

# INDUCCIÓN DE CÁNCER DE MAMA EN RATAS: QUIMIOPREVENCIÓN E INMUNOMODULACIÓN

## Induction of Mammary Cancer in Rats: Chemoprevention and Immunomodulation

Marisela Corzo<sup>1</sup>, Sergio Rivera<sup>2</sup>, Tania Romero<sup>1</sup>, María E. Viloria<sup>1</sup>, Jesús Camacho<sup>2</sup> y José Núñez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Medicina. <sup>2</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias.

Universidad del Zulia, Apartado 526. Maracaibo, Edo. Zulia, Venezuela

### RESUMEN

El modelo de cáncer de mamas inducido por el 7-12 dimetil benz(a) antraceno (DMBA) en ratas, muestra un conjunto de propiedades que lo hacen sumamente útil para el estudio y comprensión del cáncer de mama en humanos. La quimiopreención consiste en el uso de productos farmacológicos o nutrientes no citotóxicos capaces de potenciar los mecanismos fisiológicos intrínsecos, inmunológicos o no, los cuales protegen al organismo del desarrollo y progresión de tumores. Existen estudios in vivo e in vitro demostrando que los retinoides regulan el crecimiento del cáncer mamario. La asociación de retinoides con citocinas se ha utilizado como terapia anticancerosa sobre todo en combinación con interferones. La IL-10 es una citocina cuyas concentraciones están elevadas en pacientes con cáncer. Su acción sobre las células NK pudiera estar relacionada con su actividad antitumoral. En este estudio se utilizó el modelo de inducción de cancer de mama con DMBA en ratas Sprague Dawley, hembras vírgenes de 35 días de edad con o sin terapia quimiopreventiva de ácido retinóico (AR), para evaluar la aparición o no de tumores de mama, tiempo, número y características histopatológicas. Igualmente se hizo una medición de la IL-10 antes y después de la aparición de los tumores para estudiar su posible relación con este proceso. Durante un lapso de nueve (9) meses, sólo se observaron tumores mamaros en las ratas que no recibieron previamente el AR o sea en aquellas que ingirieron exclusivamente DMBA. Los tumores se presentaron después de los 4 meses en número de uno o dos como máximo, con ubicación preferiblemente torácica, aún cuando pudieron ser observados en la región inguinal y rara vez abdominal.. El tamaño máximo alcanzado por los tumores fue de 5x4x3 cm. El carcinoma papilar ductal infiltrante y el carcinoma cribiforme con áreas de patrón adenoide quístico fueron las dos formas de carcinomas

detectadas en el examen histopatológico. La concentración de IL-10 promedio en suero de ratas no tratadas fue de 26 pg/mL (rango 17 - 34). Las ratas tratadas con AR mostraron un aumento significativo de la IL-10 y ninguna desarrolló tumores de mama. El AR actuó como quimiopreventivo con un 100% de efectividad asociado a un incremento significativo de la IL-10 lo cual, refuerza las observaciones previas pudiendose inferir, que la activación de células NK sea uno de los mecanismo antitumorales probables implicados en este modelo.

**Palabras clave:** Rata, cáncer, quimiopreención, inmunomodulación, ácido retinóico, DMBA, IL-10.

### ABSTRACT

The model of 7-12 dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) induced mammary cancer in rats, shows a group of properties that they make it extremely useful for the study and understanding of the human mammary cancer. The chemoprevention consists in the use of pharmacologic or nutritious products not cytotoxic capable of increase the physiologic intrinsic mechanisms, immunologic or not, which protect to the organism of the development and progression of tumours. Studies exist in vivo and in vitro demonstrating that the retinoids regulate the growth of the mammary cancer. The association of retinoids with cytokines has been utilized anticancerous therapy above all in combination with interferons. The IL-10 is a cytokine whose concentrations are elevated in patient with cancer. Their action on the NK cells could be related with their activity anti-tumoral. In this study was utilized the model of induction of mammary cancer with DMBA in rats Sprague Dawley, female virginal of 35 old days with or without chemoprevent therapy of retinoic acid (RA), in order to evaluate the apparition or not of mammary tumours, time, number and histopathological characteristic. We are carried out a mensuration of the IL-10 before and after the apparition of the tumours in order to study their possible relationship with this process. During a lapse of nine



(9) months, mammary tumours in the rats were only observed that they didn't receive the RA previous that is to say in those that ingested exclusively DMBA. The tumours were formed after the 4 months in number of one or two like maximum, with location in thorax preferably still when they could be observed inguinal and rare abdominal time in the region. The maximal size reached by the tumours was from 5x4x3 cm. The ductal papillar carcinoma with infiltration and the cribiform carcinoma with areas of adenoid cystic pattern. They were the two types of carcinomas detected in the histopathological exam. The concentration of IL-10 average in serum of rats not tried it was from 26 pg/ mL (range 17-34). The rats had dealings with RA showed a significant increase of the IL-10 and any of them developed mammary tumours. Yet when the number of tumours, frequency of location and the time of apparition differs of the it reportado, they coincide the apparition of mammary carcinomas in rats had dealings with DMBA. The RA acted like chemopreventive with a 100% of efectivity associated to an increment significant of the IL-10, which increase the previous observations could be inferred that the activation of NK Cells is one of the anti-tumoral mechanisms probable implicated in this model.

**Key words:** Rat, cáncer, chemoprevention, immunomodulation, rethinoic acid, DMBA, IL-10

## INTRODUCCIÓN

El modelo de inducción de cáncer mamario en ratas con dimetilbenz(a) antracene (DMBA) presenta varias propiedades que pueden ser utilizadas para el estudio del cáncer de mamas en humanos. El mismo es muy práctico y facilita enormemente el trabajo experimental. Es obvio que el resultado no va a ser el mismo en las dos especies. La generación de las lesiones cancerígenas difieren es su totalidad al comparar lo que ocurre con la aparición natural en humanos y la experimental inducida en animales. Sin embargo, el modelo animal resulta necesario por todas las manipulaciones experimentales que difícilmente podrían ser realizadas en el humano [7].

La quimiopreención del cáncer es una nueva rama de la investigación clínica. Puede definirse como el uso de productos farmacológicos ó nutrientes no citotóxicos, cuyo objetivo es potenciar los mecanismos fisiológicos intrínsecos inmunológicos y no inmunológicos que protegen al organismo ante el desarrollo y progresión de clones mutantes de células malignas [20]. Este proceso intenta bloquear el inicio del proceso carcinogénico, con agentes que impiden la activación de mutágenos ó su posterior unión al ADN.

La quimiopreención se diferencia de la quimioterapia citotóxica aplicada en cánceres invasivos, en que esta última intenta deliberadamente destruir las células cancerosas en cambio la quimiopreención intenta detener o revertir la progresión de células premalignas antes de que lleguen a ser invasivas o

metastásicas. Su ventaja sobre la terapia citotóxica, es la ausencia de efectos adversos sobre las células sanas durante el largo período de latencia característico de la mayoría de cánceres [35].

La alarmante progresión de cáncer mamario a nivel mundial en mujeres en edades cada vez más tempranas, justifica cualquier esfuerzo que aporte conocimientos en relación a la prevención y terapéutica neoplásica con derivados ácidos del Retinol [16]. Existen investigaciones que han demostrado el efecto quimiopreventivo de los constituyentes de una dieta normal como: Betacarotenos, Vitamina A [23], y ciertos retinoides sintéticos como All-trans-RA y N -(4 hydroxy phenyl retinamida) [27,28].

El Retinol (Vitamina A) se relaciona normalmente con el mecanismo fotorreceptor de la retina, síntesis de glicoproteínas, estabilidad lisosómica e integridad de los tejidos epiteliales [20]. Se conocen una variedad de isómeros naturales y sintéticos del retinol entre los cuales se encuentran el All-trans-RA, 13-cis RA y 9 -cis RA [3, 22]

Normalmente los retinoides son reguladores biológicos del desarrollo embrionario y del crecimiento epitelial ordenado [11], mantienen la integridad [20] y propiedades de diferenciación del tejido epitelial adulto a través de varios mecanismos [4] entre los que se incluyen la autoregulacion de sus concentraciones séricas [34].

El retinol y sus derivados como el ácido retinoico son absorbidos por el tracto gastrointestinal, pasa a la circulación unidos a proteínas y entra a la célula por difusión simple, pudiendo ser metabolizado por enzimas localizadas por el retículo endoplásmico liso, alternativamente el ácido retinoico y sus isómeros pasan al núcleo celular y se unen a los receptores del Ácido Retinoico (RA:alfa,beta y gamma) o los (RXR:alfa, beta y gamma) [2], formando heterodímeros (infrecuentes) y homodímeros (frecuentes). Los homodímeros se forman con la unión del ácido retinoico contiguos, activando el proceso de transcripción de genes para la respuesta a los retinoides. Esto permite una serie de eventos en los que se incluyen un aumento en la actividad de la transglutaminasa, asociada a la apoptosis [21], un incremento de la expresión de un miembro de la familia del factor transformante del crecimiento beta 1, el cual inhibe la carcinógenesis y permite la regresión de tumores epiteliales entre ellos el de mama [21].

Existen estudios in vivo e in vitro que demuestran que los retinoides regulan el crecimiento del cáncer mamario [24, 25], neuroblastomas, melanomas [18] entre otros. Así mismo inhibe la angiogénesis proceso conocido como neovascularización que es esencial para el crecimiento progresivo de tumores sólidos [37].

La asociación de retinoides con citocinas se ha utilizado como terapia anticancerosa sobre todo en combinacón con interferones. Con esta terapia se ha encontrado una potencia-



ción en la maduración de células epiteliales, con el fin de obtener efectos sinérgicos con baja toxicidad [20].

En cuanto a la determinación de los niveles séricos de la interleucina 10 (IL-10), se han reportado en la literatura internacional, referencias que demuestran un incremento de esta interleucina en pacientes con diferentes tipos de cáncer [9]. Estos datos tienen importantes implicaciones en el monitoreo inmunológico y en la evolución de la terapéutica antineoplásica.

Las citocinas son proteínas solubles cuya acción se realiza a través de receptores específicos sobre la célula blanco y son secretadas transitoriamente por linfocitos monocitos-macrófagos y otras células (queratinocitos, fibroblastos, etc), en respuesta a estímulos activadores [1]. Se ha observado también la secreción espontánea por las células tumorales [30]. La Interleucina-10 es una potente citocina inmunoreguladora que inhibe la actividad de las células T cooperadoras (Th1) con disminución de la Interleucina-2 e interferón gamma, y estimula otras funciones como la actividad agresora Natural (NK, por sus siglas en inglés "Natural Killer") la cual previene contra tumores y células infectadas por virus [28]. Además, estimula la producción de los anticuerpos de la subclase Ig G1, los que se unen a los antígenos tumorales, esta interacción permite el acoplamiento de los receptores de las células NK a la porción Fc de las moléculas de las inmunoglobulinas, determinando la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) [1]. Existen estudios en muridos con cáncer de mama que han demostrado el efecto antitumoral y antimetastásico de la IL-10 al transfectar plásmidos con ó sin IL-10 a líneas celulares tumorales para posterior inoculación en animales de experimentación inmunocompetentes e inmunocomprometidos. Cuando fueron administrados los inóculos que contenían IL-10, se inhibió completamente el crecimiento tumoral en los inmunocompetentes, no sucediendo lo mismo cuando eran utilizados inóculos carentes de IL-10. En el caso de los inmunocomprometidos cuando se administró el inóculo con IL-10 el crecimiento tumoral fue menor al compararlo con el de los animales que fueron sometidos a la acción de las células tumorales sin IL-10, desarrollando estos últimos animales metástasis pulmonares y muerte a los 40-50 días postinóculo [8].

Se considera relevante en esta investigación el uso del ácido retinoico, como tratamiento preventivo en cáncer de mama experimental, ya que estimula la actividad NK [21] e inhibe el crecimiento tumoral entre otros mecanismos [29, 30].

En este trabajo fue evaluado el desarrollo de tumores mamarios inducidos por el 7-12 dimetil benz(a) antraceno (DMBA) en ratas con y sin tratamiento previo de ácido retinoico, desde el punto de vista histopatológico e inmunológico. Igualmente, se determinó el efecto preventivo del Ácido Retinoico en ratas tratadas con este carcinógeno químico DMBA, tomando en consideración la aparición y evolución de los tumores, su estudio histopatológico así como la medición de las

concentraciones séricas de la IL-10 antes, durante y después, para establecer patrones y grados de asociación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Grupos estudiados

Se conformaron 3 grupos de estudios: A, B y C con un total de 24 ratas hembras vírgenes Sprague Dawley (SD) de 35 días de edad con un peso entre 100 y 150 gr. Al grupo A y C pero no al B se les administró tratamiento preventivo con Ácido retinoico (AR All trans) (Vesanoide Laboratorio Hofmann Roche) a una dosis de 3mg/kg/día intragastricamente durante 30 días consecutivos. Al grupo A y B pero no al C se le indujo cáncer de mama con 7-12 Dimetil Benz(a) antraceno DMBA (Easman Organic Chemical, NY) a razón de 8 mg/100grs de peso, una sola dosis intragastrica, una semana después de haber culminado la terapia con ácido retinoico, a los 70 días de edad, cuando los animales pesaban entre 187 y 213 gr.

### Recolección de suero

**Recolección de las muestras de suero:** A todos los grupos se les extrajo 1mL de sangre tomada de la cola del animal con aguja de tuberculina. Las muestras fueron denominadas como: M1; antes de iniciado el tratamiento con ácido retinoico (AR), M2; 30 días posterior al mismo con AR, M3; tomada 60 días posterior a la aplicación del carcinógeno DMBA, M4; 120 días de la aplicación del DMBA y M5; últimas muestras tomadas a los nueve meses de iniciado el experimento previo al sacrificio.

M1= día 0, M2= día 30, M3= día 90, M4= día 150 Y M5= día 270 del inicio del experimento, FIG. 1.

El suero fue separado de la muestra de sangre periférica tomada en tubo seco, por centrifugación a 1000xg durante 10 minutos. Posteriormente, se repartieron en alícuotas colocadas en tubos plásticos (Eppendorf) y transportados en hielo para su almacenamiento a -70°C, hasta su análisis.

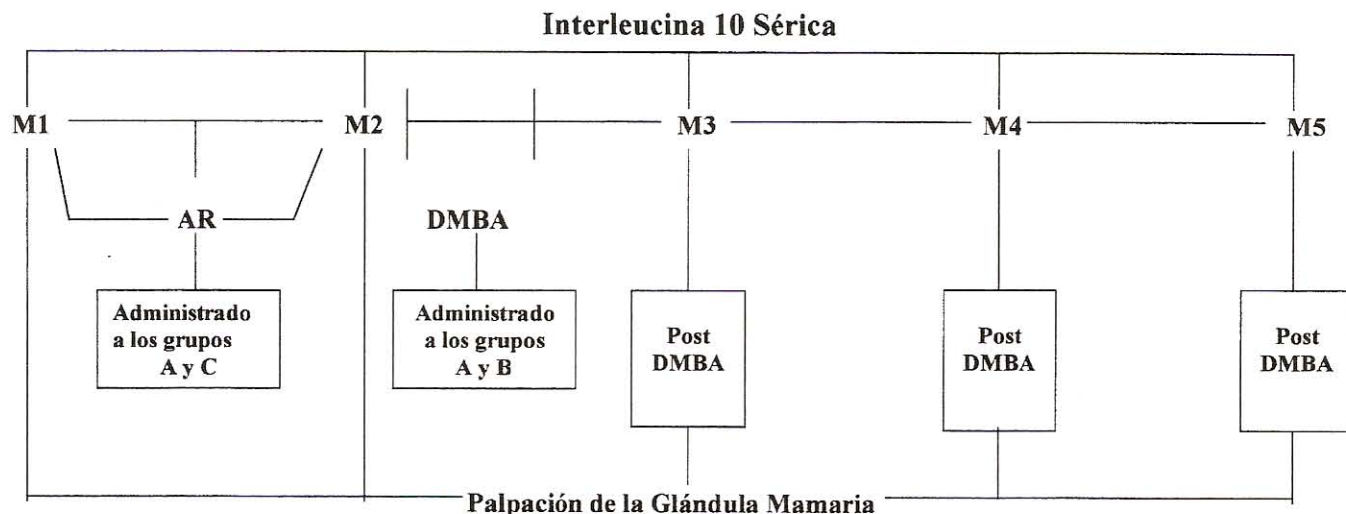
### Análisis de las muestras de suero

Técnica de Inmunoanálisis Enzimático (ELISA) de doble anticuerpo para la determinación de Citocinas: IL-10 (MOUSE ELISA IL-10 ENDOGEN INTERLEUKIN-10) N° de lote kit: 013176.

### Evaluación del crecimiento tumoral por palpación

Posterior a la administración del cancerígeno DMBA a los grupos A y B, todos los animales incluso los del grupo C fueron palpados en la región inguino abdominal bisemanal, para detectar cualquier masa tumoral, tomando los siguientes parámetros: tiempo de aparición, número de tumores, tamaño (3 medidas) durante 28 semanas consecutivamente. La evaluación fue realizada siempre por el mismo individuo.





**FIGURA 1. ESQUEMA CRONOLÓGICO EN LA QUIMIOPREVENCIÓN CON ALL TRANS AR EN CÁNCER DE MAMA EXPERIMENTAL. MUESTRAS TOMADAS A TODAS LAS RATAS: M1: TOMADA AL INICIO DEL EXPERIMENTO M2: TOMADA DESPUÉS DE 30 DÍAS M3: TOMADA DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DEL DMBA 90 DÍAS M4: TOMADAS DESPUÉS DE ADMINISTRADO EL DMBA 150 DÍAS M5: TOMADA A LOS 270 DÍAS.**

**TABLA I**  
**EVOLUCIÓN Y ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LA GLÁNDULA MAMARIA EN LOS GRUPOS BAJO ESTUDIO**

Tratamiento	Grupos		
	A (AR+DMBA) N=8	B8DMBA) N = 7	C(AR) N = 9
Nº de Tumores/Rata	-	1 a 4 tumores	-
Tiempo de Aparición	-	4 a 5 meses luego del DMBA	-
Estudio Histológico	Glándula mamaria normal	Carcinoma papilar ductal infiltrante Carcinoma cribiforme con áreas de patrón adenoide quístico	Glándula mamaria normal

AR= AB Trans Ácido Retinoico DMBA= 7-12 Dimetil Benz (a) Antraceno

### Sacrificio de todos los animales de los grupos A, B y C

Todos los animales fueron sacrificados a las 36 semanas después de haber iniciado el experimento, es decir a los 10 meses de edad de las ratas.

Al momento del sacrificio se les indujo anestesia y se procedió a la extracción del tejido mamario de la región inguinal abdominal. Las muestras fueron fijadas inmediatamente en formol neutro tamponado al 10% durante 18-24 horas, para su estudio histopatológico por técnicas tradicionales.

### RESULTADOS

En la TABLA I se presentan los resultados de las ratas que desarrollaron tumores. Los animales de experimentación del grupo A (n=8), los cuales recibieron tratamiento preventivo con AR y posteriormente DMBA tenían glándulas mamarias normales al momento del sacrificio (10 meses de edad), no presentando evidencias macroscópicas o microscópicas de tumores. El grupo C, constituido por 9 ratas a las que sólo se les

administró AR por 30 días, mostraron también glándulas mamarias normales sin evidencias histológicas de tumores, FIG. 2.

El grupo B, conformado por 7 ratas que sólo recibieron DMBA, desarrollaron Adenocarcinomas infiltrantes a partir de los 4 meses de la inducción con el carcinogénico.

En la TABLA II, se detallan: el tiempo de aparición de los tumores, la cantidad detectados en cada animal, su localización y tamaño promedio. Se pudo observar que la mayoría aparecieron 4 a 5 meses posterior a la aplicación del carcinogénico. Fueron observados máximo 2 tumores por rata. Su localización era principalmente torácica, menos frecuentemente inguinal y rara vez abdominal.

El tamaño máximo alcanzado fue de 5x4x3 cm, con localización torácica. Macroscópicamente, la mayoría de los tumores reportados fueron provenientes de glándula mamaria toraco abdominal o inguinal derecha, caracterizados por ser únicos o múltiples, de aspecto nodular con áreas pálidas delimitados por una delgada cápsula fibrosa bien vascularizada,





**FIGURA 2. GLÁNDULA MAMARIA NORMAL. LAS FLECHAS LA RED DUCTOS MAMARIOS BIEN CONFORMADOS CON NORMALIDAD DE SU EPITELIO. TODOS ELLOS SE ENCUENTRAN INMERSOS EN UN ESTROMA DE TEJIDO CONECTIVO DENSO COLAGENIZADA (C).**

**TABLA II  
CARACTERÍSTICAS DE LOS TUMORES DEL GRUPO B**

Rata con Tumores	Tiempo de Aparición de Tumores	Nº de Tumores por Animal	Localización						Tamaño Promedio
			Torácica		Abdominal		Inguinal		
			D	I	D	I	D	I	
R2	4 meses post DMBA	1	X						2x1.8x1 cm
R3	4 meses post DMBA	2	X					X	1.75x1.25x0.75 cm
R4	4 meses post DMBA	1	X						1x2x0.5 cm
R5	4 meses post DMBA	2	X						5x4x3 cm
R7	4 meses post DMBA	2	X					X	1.45x1.375x1.075 cm
R9	4 meses post DMBA	2	X			X			1.25x1.4x0.5 cm
R10	4 meses post DMBA	1	X					X	0.9x1.2x1.5 cm

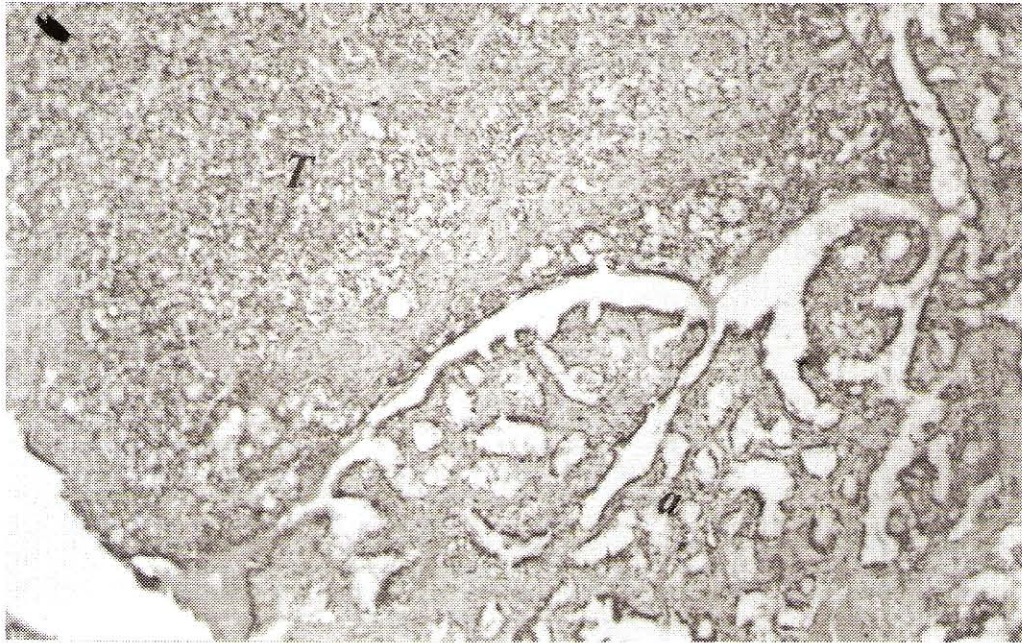
violáceas, algunos sésiles adheridos a planos profundos. Al corte, algunos mostraron áreas ulceradas con necrosis central y contenido piohemorrágico.

Al microscopio, las glándulas mamarias estaban ocupadas por neoplasias de origen epitelial, con pérdida de la histoarquitectura. La neoplasia estaba constituida por células con núcleos hipercrómicos, pleomórficos, con moderada cantidad de mitosis atípica rodeados por citoplasma autofílico de bordes bien definidos. Las células tumorales estaban dispuestas en nidos sólidos, cordones y estructuras glanduliformes, algunas de aspecto quístico infiltrando el estroma circundante en el cual se pudo apreciar moderado infiltrado linfoplasmocitario, FIG. 3.

Se observaron principalmente dos tipos de tumores. El carcinoma papilar ductal, bien diferenciado, ulcerado e infiltrante en el cual, los cortes histológicos de glándula mamaria

mostraron neoplasia maligna de origen epitelial, con una notable pérdida de la configuración morfológica del sistema de ductos y acinos mamarios. Las estructuras ductales mostraron células pleomórficas con rasgos de anisocitosis y anisocariosis, pérdida de la polaridad, moderado índice de mitosis atípica, citoplasma eosinófilo denso, con escasas vacuolas e ciertas zonas. Estas células adquirían una configuración papilar sustentadas en pedículos estrechos ubicados en el ducto principal. En otras zonas existían estrechas cavitaciones quísticas con tendencia a organizarse en estructuras glanduliformes. El estroma mostraba infiltración por células tumorales aunque sin evidencias de penetración vascular. En las áreas de hemorragia existía discontinuidad epitelial por ulceración hemorrágica con infección sobreañadida e infiltrado linfoplasmocitario en cantidad moderada, FIG. 4.





**FIGURA 3. CARCINOMA INFILTRANTE DE GLÁNDULA MAMARIA. SE OBSERVAN CÉLULAS TUMORALES FORMANDO MASAS SÓLIDAS QUE OBLITERAN TOTALMENTE UN DUCTO (T). EN OTRAS ÁREAS SE ORGANIZAN ADOPTANDO UN PATRÓN PAPILAR O RAMIFICADO POR REDES ANASTOMÓTICAS (a).**

El carcinoma cribiforme con áreas de patrón adenoide quístico, neoplasia maligna de origen epitelial evidenció una notable desorganización y pérdida de ductos y acinos. El epitelio ductal mostró células atípicas aunque bien diferenciadas, pleomórficas con rasgos de anisocariosis y anisocitosis, pérdida de la polaridad, mitosis atípicas escasas, citoplasma grueso acidófilo, núcleos vesiculosos prominentes con cromatina laxa regular. Algunos ductos mostraron proliferación con tendencia a formar estructuras glandulares con dilatación quística rodeado por tejido conectivo periductal, infiltrado por células neoplásicas previamente descritas. Los espacios quísticos mostraron contenido eosinófilo denso que pudiera corresponder a proteína coagulada, FIG. 5.

En la TABLA III, se aprecian los niveles séricos de la IL-10 en la primera muestra de suero (M1);  $27.0 \pm 7.3$  pg/mL para el grupo A,  $17.3 \pm 4.3$  pg/mL para el grupo B y  $34.3 \pm 3.2$  pg/mL para el grupo C, representando las concentraciones basales para esta citocina en el grupo de ratas evaluadas, previo al tratamiento.

En la segunda muestra sérica (M2), tomada 30 días después de la primera y, posterior al tratamiento durante el mismo lapso con el Ácido Retinoico, se observaron concentraciones de IL-10 de:  $87.1 \pm 15.5$  para el grupo A,  $55.5 \pm 5.1$  para el grupo B y  $161,61 \pm 33,1$  para el grupo C, esta última, diferente significativamente del grupo B ( $P < 0.01$ ).

En el grupo A, la mayor concentración de IL-10 se obtuvo en la tercera toma (M3) observándose diferencias significativas con las tomas 1, 4 y 5. En el grupo B, hubo diferencias significativas entre la 2da y 3ra toma con respecto a las tomas

1, 4 y 5. El grupo C presentó valores de IL-10 en M2, superiores con significancia estadística ( $P < 0.01$ ) al grupo B y con niveles por encima de los valores observados para las tomas 1, 3, 4 y 5 ( $P < 0.001$ ). En este grupo C, el pico se obtuvo en esta 2da toma (M2).

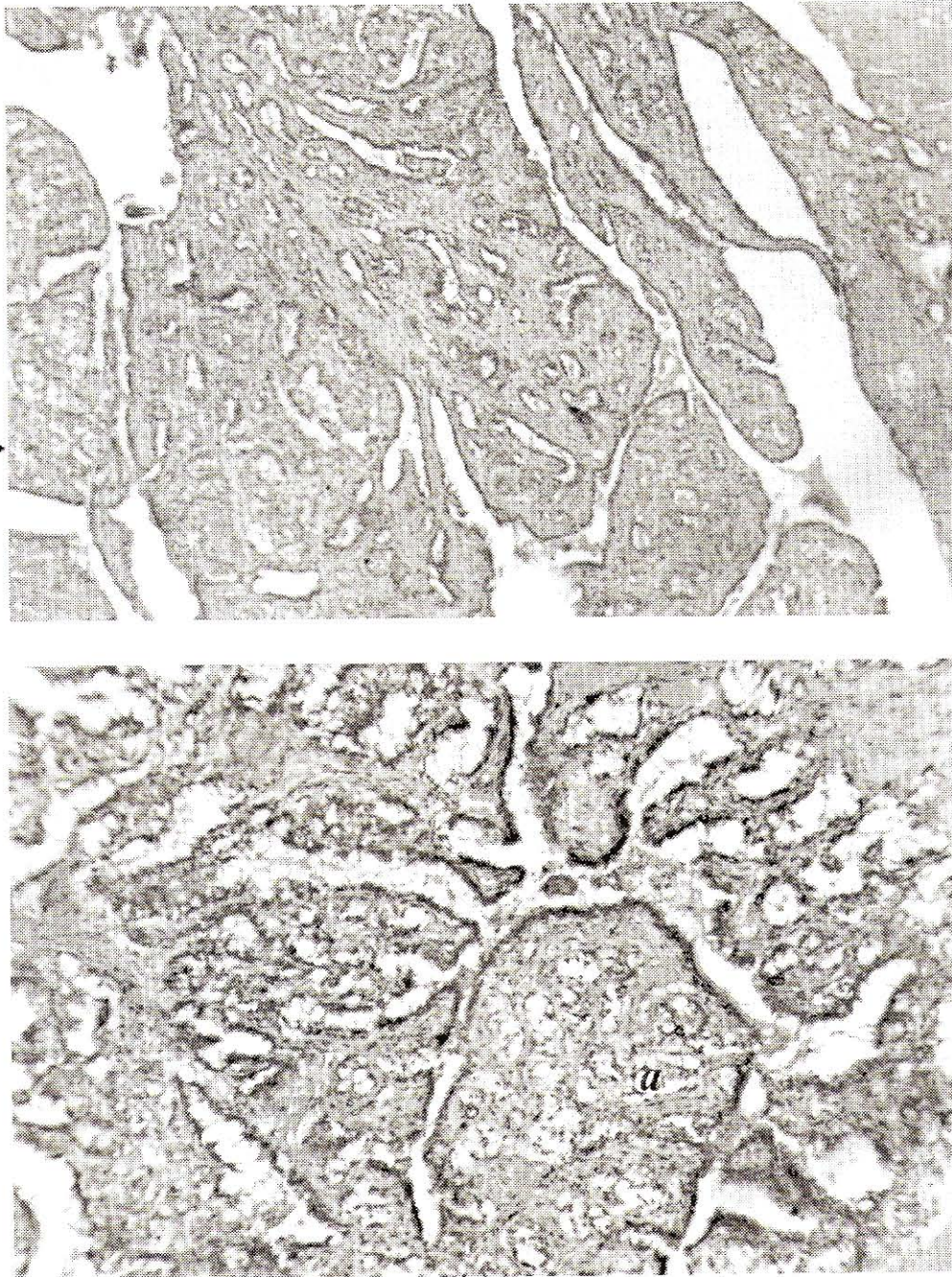
En los tres grupos (A,B y C) se observó una disminución importante de la concentración media de la IL-10 en la toma 4 (M4) por debajo de los niveles de la M1. Las concentraciones basales se recuperaron en su totalidad en la última toma (M5), FIG. 6.

## DISCUSIÓN

La aplicación del DMBA en ratas Sprague Dawley hembras, mayores de dos meses de edad y a dosis de 8 mg./100 grs. de peso, vía oral, indujo cáncer en mamas a partir de los cuatro meses de edad en el 100% de los animales inoculados. Cifras del 70 al 100% han sido previamente reportadas utilizando dosis únicas de 20 mg. en ratas hembras entre 50 y 55 días de edad con pesos entre 150 y 200 g [6,10,13,14]. El tiempo de aparición reportado para los primeros nódulos va de 28 a 49 días y en algunos casos pueden aparecer entre los 50 y los 60 días; algunos autores reportan que solo un pequeño porcentaje de ratas no desarrollan tumores entre los 150 y 240 días de edad [6, 10, 13, 14, 17, 26, 34].

Los tumores se presentaron únicos o dobles con localización principalmente torácica, toraco-abdominal, toraco-inguinal o simplemente inguinal, llegando a alcanzar volúmenes de hasta 5x4x3 cm. Una cantidad mayor de tumores (6 o 7) son





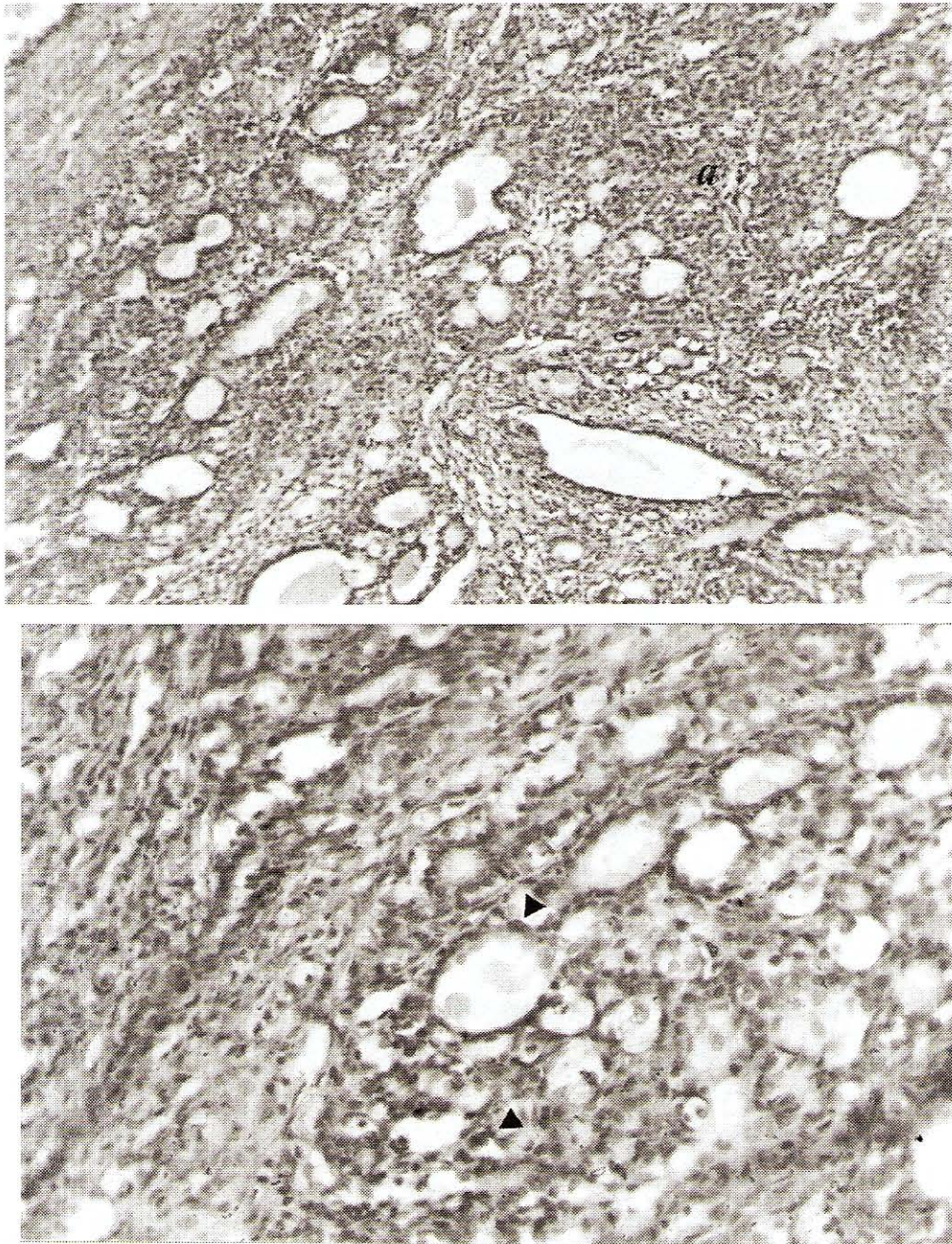
**FIGURA 4. CARCINOMA CRIBIFORME CON ÁREAS DE PATRÓN ADENOIDE QUIÍSTICO INFLITRANTE. ARRIBA, LOS DUCTOS MUESTRAN DILATACIÓN QUIÍSTICA RODEADOS DE UNA MASA HOMÓGENA DE CÉLULAS (a), QUE CONFORMAN NIDOS SÓLIDOS A NIVEL DE LAS ESTRUCTURAS ACINARES, CON UNA CLARA INVASIÓN DEL TEJIDO CONECTIVO PARIACINAR 10 X. ABAJO, IMAGEN A MAYOR AUMENTO QUE EVIDENCIA RASGO DE ANAPLASIA CON ANISOCARIOSIS Y ANISOCITOSIS, HIPERCROMATISMO CON PÉRDIDA DE LA POLARIDAD (FLECHAS) 200 X.**

reportados por animal en otras publicaciones [6, 13, 14]. Dosis menores de 20 mg por animal pudieran inducir tumores más pequeños y en períodos mas largos, lo que pudiera explicar el escaso número de tumores y el tiempo de aparición de 120 días en lugar de 60 en este trabajo.

La mayoría de los tumores reportados por inducción con el DMBA eran malignos de la glándula mamaria, principalmen-

te el adenocarcinoma ductal en su mayoría bien diferenciado [6, 10, 13, 14, 15, 32], coincidiendo con los hallazgos de este experimento. Sin embargo, se han reportado carcinomas de piel y mama [6, 13, 14], muy rara vez sarcomas, leucemias, carcinoma renal y lipoma retroperitoneal [14, 15]. Los autores coinciden en que los tumores benignos como los fibroadenomas y adenomas son mucho menos frecuentes que los adenocarcinomas [6,15].





**FIGURA 5. CARCINOMA PAPILAR DUCTAR INFILTRANTE DE GLÁNDULAS MAMARIAS. ARRIBA, IMAGEN DONDE SE EVIDENCIA EL ASPECTO ARBORESCENTE, EXCRESCENTE DEL EPITELIO PROLIFERANTE CON RASGOS DE ATIPLICIDAD. ABAJO, IMAGEN A MAYOR AUMENTO QUE MUESTRA PROLIFERACIÓN EPITELIAL MARCADAMENTE ATÍPICA EN UN GRAN DUCTO CON RAMIFICACIONES PAPILARES. EL EPITELIO MUESTRA VACUOLIZACIÓN, PLEOMORFISMO CELULAR Y UN INFLITRADO INFLAMATORIO MONONUCLEAR EN LE ESTROMA DE SUSTENTACIÓN (A) 200 X.**

Por lo general, la aparición de los adenocarcinomas se produce en pocas semanas post inducción [6, 14]. En las condiciones de este experimento no se presentaron antes de los 4 meses, posiblemente relacionado con la edad de los animales, la raza o la dosis de DMBA utilizada.

En el carcinoma inducido en ratas con DMBA, no se observaron metástasis. La presencia de metástasis es baja o

nula en trabajos anteriores, la mayoría de los autores no reporta esta patología [6, 15].

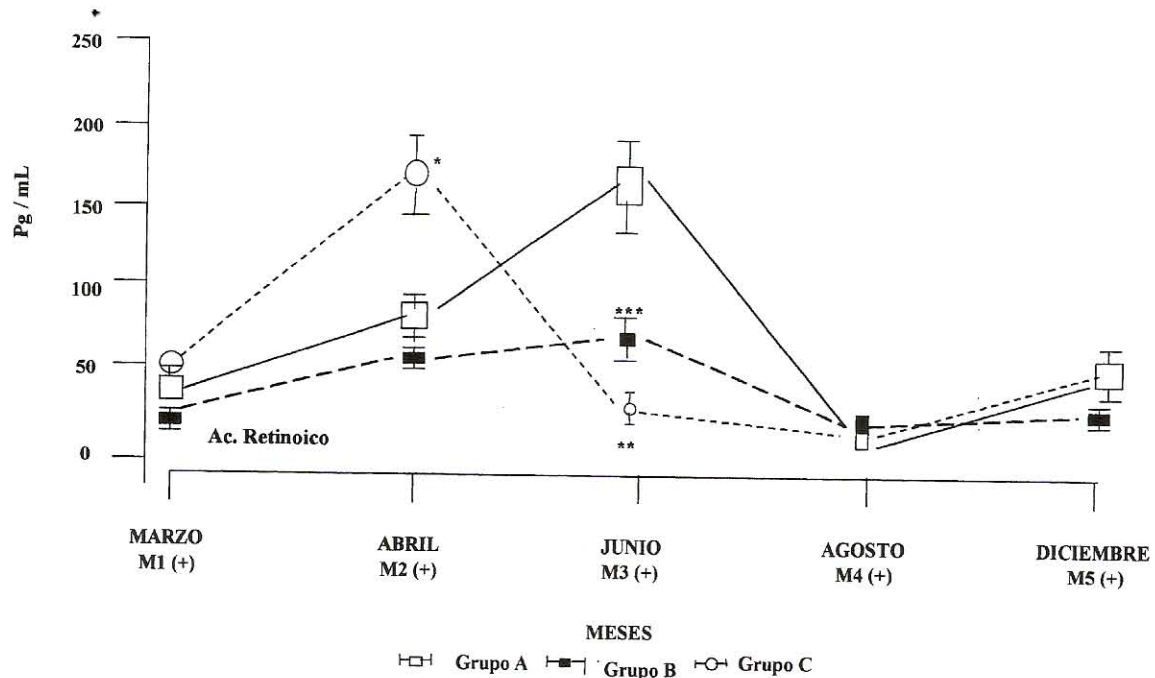
Este trabajo demostró que la utilización del retinoide: Ácido retinoico (AR All trans) previo a la administración del agente carcinogénico 7-12 Dimetil Benz(a) antraceno (DMBA), inhibe ven su totalidad, la aparición de tumores en estas ratas hembras vírgenes Sprague- Dawley, en un período de estudio



TABLA III  
CONCENTRACIONES SÉRICAS DE IL-10 EN GRUPOS DE BAJO TRATAMIENTO

Muestra	Grupos		
	A (AR+DMBA)	B (DMBA)	C (AR)
M1	27.0 ± 7.3	17.3 ± 4.3	34.3 ± 3.2
M2	87.1 ± 15.5 <sup>e</sup>	55.5 ± 5.1 <sup>f</sup>	161.1 ± 33.1 <sup>ag</sup>
M3	155.8 ± 33.4 <sup>d</sup>	71.3 ± 14.2 <sup>ef</sup>	32.8 ± 8.6 <sup>b</sup>
M4	10.9 ± 2.2	17.7 ± 2.3	16.1 ± 1.2
M5	30.3 ± 3.8	21.2 ± 4.9	31.5 ± 4.8

a) Diferente significativamente del grupo B (P<0.01) b) Diferente significativamente del grupo A (P<0.01) c) Diferente significativamente del grupo A (P<0.01) d) Diferente significativamente de las muestras 1, 4 y 5 (P<0.001) e) Diferente significativamente de la Muestra 4 (P<0.05) f) Diferentes significativamente de las Muestras 1, 4 y 5 (P<0.01) g) Diferentes significativamente de las Muestras 1, 3, 4 y 5 (P<0.00).



Grupo A: AR-ADBA Grupo B: DMBA Grupo C: AR.

\*Diferente significativamente del grupo B (P<0.01) \*\*Diferente significativamente del grupo A (P<0.01)

\*\*\*Diferente significativamente del grupo A (P<0.05) + Muestras 1, 2, 3, 4 y 5

FIGURA 6. CONCENTRACIONES SÉRICAS DE IL-10 EN LOS GRUPOS ESTUDIADOS.

de nueve (9) meses. La quimioprevención del cáncer con retinoides representa una alternativa importante capaz de revertir el proceso de carcinogénesis. Los retinoides son capaces de suprimir la promoción del tumor y modificar algunas propiedades de las células malignas totalmente transformadas probablemente a través de la represión o activación de genes específicos. Aproximadamente 1500 retinoides diferentes han sido sintetizados modificando su estructura de anillos, las cadenas laterales de la molécula para obtener una mayor eficacia y menos efectos colaterales. Uno de los análogos de la Vitamina A más estudiados en cáncer de mama es el (4-Hidroxyphenyl) retinamida (-4 HPR) con acumulación preferencial en mama en lugar del tejido hepático. Este compuesto ha sido estudiado extensivamente ya que presenta menos toxicidad génica [5].

El All-trans AR es un metabolito natural del retinól [36]. No se observaron en las ratas del estudio que recibieron con exclusividad el tratamiento preventivo de AR (grupo C), efectos secundarios dermatológicos, gastrointestinales, respiratorios, hepáticos o del SNC.

Los efectos del All-Trans AR han sido variables dependiendo de la dosis, del tipo de cáncer y su evolución. En la displasia cervical (NIC II) la respuesta al AR fue del 42% [12], revelando gran actividad en lesiones premalignas y resistencia en las malignas. Esta resistencia de los retinoides asociada a transformaciones malignas también ocurre en el epitelio bronquial. El All-Trans AR inhibe el crecimiento de las células epiteliales bronquiales normales pero las del cáncer de pulmón son resistentes a los efectos de la terapéutica. Existen pocos



estudios sobre la eficacia de los retinoides contra los tumores mamarios; Jonathan K y col. [16] señalan que el All-Trans AR retarda el crecimiento tumoral pero no reduce el tamaño del tumor, sin embargo otros retinoides como el 4 HPR si lo hace. Para Teelman y col. [36] ni el AllTrans AR ni el 13 Cis AR tienen actividad antitumoral en dosis que no fueron toleradas por los animales. Estos últimos resultados difieren de la presente investigación en la cual, la dosis utilizada fue tolerada por los animales y su eficacia fue del 100%.

Es necesario señalar, que los casos de toxicidad y deterioro de los animales que se reportan por los efectos del AR, se presentaron después de las 6 semanas de tratamiento con All-Trans AR. Quizás la falta de toxicidad del All-Trans AR en el presente estudio sea debido a que fue utilizado por 30 días como tratamiento preventivo. Los hallazgos obtenidos y la comparación con otros estudios permiten inferir que la quimioprevención con All-Trans AR pudiera ser mas efectiva que la terapéutica post desarrollo del cáncer de mama y la dosis utilizada más la duración del tratamiento, son parámetros a considerar en humanos para lograr prevenir el tumor y evitar los efectos adversos.

Actualmente existe cierta tendencia a la asociación de retinoides con citocinas para la quimioprevención del cáncer de mama y una de las más utilizada es el Interferón gamma [21]. Se consideró importante determinar las concentraciones séricas de la IL-10 como posible marcador para el monitoreo del crecimiento tumoral, mamario, sobre todo tomando en consideración los trabajos de Kund y col. [18] que demuestran la actividad antitumoral y antimetastásica de la IL-10 en cáncer de mama en modelo múrido.

La IL-10 es un polipéptido de 18 KD [38] identificado como un producto de los linfocitos Th2 que inhibe la producción de IL-2 e interferón gamma por células Th1 a través de su capacidad de disminuir la activación de Macrófago. Entre las células que expresan receptores para la IL-10 tenemos las células NK las cuales al ser activadas en forma autocrina por la citocina pueden, destruir células tumorales resistentes a NK en forma dependiente de la dosis [38]. Además las células NK secretan citocinas proinflamatorias al ser activadas por IL-2 e IL-10.

Al utilizar el tratamiento preventivo con Ácido Retinoico durante 30 días consecutivos se apreció un aumento de la IL-10 en los grupos A y C diferente significativamente de la concentración obtenida en el grupo B, tratado sólo con el carcinogénico DMBA. Este resultado demuestra que el tratamiento con AR aumenta la concentración de IL-10. Todos los animales del grupo B que tenían concentraciones séricas de IL-10 significativamente menor a las del grupo A, desarrollaron tumores de mama.

El DMBA posterior al tratamiento con AR, incrementó significativamente la concentración de la IL-10, evidenciado en la tercera toma (M3) para el grupo A. Con el DMBA solamente no se observó este estímulo. En el grupo C, los niveles de IL-

10 se autorregulan y presentan concentraciones cercanas a los valores controles a partir de la tercera toma. Al existir adicionalmente el estímulo con DMBA, el incremento de la IL-10 es mayor y perdura por más tiempo. Se aprecia una regulación de la IL-10 sérica en las ratas que recibieron solamente AR. Quizás esta diferencia podría ser explicada por la necesidad de los grupos DMBA-inducidos, de mantener niveles de la IL-10 superiores, tendientes a controlar el crecimiento tumoral. Es necesario recordar en esta investigación los variados mecanismos de acción del ácido retinoico que evitan el desarrollo tumoral como son: Apoptosis en células malignas, crecimiento epitelial ordenado, inhibición de la carcinogénesis y de la angiogénesis [39].

Se requieren otros estudios celulares prospectivos con células Natural Killer (NK) e IL-10. Se hace necesario evaluar la aplicación de IL-10 recombinante en ratas a las cuales se les induce cáncer para demostrar el incremento de la actividad NK en estos animales y su influencia en el desarrollo tumoral.

## CONCLUSIONES

El 7-12 dimetil benz (a) antraceno (DMBA) indujo la aparición de adenocarcinoma mamario en el 100% de las ratas con la aplicación de una sola dosis oral, a los cuatro meses de iniciado el experimento.

Se demostró que el Ácido Retinoico utilizado como quimioprevectivo durante 30 días, a la dosis de 3mg/kg/día previo a la inducción con DMBA, suprimió el desarrollo de cáncer de mama experimental en el 100% de los animales.

El incremento de la concentración de IL-10 en ratas, en las cuales se utilizó quimioprevención con AR, pudiera encontrarse asociado con la inhibición en el desarrollo de tumores de mama.

A las dosis de AR utilizadas, no se evidenciaron efectos colaterales

## RECOMENDACIONES

Se requieren estudios celulares que permitan medir la participación de la actividad NK y la influencia de la Interleucina 10 (IL-10) en el desarrollo de cáncer de mama experimental.

Es necesario la utilización de la IL-10 recombinante sola ó con Ácido Retinoico en la terapéutica de cáncer de mama experimental inducido por DMBA, para demostrar sus efectos en la evolución de la neoplasia.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABBAS, A.K; LICTMAN, A.H.; POBER, J.S.B. **Celula. Inmunología y Molecular**. Interamericana. McGraw-Hill segunda edición, Bogotá : 219-287, 1995.



- [2] BOYLAN, J.F.; LUFKIN, T.; CGUDAS, L.J. Targeted Disruption of retinoic acid Receptor Alpha (RAR alpha) and RAR gamma results in receptor specific Alterations in Retinoic Acid-mediated Differentiation and Retinoic Acid Metabolism. **Mol. Cell. Biol.** 15(2): 843-845. 1995
- [3] BREITMAN, T.R.; SELONICK, S.E.; COLLINS, S.J. Induction of Differentiation of the Human Promyelocytic Leukemia Cell line (HL-60) by Retinoic Acid. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 77:2936-3940. 1980.
- [4] CORNIC, M.; AGADIN, A.; DEGOS, L.; CHOMIENNE C. Retinoids and Differentiation Treatment: A Strategy for treatment in Cancer Anticancer Research Vol. 14(6): 2339-2346. 1994.
- [5] COSTA, A.; DE PALO, G.; DECENSI, A.; F. **Retinoids in Cancer Chemoprevention.** Istituto Nazionale Tumori, Milan, Italy. pp. 2133. 1993.
- [6] ESCRICH, E. **Efecto de un derivado androgénico sobre la inducción y el crecimiento de tumores mamarios experimentales.** Bellaterra Universidad Autónoma de Barcelona, 1985.
- [7] ESCRICH, E. Validity of the DMBA-Induced Mammary Cancer Model for the Study of Human Breast Cancer Int. **J. B. Markers** 2 (3): 197-206. 1987.
- [8] FORTIS, C.; FOPPOLI M.; GIANOTTI, L.; GALLI, L.; CITTERIO, G.; CONSOGNO, G.; GENTILLINI, O.; BRAGA, M. Increased interleukin-10 serum levels in patients with solid tumours. **Cancer Lett**, Jun 24, 104:1,1-5. 1996.
- [9] FRAKER, L.D.; HALTER, S.A.; FORBES, J.T. Growth Inhibition by Retinol of Human Breast Carcinoma Cell Line in vitro and in Athymic Mice. **Cancer Research** 44:5757-5763. 1984.
- [10] HEUSON, J.C.; LEGROS, N.; HEUSON-STIENNON, J.A.; LECLERQ, G.; PASTEELS, J.L. Hormone dependency of rat mammary tumours. In: Héuson JC, Mattejem WEH, Rozenzweig M, eds. Breast cancer: trends in research and treatment. New York: **Raven Press.** 81-93. 1976.
- [11] HSIEH, CHYL-SONG.; MACATONIA S.E.; TRIPP C.S.; WOLF STANLEY F.; MURPHY, K.M. Development of Th1 CD4+T Cells Through IL-12 Produced by Listeria-Induced Macrophages **Science** 260 (5107): 547-549. 1993.
- [12] HUANG, M.; SHARM., M.J.T.; DUTINETT, S.A. Non-small Cells Lung Cancer Derived Soluble Mediators and Prostaglandin E2 enhance peripheral Blood Lymphocyte IL-10 Transcription and Protein Production. **J. Immunology.** 157 (12) 5512-5520. 1996.
- [13] HUGGINS, C.; GRAND, L.C.; BRILLANTES, F.P. Mammary cancer induced by a single feeding of polynuclear hydrocarbons and its suppression. **Nature.** 189:204-207. 1961.
- [14] HUGGINS, C.; MORII, S.; GRAND, L.C. Mammary cancer induced by a single feeding of polynuclear hydrocarbons: routes of administration. **Ann. Surg.** 154:315-318. 1961.
- [15] HUGGINS, CH.; BRIZIARELLI, G; SUTTON, H. Rapid induction of mammary carcinoma in the rat and the influence of hormones on the tumors. **J. Exp. Med.** 109: 25-42. 1959.
- [16] JONATHAN, M.; CURIE, MD.; WAUM, KI.; HONG, MD. Retinoids As Antitumor Agents: A new Age of Biological Therapy. **The j. Sci. Ame.** March 10, 150-173. 1999.
- [17] KOENDERS, A.J.M.; GUERTS-MOESPOT, A.; ZOLINGEN, S.J.; BENRAAD, THJ. Progesterone and estradiol receptors in DMBA-induced mammary tumors before and after ovariectomy and after subsequent estradiol administration. In: McGuire WL, Raynaud JP, Baulieu EE, eds. Progesterone receptors in normal and neoplastic tissues. New York: **Raven Press.** 71-83. 1977.
- [18] KUND, U.N.; BEATY, T.L; JACKSON, M.J. Antitumor activities of Interleukin 10 in Murine Model of Breast Cancer. **The Journal of National Cancer Institute.** 88(8): 536-541. 1996.
- [19] LEMON, H.M. Abnormal estrogen metabolism and tissue estrogen receptor proteins in breast cancer. **Cancer.** 25:4323-35. 1970.
- [20] SPORN, M.B. Quimioprevención del Cáncer. **The Lancet:** Vol.214 Nº4 p 229-231. 1994.
- [21] MALCOLM, A.; SMITH, D.R. Retinoids in Cancer Therapy **J. of Clinical Oncology**, Vol 10, Nº5 (May), 839-864. 1992.
- [22] MCCUE, P.A.; THOMAS, R.S.; SCHROEDER, G. Mary Lou and Sherman Michael I: Effects of Dietary Retinoids Upon Growth and Dition of Tumors Derived from Several Murine Embryonal Carcinoma Cell Lines. **Cancer Research.** 48 (13): 3772-3779. 1988.
- [23] MERCK SHARP & DOHME INTERNATIONAL (eds). **El Manual de Merck.** Séptima edición, México :822-824. 1986.
- [24] MEYSKENS, FRANK I. Coming of age-The Chemoprevention of Cancer. **The New England J. Med.** 323 (12):825-829. 1990.
- [25] MIYACHI, K.; FRITZER, M.J.; Tam, E.M. Antibody to a nuclear Antigen Proliferating Cell The **J. Immunology.** 121:2228-2234. 1978.
- [26] MOBBS, B.G. The uptake of tritiated oestradiol by dimethylbenzanthracene-induced mammary tumours of the rat. **J Endocrin.** 36:409-414. 1966.



- [27] MOON, R.C.; GRUBBS, C.J.; SPORN, M.B. Inhibition of 7-12 Dimethyl benz(a) anthracene-induced mammary Carcinogenesis by Retinyl\_Acetate. **Cancer Research**. 36 (7): 2626-2630. 1976.
- [28] MOON, R.C.; THOMPSON, H.J.; EECCI, P.J.; GRUBBS, C.J.; NEWTON, D.L.; SMITH, J.M.; PHILIPS, S.L.; HENDERSON, W.R.; MULLEN, L.T.; BROWN, C.C.; SPORN, M.B. N-(4-Hydroxyphenyl) retinamide, A New retinoid for prevention of Breast Cancer in the Rat. **Cancer Research**. 39:1339-1346. 1979.
- [29] MOORE, K.W.; O'GARRA, A.; DE WAAL-MALEFYT.; R, VIERIA MOSMANN, T.R. Interleukin-10 **Anna. Rev. Immunol.** 11: 165-190. 1993.
- [30] NAKAJIMA, M.; LOTAN, D.; BAIG, M.M.; CARRALERO, R.M.; WOOD, R.; HENDRIX, M.; LOTAN, R. Inhibition by Retinoic Acid of Type IV Collagenolysis and Invasion Though Reconstituted Basement Membrane by Metastatic Rat Mammary Adenocarcinoma Cells **Cancer Research** 49 (7): 1698-1706. 1989.
- [31] NOBLE, R.L.; HOCHACHKA, B.C.; KING D. Spontaneous and estrogen-produced tumors in Nb rats and their behavior after transplatation. **Cancer Res.** 35: 766-80. 1975.
- [32] PECKHAM, J.C.; Experimental oncology. In: BAKER, JR.; LINDSEY, JR.; WEISBROTH, SH. eds. **The Laboratory rat**. Vol II. New York: Academic Press. 119-147. 1980.
- [33] RUDALI, G.; APIOU, F.; MUEL, B. Mammary cancer produced in mice with estriol. **Europ J Cancer**. 11:39-41. 1975.
- [34] SAURAT, J.H. Retinotherapy of Sin Diseases **Press Med.** 23 (34): 1551-1553. 1994.
- [35] TEJERINA, G.; FLORENCIO, A. **Tratamiento del cáncer de mama**. Salvat Editores S.A. Barcelona. 675 pp. 1986.
- [36] TEELMAN, K.T.; KLAUS, M.; ELIASON, J. Comparison of Therapeutic Effects of New Arotinoid, RO 408757 and All-Trans and 13 Cis AR on Rat Breast Cancer. **Cancer Research**. 53, 2318-2325. 1993.
- [37] WEIR, D.M.; STEWAR, J. **Inmunología Manual Moderno**. segunda edición, Bogotá, p. 11, 1995.
- [38] WILSON, E.L.; DOWDLE, E.B. Effects of Retinoids on Normal and Neoplastic Human Cells Cultured in vitro. **Cancer Research**. 40(12): 4817-4820. 1980.
- [39] WOJTOWIEZ-PRAGA, S. Reversal of Tumor-induced immunosuppression: a new approach to Cancer Therapy. **J. Immunotherapy**. May.20: 165-77. 1997.