

CÁNCER DE MAMA MODELO EXPERIMENTAL EN RATAS INDUCIDO MEDIANTE ADMINISTRACIÓN DE 1-METHYL-1 NITROSOUREA

YASMÍN VELÁSQUEZ, JUAN F LIUZZI, AUGUSTO TEJADA, ALI GODOY, CARLOS QUINTERO

SERVICIOS HOSPITALARIOS ONCOLÓGICOS DEL IVSS. CARACAS, VENEZUELA

RESUMEN

OBJETIVO: La importancia del cáncer de mama aumentó en los últimos años, debido a que es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres. **MÉTODO:** Surge el interés, de reproducir modelos de inducción de cáncer, mediante carcinógenos químicos en nuestros animales experimentales para una vez evaluados estos modelos en nuestro país, aplicarlos en prevención y lucha contra el cáncer de mama. **RESULTADOS:** A los 120 días de edad de las ratas, posterior a la administración de 50 mg/kg de peso de 1-METHYL-1 NITROSOUREA, se examinó la piel a través de luz translúcida, observando en 51,2 % de las mamas del grupo experimental aumentó del tamaño. En 12,2 % de las mamas, del grupo experimental se observó microscópicamente, un foco de adenosis glandular con cambios oncocíticos y en 7,3 % dos focos. En los pulmones del grupo experimental (46,3 %), se evidenció un extenso infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario difuso. La media del tamaño, de las lesiones en la mama es de 0,10 cm con desviación estándar de 0,20 y una P de 0,492, el porcentaje de afectación por lesiones inflamatorias de los pulmones tuvo una media de 13,17 % con una desviación estándar de 27,70 y una P de 0,492. **CONCLUSIONES:** Estos modelos permiten estudiar el proceso de carcinogénesis de la glándula mamaria. Es posible que el de 1-METHYL-1 NITROSOUREA sea capaz de dar origen, adenosis microglandular, que posteriormente progresa a carcinoma de mama.

PALABRAS CLAVE: 1-Methyl-1 nitrosoarea, carcinogénesis, adenosis, micro-glandular, modelos, experimentales.

SUMMARY

OBJECTIVE: The importance of the breast cancer increased in our country in the recent years, because it is considered the second leading cause of cancer death in the women. **METHOD:** Because of this interest arises to reproduce the models of cancer induction by the chemical carcinogens in our experimental animals after evaluating these models in our country, we tried to apply them in preventing and fighting the breast cancer. **RESULTS:** At the last 120 days of the age, the rats after the administration of 50 mg / kg body weight of 1-METHYL-1 NITROSOUREA, the skin was examined by using light translucent, in 51.2 % observed in the experimental animal group breast enlargement. In 12.2 % of the breast, the experimental animal group was observed microscopically, a focus of adenosis glandular with oncocytic changes and in 7.3 % two foci. In the lungs of the experimental animal group (46.3 %) was evidenced extensive diffuse lymphoplasmacytic inflammatory and infiltrated. The mean size of the lesions in the breast is 0.10 cm with a standard deviation of 0.20, and a P of 0.492. **CONCLUSIONS:** We conclude in our work that the percentage of involvement by inflammatory lung lesions had a mean of 13.17 % with a standard deviation of 27.70 and a P of 0.492. It is possible that 1-METHYL-1 NITROSOUREA is able to give rise micro glandular adenosis, which subsequently progresses to breast carcinoma.

KEY WORDS: 1-Methyl-1 nitrosoarea, carcinogenesis, adenosis, micro glandular stenosis, experimental models.

Recibido: 12/12/2013 Revisado: 23/01/2014
Aceptado para publicación: 04/02/2014

Correspondencia: Dra. Yasmín Velásquez. Servicios Hospitalarios Oncológicos del IVSS. Calle Alejandro Calvo Laiter, El Cementerio, Caracas. Tel:+58426518855514. E-mail: yvj_ve@hotmail.com.

INTRODUCCIÓN

El cáncer actualmente es definido como una enfermedad genética, que condiciona la pérdida de la homeostasis celular; originando debido a causas externas entre ellas (tabaco, deficiencia de alimentos, sustancias químicas, radiaciones) o causas internas (mutaciones o problemas hormonales o inmunológicos)⁽¹⁾. El cáncer ocupa el segundo lugar entre las diversas causas de muerte en Venezuela, posición, que ha mantenido en los últimos 25 años, siendo solo superado por enfermedades del corazón y representando el 15 % de la mortalidad diagnosticada en el país⁽²⁾.

En muchos países, el cáncer de mama es un grave problema sanitario, cuya importancia se ha acrecentado en los últimos años, debido a que es el cáncer más frecuente en las mujeres en todo el mundo, y es la segunda causa de muerte por cáncer en ellas. Debido al aumento de la morbi-mortalidad por el cáncer, surge el interés de reproducir modelos de inducción de cáncer, mediante carcinógenos químicos en nuestros animales experimentales, para una vez evaluados estos modelos en nuestro país, puedan ser utilizados para aplicarlos en la prevención y lucha contra el cáncer de mama. El propósito general en esta investigación, es reproducir el modelo de inducción de cáncer de mama mediante el 1-METHYL-1 NITROSOUREA (MNU), para contribuir a la comprensión de la biología del cáncer. Desde las experiencias de William Harvey, que comparó el latido cardíaco en distintas especies, los datos obtenidos mediante experimentos en animales han sido objeto de permanente de interés⁽³⁻⁶⁾. Los modelos animales en cáncer han sido utilizados desde hace muchos años en distintas áreas de la investigación, constituyendo uno de los pasos fundamentales en la biomedicina. Se requieren tanto para proyectos de investigación como en pruebas diagnósticas y terapéuticas y en los controles de productos en la industria farmacológica⁽⁶⁾.

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) expresaba en su XI Reunión Interamericana de 1980:

“los países que han logrado un gran avance en el control de las enfermedades humanas y animales, son aquellos que han establecido entidades que se dedican al mejor desarrollo de la ciencia de los animales de laboratorio”⁽⁶⁾.

Este avance, sin embargo, debe ir asociado al cumplimiento de normas éticas. En esa línea, la ciencia de los animales de laboratorio, fue creada para ayudar a la comunidad científica a mejorar todos los aspectos concernientes a la experimentación animal⁽⁶⁾.

Los experimentos con animales tienen su fundamento en el hecho de considerar a otras especies animales, como modelos en miniatura de los problemas humanos. Se realizan experimentos con animales básicamente en tres campos: la docencia, la industria y la investigación⁽⁶⁾.

La mayoría de los conocimientos biológicos y el desarrollo de nuevos métodos de prevención y bienestar de los humanos y animales obligan a recurrir a la experimentación en animales vivos de una gran variedad de especies, lo cual solo deberá realizarse después de considerar debidamente la necesidad de su utilización. Gracias a los métodos de investigación en animales los científicos han creado diversos tratamientos para curar enfermedades y prolongar la vida humana. Ejemplo de esto es el origen de vacunas (poliomielitis), los trasplantes de órganos, las transfusiones de sangre, la diálisis en pacientes con insuficiencia renal, técnicas quirúrgicas y el valor terapéutico de los medicamentos nuevos, se prueban primero en animales⁽⁶⁾. Los resultados de la investigación con modelos animales proporcionan información necesaria para diseñar pruebas humanas que también deben completarse para la aprobación legal de nuevos dispositivos, fármacos y procedimientos con carácter terapéutico y de diagnóstico. Es necesario conocer cómo un nuevo fármaco o procedimiento afectará a un sistema biológico completo antes de usarlo en humanos. Esto es crítico, tanto por razones científicas como éticas, para no sobrecargar en exceso al ser humano. Un ejemplo es que muchos de los experimentos que se realizan pueden responderse más rápidamente en animales, porque se usan modelos con un ciclo

reproductivo corto.

En efecto, en los códigos de ética para la investigación biomédica los ensayos con animales es una obligación. Según el Código de Nuremberg, cualquier experimento hecho en seres humanos “debe ser diseñado y basado en los resultados de investigación animal”. La Declaración de Helsinki, adoptada en 1964 por la XIII Asamblea Médica Mundial y revisada en cinco ocasiones, cita también que la investigación médica en sujetos humanos “debe estar basada en pruebas de laboratorio adecuadamente realizadas y en experimentación con animales”⁽⁷⁾.

Actualmente existen diversos modelos animales experimentales de inducción de cáncer de mama, los cuales reúnen diversas características que son de utilidad en el estudio de diferentes aspectos del cáncer como son:

1. Los tumores se desarrollan en corto tiempo.
2. Son órganos específicos, es decir, se desarrollan principalmente en la glándula mamaria.
3. El carcinógeno causa un efecto pobre o nulo a nivel sistémico.
4. Los tumores mamarios tienen un origen histológico y características patológicas similares al cáncer de mama en humanos⁽⁵⁻⁸⁾.

Debido a que el cáncer de mama es la principal neoplasia que afecta a mujeres en todo el mundo, con exclusión del cáncer de piel no melanoma, y la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres, después de cáncer de pulmón⁽⁹⁾, surge nuestro interés en reproducir uno de estos modelos experimentales en nuestro país, y que este sea usado para evaluar la biología del cáncer de mama, e identificar agentes efectivos en el control y tratamiento de cáncer en humanos.

De igual manera, estos modelos permiten la comprensión de los factores que influyen en la mayor susceptibilidad al carcinoma de mama en Venezuela, actualmente no existe bibliografía nacional en relación con estos modelos experimentales.

Se requiere del uso de modelos experimentales adecuados, tales como la inducción de carcinomas en la glándula mamaria en ratas, mediante la

administración de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, para evaluar la acción de diferentes métodos en la prevención y tratamiento en cáncer de mama.

Estos modelos experimentales, han permitido a los investigadores determinar factores que influyen en el desarrollo del cáncer de mama, inducido por carcinógenos, como son la edad y los factores hormonales, porque de estos depende el grado de diferenciación de la glándula mamaria^(3,4).

Las especies que han sido utilizadas en los modelos de cáncer de mama son el ratón y la rata y entre los agentes químicos más utilizados, está el 7,12 dimetil-Benzo (a) antraceno (DMBA) el cual se administra vía intra-gástrica y el MNU, el cual puede ser administrado por vía intravenosa, subcutánea e intraperitoneal, originando en las ratas tumores principalmente ductales, compartiendo algunas características con los carcinomas de mama en los humanos⁽³⁻⁵⁾.

El MNU, es un agente alquilante, y exhibe su toxicidad mediante la transferencia de sus grupo metilo a las núcleo-bases. Su efecto oncogénico parece deberse a la acción metilante de estos compuestos sobre la guanina, lo que daría lugar a la aparición de cambios irreversibles en el DNA^(2,5).

Este modelo nos permite examinar el proceso de carcinogénesis en el momento de iniciación del mismo y durante el proceso de promoción del carcinoma^(2,4,5).

Las características biológicas de cada modelo han sido bien estudiadas, y se ha observado que ambos sistemas inducen de una manera fácil tumores en mama, afectan órganos específicos y originan principalmente carcinomas ductales⁽⁴⁾.

Las características en las cuales difieren ambos modelos, es que los carcinomas de mama inducidos por el MNU son histológicamente más agresivos y la respuesta hormonal es diferente en ambos modelos⁽⁵⁻¹²⁾.

La dependencia hormonal en el modelo inducido por MNU, fue demostrada en los resultados obtenidos por Lou J y col.⁽⁵⁾, que evidenciaron que la progresión de una lesión pre-maligna a maligna en la glándula mamaria, es inhibida al realizar ooforectomía, y que

el fenotipo de independencia hormonal puede ser conferido en el momento de inicio a la exposición al carcinógeno. En este sentido Russo y col. ⁽¹³⁾, publicaron que el estatus hormonal en dichos carcinomas parece ser semejante al del cáncer de mama en las mujeres.

El modelo con DMBA, proporciona un modelo para el estudio de tumores mamarios, que requiere de una activación metabólica para inducir los tumores, además los tumores son más dependientes de prolactina y son menos agresivos ⁽¹⁴⁻²¹⁾.

El cáncer es definido como una enfermedad genética que condiciona la pérdida de la homeostasis celular, debido a una mutación o falla en la regulación de los genes celulares normales ⁽¹⁾.

Las características patogénicas en el modelo experimental del MNU, han sido descritas mediante técnicas moleculares. Uno de los cambios genéticos somáticos identificados, es la transición del GGA a GAA en el codón 12 del proto-oncogen Ha-ras (ras 12) en un elevado porcentaje de los carcinomas ⁽⁵⁾.

Estudios realizados ponen de manifiesto que el carcinógeno MNU, es el agente directo responsable de la activación del oncogén H-ras-1 ^(5,14,15). Actúa como un metilante directo de la posición O⁶ de la segunda desoxiguanosina en el codón 12 ⁽⁵⁾.

El MNU es un agente altamente lábil en condiciones fisiológicas, esto permite concluir que el proceso carcinogénico se inicia a pocas horas de una única exposición al carcinógeno en los animales sexualmente maduros ⁽⁵⁾. De esta manera, la activación del oncogén Ha-ras-1 en el carcinoma mamario inducido por el MNU, es el resultado de mutaciones localizadas específicamente en una región no mayor de cuatro nucleótidos ^(5,15,16).

La activación de la carcinogénesis por el MNU requiere la activación de dos o más oncogenes cooperantes ⁽¹⁶⁾.

Numerosos estudios indican que esta mutación es un fenómeno iniciador temprano ⁽¹⁷⁾ como resultado de la metilación del nucleósido guanina ^(5,15), aunque, recientemente se ha descrito que dicha mutación es diferente entre las glándulas mamarias abdomino-

inguinales y cervico- torácicas, siendo tres veces superiores en las glándulas anteriores que en las posteriores ⁽¹⁾.

La ruta, dosis e intervalo de administración de MNU fue inicialmente descrito por Gullino Py col. ⁽¹¹⁾ estos autores utilizaron tres inyecciones intravenosas separadas por intervalos de un mes, con una primera dosis a los 50-55 días de edad.

Posteriormente, modificaron este proceso y la administración del carcinógeno, se realizó en dos dosis intravenosas a los 50 días de edad, con una semana de diferencia. En el mismo laboratorio se demostró que una sola dosis intravenosa de MNU, a los 50 días de edad era capaz de inducir carcinomas de mamas.

En 1983 describieron que el MNU, puede ser inyectado subcutáneo a los 50 días de edad sin perder especificidad ni eficacia en la inducción del tumor. Igualmente proponen que el número de tumores incrementa en proporción a la dosis del carcinógeno, debido a que el período de latencia disminuye al aumentar la dosis de MNU ⁽¹⁶⁻²¹⁾.

Rivera y col., presentaron un modelo, basados en tres inyecciones intraperitoneales de MNU a los 50, 80 y 100 días de edad, y todos los tumores expresaron receptores hormonales positivos ⁽²¹⁾.

Martin y col., en referencia a este modelo indican que el proceso de inducciones tumorales es fuertemente dependiente de estrógenos, por lo que la pérdida de estrógeno inhibe la carcinogénesis inducida por MNU ⁽²²⁾. En este modelo experimental los estrógenos y la prolactina juegan un papel importante en la promoción de la carcinogénesis ^(8,9). En relación a la vía de administración, se ha demostrado que la vía intraperitoneal, es la ruta más rápida y la que proporciona un método más simple, reproducible, fiable y de menor variabilidad. La única desventaja son las lesiones de órganos intraperitoneales, aunque esto puede ser evitado usando agujas adecuadas y estandarizando el lugar de las inyecciones ⁽⁴⁾.

Los carcinomas mamarios en ratas inducidos por MNU, son tumores invasivos agresivos y más dependientes de estrógenos de allí la importancia de la gran cantidad de estudios realizados con este modelo para evaluar tratamientos hormonales en cáncer de

mama ^(4,5). En la mayoría de las ratas los tumores malignos muestran características muy comunes con el carcinoma intraductal y el carcinoma ductal en los humanos ⁽¹³⁾.

La lucha contra el cáncer de mama, debe considerar el uso de estos modelos experimentales en animales, ya que estos nos van a permitir descubrir nuevos medicamentos para ser usados en la quimioprevención y en el tratamiento de esta patología.

HIPÓTESIS

El N-metil-nitrosourea administrado intraperitoneal, a ratas de la cepa Sprague Dawley de 50 días, permitirá crear el modelo experimental de cáncer de mama en ratas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Reproducir un modelo experimental, mediante la inducción química de cáncer de mama en ratas con MNM, en ratas cepa Sprague Dawley, criada bajo condiciones de bioterios convencionales en el país, con el fin de iniciar una línea de investigación en carcinogénesis mamaria.

Objetivos Específicos

1. Determinar el tiempo de latencia necesario para que el MNM origine cáncer de mama en nuestras ratas Sprague-Dawley.
2. Calcular la incidencia de tumores de mama palpables, posterior la administración del carcinógeno.
3. Identificar las localizaciones más frecuentes de los tumores de mama inducidos por el MNU en ratas Sprague-Dawley.
4. Evaluar la respuesta al carcinógeno mediante la cuantificación del número de tumores en la rata.
5. Caracterizar el grado de infiltración tumoral al evaluar el tamaño de los tumores originados por el carcinógeno.

6. Determinar la mortalidad en las ratas posterior a la inducción de cáncer de mama con MNU.

MÉTODO

Tipo de estudio: experimental. Las variables dependientes están conformadas por la incidencia de tumores inducidos por el carcinógeno, el grado de infiltración y la localización de los tumores y el tiempo de necesario para la aparición del cáncer.

La variable interviniente es el MNU, que se aplicará vía intraperitoneal a ratas a los 50, 80 y 110 días de edad. El cuidado de los animales a utilizar será llevado a cabo en el Bioterio de la Escuela de Medicina “Dr. José María Vargas”, de la Universidad Central de Venezuela, según las normas y principios básicos internacionales y Normas Fonacit para el mantenimiento de animales de laboratorio y para investigación en animales. Los materiales tóxicos utilizados posteriores a su uso serán congelados en cavas en el Bioterio y luego trasladados a crematorios por parte de personal del Ministerio del Ambiente. Se utilizarán 40 ratas albinas, hembras vírgenes, cepas Sprague-Dawley con 50 días de edad, provenientes del Bioterio de la Escuela de Medicina “Dr. José María Vargas”, distribuidas aleatoriamente. El MNU SIGMA DANGEROUS será adquirido a BioCrom. CA[®]. Empresa encargada de la distribución de productos cancerígenos en Venezuela.

GRUPOS EXPERIMENTALES

Grupo A: representa al grupo control (5 ratas), al cual se inyectará intraperitoneal solución de NaCl al 0,9 % ajustada a un pH 4 con ácido acético a los 50, 80 y 110 días de edad, seguidamente serán devueltas a sus jaulas con alimentación estándar para ratas y agua ad libitum, alojadas en cajas regulares y bajo ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

Grupo Experimental B: constituido por 35 ratas las cuales se le administrará 50 mg /kg de peso de MNU a través de la pared abdominal, a los 50, 80 y 110 días de edad, seguidamente serán devueltas a sus

jaulas con alimentación estándar para ratas y agua ad libitum, alojadas en cajas regulares y bajo ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

Procedimientos

Todas las ratas serán evaluadas, semanalmente mediante el peso y la palpación para detectar la presencia de tumores, a nivel de la pared tóraco-abdominal y la región inguinal, lo cual será registrado por fecha.

El crecimiento del tumor será analizado, en base al tiempo de latencia o número de días transcurrido después de la primera inyección de MNU, tamaño del tumoral o porcentaje de ratas que desarrollan al menos un tumor, número medio de tumores por ratas y el tamaño y localización de los tumores.

A los 120 días serán sacrificadas todas las ratas. Para tal fin, las ratas serán anestesiadas por medio de la administración intramuscular de 40 mg/kg de ketamina y 5 mg/kg de xilaxina. Luego, a través de una incisión de 4 cm sobre la línea media de la pared abdominal, debidamente rasurada y lavada con solución yodopovidina, se realizará la laparotomía y toracotomía, durante el cual la piel será examinada a través de luz translúcida y de esta manera evaluar la localización, número y tamaño de los tumores mamarios, los mismos serán fotografiados para proporcionar información de la localización y morfología y se realizará la resección de los mismos, colocados en formalina al 3 % para ser enviados al servicio de anatomía patológica, donde se realizará el estudio anatomopatológico de estos tumores.

Drogas a utilizar

Se anestesiarán con ketamina (Ketalar®) a la dosis de 40 mg/kg de peso. Además de xilacina (Setón®) al 2 % a la dosis de 5 mg/kg de peso como relajante y analgésico vía intramuscular.

El MNU, será mantenido en hielo durante el proceso, luego será disuelto inmediatamente antes de su empleo en el NACL al 9 %, ajustado a pH 4 con ácido acético. La solubilidad en agua del MNU será de 1,4 % a temperatura ambiente. Una vez

preparado en solución el MNU será utilizado en 20 min, las inyectoras serán envueltas en papel de aluminio hasta que sean utilizadas, porque el MNU es sensible a la luz y a la humedad. Las inyectoras serán llevadas a la sala de inyección de animales sobre hielo.

Tratamiento estadístico adecuado

Se realizó el análisis estadístico mediante el cálculo de la media y la desviación estándar de las variables continuas; en el caso de las variables nominales se calculó sus frecuencias y porcentajes. Los contrastes para tablas 2 x 2, se basaron en la prueba exacta de Fisher; para tablas de 2 columnas y más de 2 filas, se empleó la prueba Chi-cuadrado de Pearson; para las variables continuas, se aplicó la prueba no paramétrica W de Wilcoxon. Se consideró un contraste significativo si $P < 0,05$. Los datos se analizaron con SPSS 17®.

RESULTADOS

A los 120 días de edad de las ratas, posterior a la administración de 50 mg/kg de peso de MNU, se examinó la piel través de luz translúcida, con la evidencia macroscópica de mamas aumentadas de tamaño en 21 (51,2 %) ratas de un total de 41 en el grupo experimental, sin evidenciar aumento de tamaño en el grupo no experimental (Cuadro 1).

Las mamas aumentadas de tamaño macroscópicamente, se localizaron en el grupo experimental en el tórax en 37,5 % y en 24,4 % se localizaron en el abdomen (Cuadro 2 y 3).

El mayor porcentaje de ratas del grupo experimental 80,5 %, no presentó lesiones al evaluar microscópicamente las glándulas mamarias, solo un 12,2 %, de este grupo presentaron un área de la mama, con adenosis micro-glandular con cambios oncocíticos. En un 7,3 % de este grupo se evidenciaron dos áreas del tejido mamario con adenosis micro-glandular

Cuadro 1. Comparación de mama según grupo.

Mamas	No experimental		Experimental	
	n	%	n	%
Aumentadas	0	0,0	21	51,2
Normales	5	100,0	20	48,8
Total	5	100,0	41	100,0

P exacta de Fisher = 0,054

Cuadro 2. Comparación de presencia de mama en tórax según grupos.

Respuesta	No experimental		Experimental	
	n	%	n	%
Si	0	0,0	15	37,5
No	5	100,0	25	62,5
Total	5	100,0	40	100,0

P exacta de Fisher = 0,147

Cuadro 3. Comparación de presencia de mama en abdomen según grupos.

Respuesta	No experimental		Experimental	
	n	%	n	%
Si	0	0,0	10	24,4
No	5	100,0	31	75,6
Total	5	100,0	41	100,0

P exacta de Fisher = 0,570

con cambios oncocíticos. No se presentaron lesiones microscópicas en el tejido mamario del grupo no experimental (Cuadro 4).

Cuadro 4. Comparación de número de tumores según grupos

Respuesta	No experimental		Experimental	
	N	%	N	%
Ninguna	5	100,0	33	80,5
Una	0	0,0	5	12,2
Dos	0	0,0	3	7,3
Total	5	100,0	41	100,0

P = 0,554

Al realizar la incisión sobre la pared abdominal y el tórax y evaluar macroscópicamente, los pulmones, se pudo visualizar la presencia de nódulos blanquecinos, en diecisiete ratas de las cuarenta y uno, del grupo experimental constituyendo un 41,5 %, el grupo no experimental no presentaron nódulos en los pulmones (Cuadro 5).

Los pulmones fueron evaluados microscópicamente, y en diecinueve ratas (46,3 %), se evidenció un extenso infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario difuso, y en ciertas áreas que, formaban agregados linfoides que se disponían alrededor de los bronquios principales y los bronquiolos (Cuadro 6).

Cuadro 5. Comparación de lesiones macroscópicas en pulmón según grupos.

Respuesta	No experimental		Experimental	
	N	%	n	%
Nódulos	0	0,0	17	41,5
Normal	5	100,0	24	58,5
Total	5	100,0	41	100,0

P = 0,142

Cuadro 6. Comparación de lesiones microscópicas en pulmón según grupos.

Respuesta	No experimental		Experimental	
	n	%	n	%
Infiltrado	0	0,0	19	46,3
Normal	5	100,0	22	53,7
Total	5	100,0	41	100,0

P = 0,067

Al comparar el número de lesiones, con infiltrado inflamatorio en los pulmones, se puede ver que diecinueve ratas (46,3 %) del grupo experimental, no presentaron lesiones inflamatorias en los pulmones, una rata (2,4 %) presentó solo una lesión, ocho ratas presentaron dos lesiones en los pulmones (19,5 %) y en trece (31,7 %) ratas, se evidenció la presencia de más de dos lesiones inflamatorias en los pulmones del grupo experimental (Cuadro 7).

Las lesiones inflamatorias, se presentaron con igual frecuencia, al comparar ambos pulmones; en diecinueve ratas se presentaron en el pulmón derecho y de igual manera diecinueve ratas

Cuadro 7. Comparación de número de tumores en pulmón según grupos.

Respuesta	No experimental		Experimental	
	n	%	n	%
Ninguno	5	100,0	19	46,3
Uno	0	0,0	1	2,4
Dos	0	0,0	8	19,5
Más de dos	0	0,0	13	31,7
Total	5	100,0	41	100,0

P = 0,162

presentaron lesiones en el pulmón izquierdo constituyendo esto un 46,3 % respectivamente. (Cuadro 8).

Cuadro 8. Comparación de presencia de lesiones macroscópicas en pulmón.

Respuesta	No experimental		Experimental	
	n	%	n	%
Derecho				
Si	0	0,0	19	46,3
No	5	100,0	22	53,7
Izquierdo				
Si	0	0,0	19	46,3
No	5	100,0	22	53,7

Derecho: P = 0,067

Izquierdo: P = 0,067

Al comparar el tamaño de las lesiones en la mama y los pulmones en el grupo experimental, se puede observar que la media del tamaño, de las lesiones en la mama es de 0,10 cm con una desviación estándar de 0,20 y una P de 0,492, el porcentaje de afectación por lesiones inflamatorias de los pulmones tuvo una media de 13,17 % con una desviación estándar de 27,70 y una P de 0,492 y el tamaño de estas lesiones tuvo una media de 0,23 cm (Cuadro 9).

DISCUSIÓN

Los modelos experimentales en animales son herramientas esenciales, en el estudio de la inducción, prevención y el desarrollo de la carcinogénesis. Los protocolos experimentales, brindan una serie de posibilidades para el biólogo experimental. Permiten avanzar en el estudio,

Cuadro 9. Comparación del tamaño del tumor, porcentaje de afectación y tamaño del tumor en pulmón.

Variables	No experimental (n = 5)		Experimental (n = 41)		P
	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	
Tamaño del tumor en mama	0,00	0,00	0,10	0,20	0,492
% de afectación en mama	0,00	0,00	13,17	27,70	0,492
Tamaño en pulmones	0,00	0,00	0,23	0,30	0,098

de los mecanismos de formación de lesiones pre-neoplásicas, que se cree corresponden a las primeras manifestaciones de procesos carcinogénicos posteriores. Estos protocolos permiten la posibilidad de examinar el efecto de agentes preventivos, que eviten la formación de estas lesiones y avanzar así, dentro de posibilidades terapéuticas futuras. De igual manera, nos permite estudiar los mecanismos mediante el cual se desarrollan las lesiones inducidas por el MNU y explorar las posibilidades de modulación de estos procesos, así como de prevención en la formación de estas lesiones. Entre los modelos experimentales, que se han desarrollado en cáncer de mama en ratas.

Existen los inducidos por carcinógenos. Entre ellos se pueden mencionar los inducidos por MNU y dimetilbenzeno (a) antraceno (DMBA), que son hormono-respondedores y expresan receptores de estrógenos. Estos modelos desde un punto de vista global, tienen la ventaja que permiten estudiar el proceso de carcinogénesis de la glándula mamaria. De allí surge la importancia de reproducir estos modelos en nuestro país, porque el cáncer de mama, es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres en Venezuela. Estos experimentos, se deben realizar durante mucho tiempo y con gran número de animales, y la inducción del tumor va a depender de muchos factores, entre estos factores se deben mencionar: las cepas de los ratones, dependiendo de estas no se logra inducir tumores en ciertas ratas, o los tumores serán histológicamente y biológicamente

diferentes. Los cuidados que rodean al animal también, influyen en forma directa sobre los resultados de los experimentos; el estado de bienestar de los animales está íntimamente ligado a su capacidad de respuesta; las condiciones de alojamiento son importantes, es decir, la cantidad de animales por caja. Existe actualmente, una tendencia a aumentar el espacio por animal e inclusive, a estimular sus actividades por medio de ruedas u otros accesorios. Las condiciones ambientales controladas también influyen. Las temperaturas extremas, la falta de renovación del aire, las altas concentraciones de amoníaco etc., someten a los animales a sufrimientos innecesarios e invalidan los resultados desde el punto de vista experimental. Ellos tienen, necesidades fisiológicas y de comportamiento que deben ser identificadas y proporcionadas para cada especie, de esta manera poder obtener resultados adecuados en los experimentos. La experiencia por el investigador en la práctica de sujeción, inyección, analgesia, anestesia y eutanasia también influye en los resultados obtenidos. En nuestro modelo experimental el MNU, no se logró, inducir el cáncer de mama, en los animales experimentales, solo se logró inducir en 12,2 % del grupo experimental, adenosis micro-glandular en un área de la mama y un 7,3 % de las mamas del grupo experimental, presentaban dos áreas con adenosis micro-glandular con cambios oncocíticos, no se observaron lesiones microscópicas en el tejido mamario del grupo no experimental. Considerando que el carcinoma

ductal de mama, es el centro de un espectro continuo de lesiones, que se puede originar en proliferaciones glandulares benignas, entre ellas las adenosis micro-glandulares, y progresar a carcinomas infiltrantes, se puede plantear que es posible que el MNU sea capaz de dar origen a adenosis micro-glandular que posteriormente progresa a carcinoma, lo cual puede ser influido por diversas variables. La adenosis micro-glandular, es una lesión benigna, que se diferencia de los otros tipos de adenosis, por tener un patrón de crecimiento infiltrante y las glándulas están revestidas solo por una capa de células planas a cúbicas mioepiteliales. Las células epiteliales son positivas para S100 ⁽²³⁾.

Datos recientes sugieren que esta lesión, puede ser precursor de un carcinoma, y existen un grado intermedio de la lesión, la cual es la adenosis micro-glandular atípica. Los carcinomas que surgen en un contexto de adenosis micro-glandulares pueden ser carcinomas de bajo grado, son comúnmente receptores de estrógeno y progesterona negativos, en contraste con el bajo grado ⁽²³⁾.

El patrón de crecimiento infiltrativo y la ausencia de una capa mioepitelial, en adenosis microglandulares, simula el carcinoma de mama bien diferenciado, incluyendo el carcinoma tubular. Pero este se diferencia de la adenosis micro-glandular por su patrón de crecimiento estrellado con una respuesta desmoplásica del estroma asociada ⁽²³⁾.

La adenosis micro-glandular atípica se caracteriza por una mezcla más pleomórfica de glándulas grandes, con ocasionales figuras mitóticas y atipias citológicas, incluyendo núcleos vesiculares y nucléolos prominentes ⁽²³⁾. Los carcinomas de mama se han descrito en asociación con adenosis micro-glandular, hasta en un 27 %, a pesar que algunos casos de carcinoma lobulillar de mama asociados con adenosis pueden ser causados por la yuxtaposición de los dos procesos patológicos ⁽²³⁾. Otro aspecto importante observado microscópicamente fue

al evaluar los pulmones, en diecinueve ratas (46,3 %), se evidenció un extenso infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario difuso, y en ciertas áreas formaban agregados linfoides que se disponían alrededor de los bronquios principales y los bronquiolos. Esto puede ser explicado debido a que la inflamación es un proceso fisiológico que los organismos elaboran frente a los fenómenos de daño tisular ^(24,25). Esta respuesta tiene un rol clave en la activación de la respuesta inmune para mediar el rechazo de los tumores ^(25,26). Existen evidencias de que en los sitios de inflamación crónica existe mayor probabilidad de que se genere un tumor; esto se observa desde 1863, cuando Virchow observó por primera vez infiltrados de leucocitos en tejidos tumorales ^(27,28). En algunos modelos experimentales, poco después de la inoculación de células tumorales, se ha observado un fenómeno de inflamación sistémica, que desaparece rápidamente después de que el tumor se ha implantado. Pero estos estudios no han analizado lo que ocurre después, cuando el tumor ha iniciado su crecimiento progresivo ^(28,29). El objetivo del presente trabajo no se logró porque no se creó, un modelo de inducción de cáncer de mama. Creemos que este tipo de modelos en animales experimentales resultan indispensables, para la investigación de los factores causantes de esta enfermedad, de allí la importancia de motivar en la realización de estos trabajos y de esta manera lograr reproducir este modelo en nuestros animales experimentales, tomando en cuenta los diversos factores que puede modificar el desarrollo del cáncer.

Esperamos que esta revisión motive estudios posteriores, que utilice este tipo de protocolos experimentales, que auguran constituirse en uno de los ensayos que brindará información importante en torno a los mecanismos que subyacen al desarrollo de cáncer de mama. De igual manera se deben estudiar los de la evolución de la adenosis micro-glandular y de esta manera poder establecer si se trata en una enfermedad pre-neoplásica.

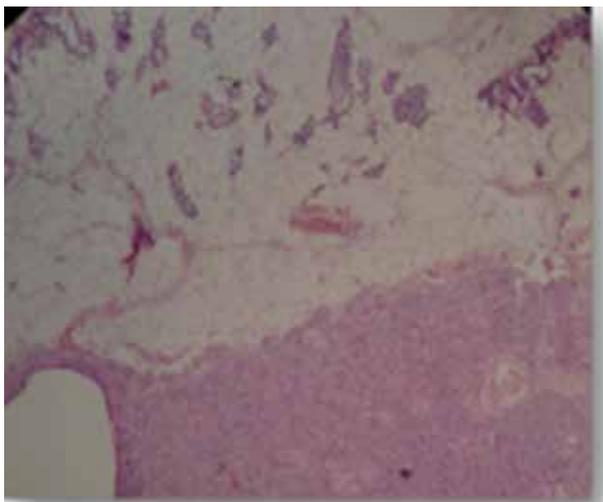


Figura 1. Se observa la adenosis micro-glandular en la mitad inferior. La adenosis micro-glandular es una lesión benigna glandular proliferante. En la mitad superior se observa, la mama normal de la rata (mucha grasa y escasos ductos y acinos mamarios).

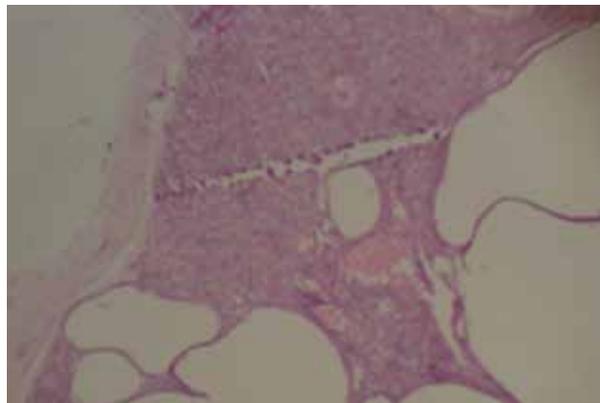


Figura 3. La lesión presentaba degeneración quística en algunas mamas evaluadas.

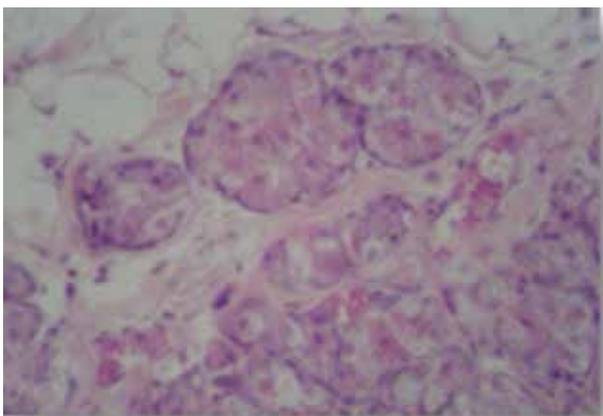


Figura 2. Se observa la adenosis micro-glandular a mayor aumento, está compuesta por pequeñas estructuras glandulares, redondas delimitadas por una sola capa de células epiteliales cuboidales. El citoplasma es eosinófilo, muy pronunciado, granular, por eso se denominó adenosis micro glandular con cambios oncocíticos.

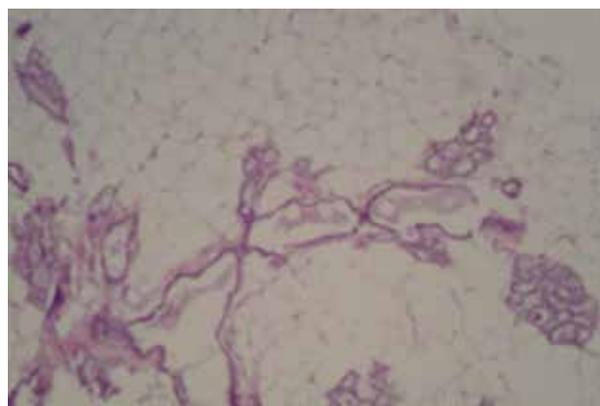


Figura 4. Imagen histológica de tejido mamario normal, con abundante tejido adiposo, escasos ductos y acinos mamarios sin atipias.

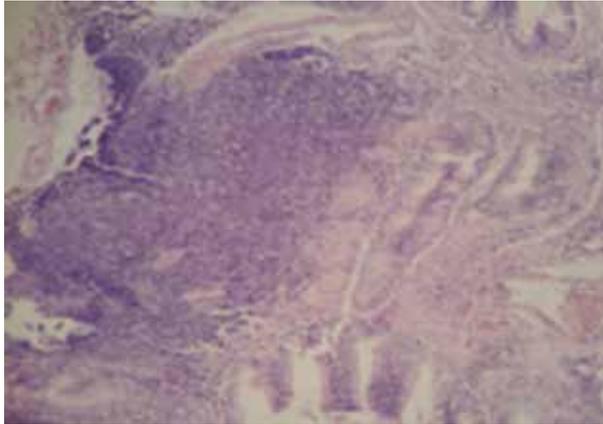


Figura 5. Se evidencia en el pulmón, extenso infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario peri bronquial y bronquioalveolar.

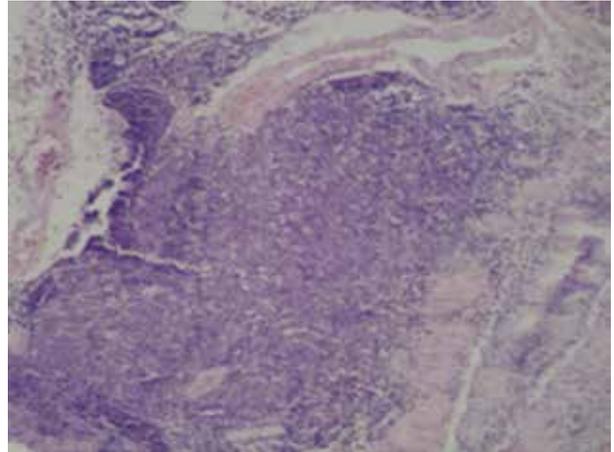


Figura 6. Se evidencia en el pulmón, áreas donde se ven agregados linfoides como con centros germinales activos la parte central.

REFERENCIAS

1. Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med.* 2008;358(5):502-511.
2. Capote NL. Aspectos epidemiológicos del cáncer en Venezuela. *Rev Venez Oncol.* 2006 ;18(4):269-281.
3. Cooper GS. Hormone replacement following early menopause. *JAMA.* 2002;288(22):2824-2825.
4. Thompson H, Adlakha H. Dose-responsive induction of mammary gland carcinomas by the intraperitoneal injection of 1-Methyl-1-Nitrosourea. *Cancer Res.* 1991;51(13):3411-3415.
5. Lu J, Jiang C, Mitrenga T, Cutter G, Thompson HJ. Pathogenic characterization of 1-Methyl-1-Nitrosourea-induced mammary carcinomas in the era. *Carcinogenesis.* 1998;19(1):223-227.
6. Rodríguez E. Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. *Acta Bioeth.* 2007;13(1):25-40.
7. Schuster E. Fifty years later: The significance of the Nuremberg code. *N Engl J Med.* 1987;337(2):1436-1440.
8. Rajkumar L, Guzman RC, Yang J, Thordarson G, Talamantes F, Nandi S. Prevention of mammary carcinogenesis by short-term estrogen and progestin treatments. *Breast Cancer Res.* 2003;6(1):R31-37.
9. Chamilova P, Kubatka K, Kalicka E, Adamekova B, Bojkova A. Chemoprevention of N-methyl-n-Nitrosourea induced mammary carcinogenesis with raloxifene and melatonin: Metabolic changes in female rats. *Acta Vet Brno.* 2002;71:235-242.
10. Shan L, Yu M, Schut HA, Snyderwine EG. Susceptibility of rats to mammary gland carcinogenesis by the food derived carcinogen 2-Amino-1-Methyl-6-Phenylimidazo[4,5-b]Pyridine (PhIP) varies with age and is associated with the induction of differential gene expression. *Am J Pathol.* 2004;165(1):191-201.
11. Gullino P, Pettigrew H, Grantham F. Nitrosomethylurea as mammary gland carcinogen in rats. *J Natl Cancer Inst.* 1975;54(2):401-414.
12. Lu S, Archer M. N-methyl-N-nitrosourea-treated rats genetically resistant to mammary adenocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci.* 1992;89(3):1001-1005.

13. Russo J, Gusterson B, Rogers A, Russo I, Wellings S, Van Zwieten M. Biology of disease: Comparative study of human and rat mammary tumor genesis. *Lab Invest.* 1990;62(3):244-278.
14. Chow L, Cheung M, Loo W, Guan X. A rat cell line derived from DMBA-induced mammary carcinoma. *Life Sciences.* 2003;73(1):27-40.
15. Sohemy A, Archer M. Inhibition of N-Methyl- N-nitrosourea and 7,12 dimetil benza anthracene induced rat mammary tumor genesis by dietary cholesterol is independent of Ha-ras mutation. *Carcinogenesis.* 2002;21(4):827-831.
16. Zarbl H, Sukumar S, Arthur A, Martin-Zanca D, Barbacid M. Direct mutagenesis of Ha-ras-1 oncogenes by N-nitroso-N-methylurea during initiation of mammary carcinogenesis in rats. *Nature.* 1985;315(6018):382-385.
17. Kumar R, Sukumar S, Barbacid M. Activation of ras oncogenes preceding the onset of neoplasia. *Science.* 1990;248(4959):1101-1104.
18. Lu J, Jiang C, Fontaine S, Thompson HJ. Ras may mediate mammary cancer promotion by high fat. *Nutr Cancer.* 1995;23(3):283-290.
19. Moon R, Grubbs C, Sporn M, Goodman D. Retiny acetate inhibits mammary carcinogenesis induced by N-methyl-N- Nitrosourea. *Nature.* 1977;267(562):620-621.
20. Thompson H, Meeker L. Induction of mammary gland carcinomas by the subcutaneous injection of 1-methyl-1-nitrosourea. *Cancer Res.* 1983;43(4):1628-1629.
21. Rivera E, Andrade N, Martin G, Melito G, Cricco G, Mohamad N, et al. Induction of mammary tumors in rat by intraperitoneal injection of NMU: Histopathology and estral cycle influence. *Cancer Lett.* 1994;86(2):223-228.
22. Martin G, Davio C, Rivera E, Melito G, Cricco G, Andrade N, et al. Hormone dependence of mammary tumors induced in rats by intraperitoneal NMU injection. *Cancer Invest.* 1997;15(1):8-17.
23. Salarieh A, Sneige N. Breast carcinoma arising in micro glandular adenosis: A review of the literature. *Arch Pathol Lab Med.* 2007;131(9):1397-1399.
24. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: Back to Virchow? *Lancet.* 2001;357(9255):539-545.
25. Kamate C, Baloul S, Grootenboer S, Pessis E, Chevrot A, Tulliez M, et al. Inflammation and cancer, the mastocytoma P815 tumor model revisited: Triggering of macrophage activation in vivo with pro-tumorigenic consequences. *Int J Cancer.* 2002;100(5):571-579.
26. Le N, Xue M, Castelnoble L, Jackson C. The dual personalities of matrix metalloproteinases in inflammation. *Front Biosci.* 2007;12:1475-1487.
27. Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res.* 2006;4(4):221-233.
28. Nelson D, Ganss R. Tumor growth or regression: Powered by inflammation. *J Leukoc Biol.* 2006;80(4):685-689.
29. Ganss R, Hanahan D. Tumor micro environment can restrict the effectiveness of activated antitumor lymphocytes. *Cancer Res.* 1998;58 (20):4673-4681.