of exogenous progestagens in relation to their role in pathogenesis of human breast cancer. *Acta Endocrin. (Suppl. 1)* 125:13-26.

Varmus H. (1989). En: *Oncogenes and the Molecular Origins of the Cancer*, Cap. 1 (Weinberg R., ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 3-44.

Vetvicka V., Fusek M. (1994). Activation of peripheral blood neutrophiles and lymphocytes by human procathepsina D and insuline-like growth factor II. *Cell Immunol.* 156(2):332-341.

Vic P., Vignon F., Derocq D., Rochefort H. (1982). Effect of estradiol on the ultrastructure of the MCF-7 human breast cancer cells in culture. *Cancer Res.* 42:667-73.

Vignon F., Prebois C., Rochefort H. (1992). Inhibition of breast cancer growth by suramin. *J. Natl. Cancer Inst.* 84:38-423.

Vogelstein B., Fearson E., Hamilton S., Kern S., Presinger I. (1988). Genetic alterations during colorectal tumor development. *New Engl. J. Med.* 319:525-532.

Vorherr H., Messer R. (1978). Breast cancer: Potentially predisposing and protecting factors. Am. J. Obst. Gynecol. 130:335.

Waldmann V., Rabes H. (1992). Ras gene mutation-independent tumours in the intestine of the rat by a single dose of N-methyl-N-nitrosourea. Int. J. Exp. Pathol. 73:435-447.

Wander H., Bartsch H., Blossey H., Nagel G. (1983). High-dose medroxyprogesterone acetate in metastatic breast cancer: Preliminary report on three AIO phase II trials. En: Role of medroxyprogesterone in endocrine-related tumors, Vol.II (Campio L., Della Cuna R., Taylor R., eds.), Raven Press, New York.

Weinberg R.A. (1989). En: Oncogenes and the molecular origins of cancer, Cap. 12-13 (Weinberg R., ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 307-327.

Weinberg R. (1983). A Molecular Basis of Cancer. Scientific American 249(5):126-142.

Welsch C., (1985). Host factors affecting the growth of carcinogen-induced rat mammary carcinomas: a review and tribute to Charles B. Huggins. Cancer Res. 45:3415-3443.

Welsch C., Nagasawa H. (1977). Prolactin and murine mammary tumorigenesis: A review. Cancer Res. 37:951-963.

Welsch C., Clemens J., Meites J. (1968). Effects of multiple pituitary homografts or progesterone in 7,12 dimethylbenzanthracene induced mammary tumors in rats. J. Natl. Cancer Inst. 41:465-471.

WHO (1993). Depot-medroxyprogesterone acetate (DMPA) and cancer: Memorandum from a WHO meeting. Bulletin of the World Health Organization 71(6):669-676.

WHO (1984). Collaborative Study of Neoplasia on Steroid Contraceptives. Breast cancer, cervical cancer and depot-medroxyprogesterone acetate. Lancet 2:1207-1208.

Wolf D., Jordan V. (1993). Drug resistance to tamoxifen during breast cancer therapy. *Breast Cancer Res. Treat.* 27:27-40.

Yamamoto T., Terasda N., Nishizawa Y., Petrow V. (1994). Angiostatic activities of medroxyprogesterone acetate and its analogues. *Int. J. Cancer* 56(3):393-399.

Yang J., Guzman R., Richards R., Imagawa W., McCormack K., Nandi S. (1980). Growth factor and cyclic nucleotide-induced proliferation of normal and malignant epithelial cells in primary culture. *Endocrinology.* 107:35-41.

Yoshida M., Wada M., Satoh h., Yoshida T., Sakamoto H., Miyagawa K., Yokota J., Koda T., Kakinuma M., Sugimura T., Terada M. (1988). Human HST1 (HSTF1) gene maps to chromosome band 11q13 band coamplifies with the int2 gene in human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4861-4864.

You M., Candrian U., Maronpot R., Stoner G., Anderson M. (1989). Activation of the K-ras protooncogen in spontaneously occurring and chemically induced lung tumors of the strain A mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3070-3074.

Zarbl H., Sukumar S., Arthur A., Martin-zanca D., Barbacid M. (1985). Direct mutagenesis of H-ras1 oncogen by N-methyl-N-nitrosourea during initiation of mammary carcinogenesis in rat. *Nature* 315:382-385.