

CARCINOGENESIS QUÍMICA DE VEJIGA URINARIA EN ROEDORES DE LABORATORIO COMO MODELO EXPERIMENTAL

ANTONIETA ALVARADO, REGINA ARANTES-RODRIGUES, CARMEN VASCONCELOS-NÓBREGA, RUI GIL DA COSTA, MARÍA ROSÁRIO PINTO-LEITE, ANA ISABEL FAUSTINO-ROCHA, PAULA ALEXANDRA OLIVEIRA

ÁREA DE PATOLOGÍA, DECANATO DE CIENCIAS VETERINARIAS, UNIVERSIDAD CENTROCCIDENTAL "LISANDRO ALVARADO" UCLA-DCV, VENEZUELA. DEPARTMENT OF VETERINARY SCIENCES, SCHOOL OF AGRARIAN AND VETERINARY SCIENCES, UNIVERSITY OF TRÁS-OS-MONTES AND ALTO DOURO, UTAD, VILA REAL, PORTUGAL CENTER FOR THE RESEARCH AND TECHNOLOGY OF AGRO-ENVIRONMENTAL AND BIOLOGICAL SCIENCES (CITAB), UNIVERSITY OF TRÁS-OS-MONTES AND ALTO DOURO, UTAD, VILA REAL, PORTUGAL EXPERIMENTAL PATHOLOGY AND THERAPEUTICS GROUP, PORTUGUESE INSTITUTE OF ONCOLOGY, CI-IPOP, PORTO, PORTUGAL, LABORATORY FOR PROCESS ENGINEERING, ENVIRONMENT, BIOTECHNOLOGY AND ENERGY (LEPABE), CHEMICAL ENGINEERING DEPARTMENT, FACULTY OF ENGINEERING, UNIVERSITY OF PORTO, FEUP, PORTO, PORTUGAL AGRARIAN SCHOOL OF VISEU, POLYTECHNIC INSTITUTE OF VISEU, VISEU, PORTUGAL GENETIC SERVICE, CYTOGENETIC LABORATORY, HOSPITAL CENTRE OF TRÁS-OS-MONTES AND ALTO DOURO VILA REAL, PORTUGAL.

RESUMEN

Los tumores uroteliales inducidos por compuestos químicos carcinogénicos en animales de laboratorio son morfológica e histológicamente semejantes a los identificados en el hombre y permiten estudiar muchas de las características observadas en los tumores de vejiga urinaria del hombre. La carcinogénesis de vejiga urinaria en los roedores de laboratorio es un proceso que envuelve una serie de etapas y que se inicia por lesiones pre-neoplásicas que evolucionan a lesiones neoplásicas, en analogía con lo que ocurre en el hombre. Además de esto, los tumores del urotelio de la rata (*Rattus norvegicus*) y del ratón (*Mus musculus*) expresan marcadores bioquímicos y moleculares identificados en los tumores humanos. Por esta razón, la utilización de roedores como modelos de carcinogénesis urotelial constituye un buen método para evaluar y estudiar la acción de fármacos antineoplásicos en estas neoplasias.

PALABRAS CLAVE: Carcinogénesis, química, modelos animales, tumores, uroteliales.

SUMMARY

Urotelial cancer, is a common malignancy in the worldwide, is an important contributor to the overall international cancer burden. The urotelial tumors induced by chemical carcinogens in the laboratory animals repeat many of the features observed in the human urotelial neoplasia. The urotelial tumors chemically induced in the urinary bladder are morphologically and histologically similar to the human urotelial tumors. Like human urotelial carcinogenesis, rodent carcinogenesis is a multistep process that involves sequential progression from simple hyperplasia to invasive carcinoma or papillary tumors through varying lesions. In addition, the rodent tumors (*Rattus norvegicus*) and (*Mus musculus*) express several biochemical and molecular markers that are also expressed in the human urotelial tumors. For this reason, the rodent urinary bladder carcinogenesis is a good animal system to evaluate chemo preventive agents and to study cancer pathways.

KEY WORDS: Chemical carcinogenesis, animal models, urotelial, tumors.

Recibido: 16/09/2014 Revisado: 21/10/2014

Aceptado para publicación: 01/11/2014

Correspondencia: Antonieta Alvarado, Universidad de Trás-

os-Montes e Alto Douro, Departamento Ciencias Veterinarias, Vila Real-Portugal. Teléfono: 00351 962230012. E-mail: antonietaalvarado@ucla.edu.ve

CÁNCER DE VEJIGA URINARIA

Para inducir tumores de vejiga urinaria se pueden utilizar varias especies animales tales como el perro, el conejillo de indias, la rata, el ratón, el conejo y el hámster. No obstante, por razones de ética, tamaño del animal, costos y datos biológicos disponibles, los animales más utilizados son sin duda las ratas (*R. norvegicus*) y los ratones (*M. musculus*). El tracto urinario inferior de los roedores es notablemente semejante al de los humanos en su estructura y función ⁽¹⁾; este se extiende desde la pelvis renal, a través de los uréteres, hasta la vejiga y termina en la uretra ⁽²⁾. Excepto la uretra, el tracto urinario está constituido por cuatro capas de tejidos: mucosa, lámina propia, muscular y serosa ^(3,4). La mucosa del tracto urinario inferior se clasifica como epitelio polimorfo, de transición o urotelio. El urotelio está constituido por tres capas de células: superficial, intermedia y basal ^(1,4-6). Un vez que todo el tracto urinario está revestido por urotelio, teóricamente, la uretra y los uréteres podrían desarrollar lesiones proliferativas semejantes a las descritas en la vejiga. Sin embargo, las lesiones proliferativas uretrales y de los uréteres son raras en estas especies animales. Esta ocurrencia puede explicarse por el rápido pasaje de la orina a través de estas estructuras, en comparación con el tiempo de contacto de la orina con el urotelio vesical ⁽⁷⁾. La incidencia de tumores espontáneos en los roedores de laboratorio es de importancia práctica en la concepción e interpretación de los ensayos de carcinogénesis inducida. El efecto de un agente carcinogénico se detecta más fácilmente si la incidencia de los tumores de vejiga es nula, por esta razón el escoger la estirpe animal es muy importante ⁽⁸⁾. No obstante, a pesar de que la ocurrencia espontánea de tumores de vejiga es muy rara en los animales de laboratorio, estas se asocian a edades avanzadas ⁽⁹⁻¹²⁾. Una incidencia elevada de neoplasias uroteliales y ureterales fue documentada en

dos linajes de ratas: *Brown/Norway (BN/RijHsd)* y *Dark Agouti (DA/OlaHsd)*, asociada al desarrollo de urolitos ^(11,13,14). Las lesiones uroteliales identificadas en estos animales fueron clasificadas como papilares y multifocales, con el desarrollo simultáneo de carcinoma *in situ* (CIS) ^(3,15). Otras alteraciones no neoplásicas, tales como inflamación e hiperplasia urotelial se pueden identificar también en el urotelio. La infección con el parásito *Trichosomides crassicauda* está asociada con el desarrollo espontáneo de tumores en ratas ⁽¹⁶⁾, sin embargo, es rara en condiciones experimentales debido a que en estas circunstancias la comida y la cama deben ser almacenadas en lugares inaccesibles a roedores salvajes ⁽¹⁷⁾. No existen relatos previos sobre la infección de este parásito en vejiga urinaria de ratones. Los tumores espontáneos de vejiga urinaria en otras especies de roedores, incluyendo los hámsteres, conejillos de indias y conejos parecen ser igualmente raros ⁽¹⁰⁾.

CARCINOGENESIS QUÍMICA DE VEJIGA URINARIA

En la década de 1960 e inicio de 1970 fueron desarrollados varios compuestos químicos carcinogénicos específicos para la inducción experimental de tumores de vejiga urinaria en animales de laboratorio. Estos compuestos carcinogénicos fueron fundamentales para dar inicio al estudio detallado de los mecanismos bioquímicos e inmunológicos envueltos en la patogénesis del cáncer de vejiga con el recurso de los animales de laboratorio ⁽¹⁰⁾. Existen tres compuestos químicos considerados muy eficaces en la inducción del cáncer de vejiga, pues desde que son administrados por la vía adecuada, la dosis ajustada y la estirpe animal indicada, todos tienen una tasa de inducción del 100 % en tumores de vejiga. Estos compuestos químicos son: *N*-[4-(5-nitro-2-furil)-2-tiazolil] formamida, *N*-butil-*N*-(4-hidroxibutil) nitrosamina (BBN) y *N*-metil-*N*-nitrosourea (MNU) ⁽¹⁸⁾. Estos compuestos son

agentes carcinogénicos completos que actúan simultáneamente como iniciadores y promotores, la dosis total tiene un efecto mayor cuando son administrados en varias fracciones, es decir, el efecto de las dosis individuales es sinérgico en vez de aditivo. El grado de atipia celular y la extensión de la invasión aumentan con el tiempo de exposición a los agentes carcinogénicos y con la duración del período experimental ^(19,20). De los tres compuestos antes referidos, BBN es el más utilizado en modelos animales, una vez que su potencial carcinogénico es limitado a este órgano ^(21,22). BBN es un metabolito de la dibutilnitrosamida (DBN) ⁽²³⁾. Los tumores de vejiga inducidos por BBN en ratas y ratones se asemejan a los identificados en el hombre, tanto macro como microscópicamente ^(21,24,25). En ratas BBN y DBN demostraron ser carcinogénicos para la vejiga urinaria, no obstante BBN apenas indujo el desarrollo de neoplasias en la vejiga en cuanto DBN indujo el desarrollo de tumores de hígado, pulmón, riñón y esófago ^(26,27). La exposición de ratones a DBN induce el mismo espectro de lesiones identificadas en las ratas ^(4,28,29). Las diferencias histopatológicas observadas entre varias especies de roedores expuestos a BBN pueden ser atribuidas a la dosis, la especie y la estirpe animal. BBN es específica no solo para la vejiga de ratas sino también para la de los perros, no obstante por razones de ética los perros no son utilizados en este tipo de ensayos. Sin embargo, es un agente carcinogénico débil en hámsteres y cerdos ^(6,8,30,31). Se puede obtener una incidencia del 100 % de tumores inducidos a través de la administración continua y prolongada de BBN en el agua de beber de los animales. Este compuesto también puede ser administrado por sonda oral ⁽⁸⁾. Sin embargo, la administración por sonda oral está asociada a una elevada mortalidad debido a los posibles falsos trayectos que pueden ocurrir, como la bronco-aspiración ⁽³²⁾. Las inyecciones subcutáneas de BBN generalmente resultan en una menor incidencia de tumores

⁽⁴⁾. Una vía de administración alternativa, con innumerables dificultades en su ejecución, consiste en la instilación intra-vesical de BBN ⁽³³⁾; no obstante esta técnica solo puede ser realizada en animales hembras, porque en los machos se dificulta su realización por la curvatura de la uretra peneana ⁽³⁴⁾. BBN es un compuesto clasificado como genotóxico y su grupo alcoholico es rápidamente oxidado en un grupo carboxilo por el hígado, específicamente por el sistema enzimático aldehído deshidrogenasa. El metabolito formado se denomina *N*-butil-*N*-(3 carboxibutil) nitrosamina (BCPN) y también es un compuesto carcinogénico que alcanza el urotelio a través de la orina ⁽³⁵⁻³⁷⁾. BCPN es un compuesto estable que se une covalentemente a macromoléculas celulares y es responsable de la iniciación del proceso de carcinogénesis ⁽³⁵⁾. BCPN desencadena la transformación neoplásica de las células uroteliales de las ratas cultivadas *in vitro* ⁽²⁸⁾. La carcinogénesis urotelial en ratas es una secuencia de alteraciones morfológicas que se inician por hiperplasia simple; en seguida prosigue a hiperplasia nodular y papilar. Estas lesiones evolucionan a papilomas y pueden, eventualmente, evolucionar a carcinomas de alto grado, carcinomas no invasivos y finalmente, carcinomas invasivos ^(1,29,38-40). Muchos tumores exofíticos inducidos en ratas son polipoides, generalmente pedunculados y con un patrón de crecimiento papilar invertido ^(5,29,41). De esta forma, el modelo de ratas se asemeja mucho a las neoplasias papilares y el modelo de ratones a las lesiones uroteliales planas, ambas identificadas en el hombre ⁽⁴²⁾.

ENSAYOS EXPERIMENTALES DE CARCINOGENESIS DE VEJIGA URINARIA INDUCIDO POR BBN

Usando el modelo de cáncer de vejiga inducido por BBN en ratas, nuestro equipo al investigar la expresión de la E-caderina en las lesiones pre-neoplásicas y en los tumores

uroteliales, observó que la hiperplasia simple y la metaplasia escamosa tienen un patrón de expresión de la E-caderina semejante a la del urotelio normal, con su expresión confinada a la membrana celular. De todos los casos estudiados el 38,1 % de las hiperplasias nodulares, el 41,4 % de las displasias y el 100 % de los papilomas tuvieron una expresión de E-caderina reducida. Todas las neoplasias papilares de bajo potencial maligno, los carcinomas de bajo y de alto grado y los carcinomas invasivos revelaron un patrón de marcación anormal, con un aumento en la reactividad citoplasmática y positividad de la membrana celular discontinua ⁽⁴³⁾. También se investigó el contenido de ADN, la expresión de los anticuerpos Ki-67 y p53 en lesiones uroteliales inducidas por BBN en hembras de ratas Fisher 344 y tratadas por instilación intra-vesical con mitomicina C (MMC) y *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), ambos fármacos instilados intra-vesicalmente una vez por semana, durante seis semanas. El análisis de la ploidía del ADN fue realizado por citometría de imagen y la expresividad del Ki-67 y p53 fue analizada por inmunohistoquímica en tejidos incluidos en parafina. La incidencia de aneuploidía en los tumores de vejiga de las ratas, fue menor en los tumores tratados con MMC y BCG. Los carcinomas papilares de alto y bajo grado tratados con MMC y BCG tenían una disminución del índice de apoptosis ⁽⁴⁰⁾. También al investigar la acción de los fármacos inhibidores del gen mTOR, como el sirolimus, en ratones con carcinoma urotelial invasivo inducido por BBN se observó que la incidencia de esta lesión se redujo significativamente después del tratamiento con el sirolimus. Las lesiones pre-neoplásicas y neoplásicas exhibieron también una disminución significativa de su proliferación celular ⁽⁴³⁾.

En otro estudio se analizó la eficacia del sirolimus y de la gemcitabina, aislados y en combinación, en ratones previamente expuestos a BBN. Ambos fármacos fueron administrados

durante 6 semanas consecutivas y su eficacia fue evaluada histológicamente. A pesar de que los resultados no fueron estadísticamente significativos la incidencia de lesiones pre-neoplásicas fue menor en los animales después del tratamiento aislado con la gemcitabina (hiperplasias simples: 66,67 %, hiperplasias nodulares: 46,67 %, carcinomas *in situ*: 0 %, tumores papilares de alto y bajo grado: 6,67 % y 0 % respectivamente). En los animales no tratados expuestos a BBN se obtuvieron las siguientes incidencias: hiperplasias simples 76,90 %, hiperplasias nodulares 69,23 %, carcinomas *in situ* 15,38 %, tumores papilares de bajo y alto grado 7,7 %, en ambos. En cuanto a la displasia se observó una incidencia del 100 % en los dos grupos. La incidencia de carcinomas invasivos fue menor en los animales tratados con la gemcitabina (20 %) en comparación con los animales no tratados (54 %). A semejanza de lo observado en el estudio anterior, la incidencia de los carcinomas invasivos también fue significativamente baja, con una incidencia del 54 % y el 7,14 % en los animales no tratados y en los animales tratados con el sirolimus respectivamente. En los animales tratados con los dos fármacos simultáneamente, se observó un menor número de lesiones uroteliales cuando fue comparado con los animales no tratados, principalmente en la incidencia de la hiperplasia nodular y de los carcinomas invasivos ⁽⁴⁴⁾.

En relación al gen mTOR, se evaluó el efecto del everolimus (RAD001), un análogo del sirolimus. Después de la inducción de los tumores con BBN en los ratones machos, el RAD001 fue administrado por vía oral, dos veces por semana durante seis semanas consecutivas. En este estudio en particular, se observó histológicamente, que el desenvolvimiento de las lesiones inducidas por BBN no fueron significativamente influenciadas por el tratamiento con el RAD001. La incidencia de lesiones pre-neoplásicas fue ligeramente inferior en los animales tratados (hiperplasias

simples: 64,3 %, hiperplasias nodulares: 57,14 %, displasias: 85,7 %) cuando fueron comparadas con los animales expuestos a BBN y no tratados (hiperplasias simples: 76,9 %, hiperplasias nodulares: 69,23 %, displasias: 100 %). No obstante, la incidencia de lesiones invasivas se mantuvo semejante entre los animales de los diferentes grupos ⁽⁴⁵⁾.

Posteriormente fue evaluado el efecto del meloxicam, el cual es un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo, inhibidor selectivo de la enzima ciclooxigenasa 2. Los ratones machos fueron expuestos a BBN, seguidamente fueron tratados con el meloxicam por vía intraperitoneal, durante 6 semanas consecutivas. Histológicamente se observó que la incidencia de lesiones pre-neoplásicas inducidas por BBN no fue afectada por el tratamiento (hiperplasias simples: 80 %, hiperplasias nodulares: 40 %, displasias 90 %) cuando fue comparado con los animales no tratados (hiperplasias simples: 77,8 %, hiperplasias nodulares: 40 %, displasias: 100 %). Ninguno de los animales tratados con meloxicam desarrollaron lesiones neoplásicas, a diferencia de los animales no tratados que tuvieron una incidencia del 20 %, específicamente carcinomas invasivos, sin alteraciones significativas en los parámetros renales y hepáticos. Fueron analizados además marcadores de inflamación por *Western Blot* tales como: interleucina-6, proteína C reactiva y factor de necrosis tumoral, sin observarse diferencias significativas entre los animales tratados y no tratados ⁽³²⁾.

En conclusión los resultados obtenidos en roedores como modelos de carcinogénesis urotelial contribuyen significativamente a la comprensión de la influencia de las alteraciones específicas durante el proceso de carcinogénesis y pueden ser aplicados en la identificación de nuevos blancos terapéuticos.

REFERENCIAS

1. Oyasu R. Epithelial tumors of the lower urinary tract in humans and rodents. *Food Chem Toxicol.* 1995;33(9):747-755.
2. Squire RA. Monographs on pathology of laboratory animals, urinary system En: Jones TC, Hard GC, Mohr U, editores. 2ª edición. Classification and differential diagnosis of neoplasms, urinary tract rat. Nueva York: Springer; 1998.p.9-74.
3. DeSesso JM. Confounding factors in direct bladder exposure studies. *Comments Toxicol.* 1989;3:317-334.
4. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Am J Surg Pathol.* 1998;22(12):1435-1448.
5. Cohen SM. Monographs on Pathology of laboratory animals. En: Jones TC, Hard GC, Mohr U, editores. Urinary system. Induction of cancer in the rat bladder: Pathogenesis, role of cell proliferation, and relevance to human disease. 2ª edición. Nueva York: Springer; 1998.p.420-426.
6. Shirai T, Yoshiki T, Itoh T. Synthesis of alpha-fetoprotein by human yolk sac tumor transplanted into nude mice. *Gan.* 1977;68(6):847-849.
7. Frith CH, Eighmy JJ, Fukushima S, Cohen SM, Squire RA, Chandra M, editores. Guide for Toxicol Pathol. Proliferative lesions of the lower urinary tract in rats. Washington: STP/ARP/AFIP; 1995.p.1-13.
8. Kunze E, Chowanec J. Pathology of tumors in laboratory animals. Tumors of the rat. Tumors of the urinary bladder. *IARC Sci Publ.* 1990;99:345-397.
9. Clayson DB, Fishbein L, Cohen SM. Effects of stones and other physical factors on the induction of rodent bladder cancer. *Food Chem Toxicol.* 1995;33(9):771-784.
10. Cohen SM. Cell proliferation and carcinogenesis. *Drug Metab Rev.* 1998;30(2):339-357.
11. Deerberg F, Rehm S, Jostmeyer HH. Spontaneous urinary bladder tumors in DA/Han rats: A feasible model of human bladder cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1985;75:1113-1121.
12. Wolf JC. Characteristics of the spectrum of proliferative lesions observed in the kidney and urinary bladder of Fischer 344 rats and B6C3F1 mice. *Toxicol Pathol.*

- 2002;6:657-662.
13. Boorman GA. Animal model of human disease: Carcinoma of the ureter and urinary bladder. *Am J Pathol.* 1977;88:251-254.
 14. Russell PJ, Jingsley EA. Bladder Cancer Biology, diagnosis and management. En: Syrigos NK, Skinner DG, editores. *Animal models for the study of bladder cancer.* Nueva York: Oxford University Press; 1999.p.71-95.
 15. Raghavan D, Debruyne F, Herr H, Jocham D, Kakizoe T, Okajima E, et al. En: Alan R, editor. *Developments in bladder cancer. Experimental models of bladder cancer: A critical review.* Nueva York: Liss Inc; 1986.p.171-208.
 16. Cohen SM. Urinary bladder carcinogenesis. *Toxicol Pathol.* 1998;26:121-127.
 17. Clayton DB. Editorial: Bladder carcinogenesis in rats and mice: Possibility of artifacts. *J Natl Cancer Inst.* 1974;52:1685-1689.
 18. Jaffe V, Alexander B, Price AB, Zanelli GD. The induction of bladder cancer in portally diverted rats. *Br J Cancer.* 1992;66:470-473.
 19. Ito N, Hiasa Y, Tamai A, Okajima E, Kitamura H. Histogenesis of urinary bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine in rats. *Gan.* 1969;60:401-410.
 20. Severs NJ, Barnes SH, Wright R, Hicks RM. Induction of bladder cancer in rats by fractionated intra-vesicular doses of N-methyl-N-nitrosourea. *Br J Cancer.* 1982;45:337-351.
 21. Kunze E, Schauer A, Schatt S. Stages of transformation in the development of N-butyl- transitional cell carcinomas in the urinary bladder of rats. *Z Krebsforsch Klin Onkol.* 1976;87:139-160.
 22. Oliveira PA, Palmeira C, Lourenço L, Lopes C. Evaluation of DNA content in pre-neoplastic changes of mouse urinary bladder induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. *J Exp Clin Cancer Res.* 2005;24:207-214.
 23. Janzowski C, Jacob D, Henn I, Zankl H, Poole-Zobel BL, Eisenbrand G. Investigations on organ-specific metabolism and genotoxic effects of the urinary N-nitrosodibutylamine (NDBA) and N-nitrosobutyl-4-hydroxybutylamine (4-OH-NDBA). *Toxicology.* 1989;59:195-209.
 24. Asanuma H, Arai T, Seguchi K, Kawauchi S, Satoh H, Kikuchi M, et al. Successful diagnosis of orthotopic rat superficial bladder tumor model by ultrathin cystoscopy. *J Urol.* 2003;169:718-720.
 25. Babaya K, Takahashi S, Momose H, Matsuki H, Sasaki K, Samma S, et al. Effects of single chemotherapeutic agents on development of urinary bladder tumor induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) in rats. *Urol Res.* 1987;15:329-334.
 26. Cohen AE, Weisburger EK, Weisburger JH, Ward JM, Putnam CL. Cystoscopy of chemically induced bladder neoplasms in rabbits administered the carcinogen dibutyl nitrosamine. *Invest Urol.* 1975;12:262-266.
 27. Hirose M, Fukushima S, Hananouchi M, Shirai T, Ogiso T. Different susceptibilities of the urinary bladder epithelium of animal species to three nitrous compounds. *Gan.* 1976;67:175-189.
 28. Bonfanti M, Magagnotti C, Bonati M, Fanelli R, Airoidi L. Pharmacokinetic profile and metabolism of N-nitrosobutyl-(4-hydroxybutyl) amine in rats. *Cancer Res.* 1988;48:3666-3669.
 29. Fukushima S. Carcinogenesis, urinary tract, rat. En: Jones TC, Hard GC, Mohr U, editores. *Monographs on Pathology of laboratory animals. Urinary system.* 2ª edición. Nueva York: Springer; 1998.p.375-380.
 30. Ito N. Early changes caused by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine in the bladder epithelium of different animal species. *Cancer Res.* 1976;36:2528-2531.
 31. Okajima E, Hiramatsu T, Hirao K, Ijuin M, Hirao Y, Babaya K, et al. Urinary bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine in dogs. *Cancer Res.* 1981;41:1958-1966.
 32. Arantes-Rodrigues R, Pinto-Leite R, Ferreira R, Neuparth MJ, Pires MJ, Gaivão I, et al. Meloxicam in the treatment of in vitro and in vivo models of urinary bladder cancer. *Biomed Pharmacother.* 2013;67:277-284.
 33. Tsuda H, Miyata Y, Hagiwara A, Hasegawa R, Shirai T, Ito N. Damage and repair of DNA in urinary bladder epithelium of rats treated with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. *Gan.* 1977;68:781-783.
 34. Oliveira PA, Pires MJ, Nobrega C, Arantes-Rodrigues R, Calado AM, Carrola J, et al. Technique of bladder catheterization in female mice and rats for intra-vesical instillation on models of bladder cancer. *Scand J Lab Anim Sci.* 2009;36:5-9.
 35. Airoidi L, Magagnotti C, Bonfanti M, Fanelli R. Alpha-oxidative metabolism of the bladder carcinogens N-nitrosobutyl(4-hydroxybutyl)amine and N-nitrosobutyl(3-carboxypropyl)amine within the rat isolated bladder. *Carcinogenesis.* 1990;11:1437-1440.

36. Okada M, Suzuki E. Metabolism of butyl (4-hydroxybutyl) nitrosoamine in rats. *Gan.* 1972;63:391-392.
37. Okada M, Suzuki E, Anjo T, Mochizuki M. Mutagenicity of alpha-acetoxy-dialkyl nitrosamines: Model compounds for an ultimate carcinogen. *Gan.* 1975;66:457-458.
38. Cohen SM. Comparative pathology of proliferative lesions of the urinary bladder. *Toxicol Pathol.* 2002;30:663-671.
39. Oliveira PA, Colaco A, De la Cruz LF, Lopes C. E-cadherin expression during urothelial carcinogenesis induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine in rats. *J Exp Clin Cancer Res.* 2006;25:425-432.
40. Oliveira PA, Palmeira C, Colaco A, de la Cruz LF, Lopes C. DNA content analysis, expression of Ki-67 and p53 in rat urothelial lesions induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine and treated with Mitomycin C and Bacillus Calmette-Guerin. *Anticancer Res.* 2006;26:2995-3004.
41. Jull JW. The effect of time on the incidence of carcinomas obtained by the implantation of paraffin wax pellets into mouse bladder. *Cancer Lett.* 1979;6:21-25.
42. Huland H, Otto U, von Paleske A. Chemotherapy and human bladder carcinoma transplanted into NMRI nu/nu mice. *J Urol.* 1985;134:601-606.
43. Oliveira PA, Arantes-Rodrigues R, Sousa-Diniz C, Colaço A, Lourenço L, De la Cruz P LF, et al. The Effects of sirolimus on urothelial lesions chemically induced in ICR Mice by BBN. *Anticancer Res.* 2009;29(8):3221-3226.
44. Vasconcelos-Nóbrega C, Colaço A, Santos L, Vala H, Palomino LF, Lopes C, et al. Experimental study of the anticancer effect of gemcitabine combined with sirolimus on chemically induced urothelial lesions. *Anticancer Res.* 2011;31:1637-1642.
45. Vasconcelos-Nóbrega C, Pinto-Leite R, Arantes-Rodrigues R, Ferreira R, Brochado P, Cardoso ML, et al. *In vivo* and *in vitro* effects of RAD001 on bladder cancer. *Urol Oncol.* 2013;31:1212-1221.