

Tesis de Posgrado

Carcinogénesis por acetato de medroxiprogesterona (mpa) en el ratón Balb/c : Estudios "in vivo" de factores involucrados en la progresión y en la inducción tumoral

Kordon, Edith Claudia

1991

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

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

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

Cita tipo APA:

Kordon, Edith Claudia. (1991). Carcinogénesis por acetato de medroxiprogesterona (mpa) en el ratón Balb/c : Estudios "in vivo" de factores involucrados en la progresión y en la inducción tumoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2448_Kordon.pdf

Cita tipo Chicago:

Kordon, Edith Claudia. "Carcinogénesis por acetato de medroxiprogesterona (mpa) en el ratón Balb/c : Estudios "in vivo" de factores involucrados en la progresión y en la inducción tumoral". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2448_Kordon.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**CARCINOGENESIS POR ACETATO DE
MEDROXIPROGESTERONA (MPA) EN EL RATÓN BALB/C.
ESTUDIOS "IN VIVO" DE FACTORES INVOLUCRADOS EN
LA PROGRESIÓN Y EN LA INDUCCIÓN TUMORAL.**

Autora: EDITH CLAUDIA KORDON

Directora: Dra. CLAUDIA L. M. LANARI

Lugar de trabajo:

**DIVISIÓN MEDICINA EXPERIMENTAL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES HEMATOLÓGICAS
ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA**

*Tesis.
2448*

Tesis presentada para optar al título de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

BUENOS AIRES, 1991

Al entender de ciertos biólogos, en la naturaleza viviente nada sería más difícil de comprender que el origen de pequeños detalles orgánicos, tales como las callosidades que se ven en las rodillas del camello o los broches de presión que adornan el caparazón del cangrejo de mar. Por mi parte me siento más desconcertado por el camello entero y aún por el cangrejo.

Jean Rostand

A mis padres

Este trabajo, realizado en la División Medicina Experimental del Instituto de Investigaciones Hematológicas de la Academia Nacional de Medicina, ha sido posible gracias al apoyo de diferentes personas e instituciones a quienes deseo expresar mi agradecimiento:

A la Dra. Claudia Lanari porque no sólo guió mis primeros pasos en la investigación científica sino que, además, de ella recibí las mejores lecciones de camaradería, espíritu de lucha, tolerancia y optimismo.

Al Dr. Alfredo Molinolo, por su invaluable colaboración en la elaboración de este trabajo, por su generosidad, su confianza, su permanente apoyo, y por enseñarme que aceptar y disfrutar los desafíos que se nos presentan cada día es una de las mejores maneras de sentirse vivo.

A la Dra. Christiane Dosne Pasqualini, Jefe del Departamento y de la División de Medicina Experimental, por brindarme su total apoyo, estímulo y confianza desde mi primera visita al laboratorio hasta el día de hoy.

Al Dr. Eduardo H. Charreau por su generosa colaboración y asesoramiento en los estudios de receptores hormonales.

A la Dra. Violeta Chiauzzi y a la Sra. Alicia Sens por su valiosa asistencia técnica.

A la Dra María Teresa Santarelli por su colaboración en el análisis estadístico de los resultados.

A los Laboratorios Dr. Gador (Argentina) por el suministro de las hormonas utilizadas en este trabajo y, especialmente, al Dr. E. Montuori por encargarse personalmente de la elaboración de los pellets de silastic.

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

A todos los miembros de la División Medicina Experimental, particularmente:

A las Dras. Isabel Piazzón, Irene Nepomnaschy, Adriana Déroche, y a las Lics. Sandra Torello y Alejandra Goldman, por el afecto y el apoyo que me brindaron todos estos años.

A las Lics. Patricia Pazos y Fernanda Montecchia, por su fundamental colaboración en la realización de este trabajo, por su comprensión y su paciencia.

Al Dr. Raúl Ruggiero y a los Lics. Graciela Dran y Pedro di Gianni, por su afectuosa camaradería.

Al Dr. Daniel Bonfil por su generosa y activa participación en los estudios de invasión tumoral.

A los Sres. Juan Portaluppi y Antonio Morales por su invaluable asistencia técnica pero, sobre todo, por su calidez y su cariño.

Finalmente, quiero agradecer muy especialmente:

A Omar, por su generosidad, su tolerancia, su infinita paciencia y su incondicional apoyo.

INTRODUCCIÓN	1
DEFINICIONES	3
CLASIFICACIÓN HISTOGENÉTICA DE LAS NEOPLASIAS	4
MECANISMOS CARCINOGENÉTICOS	5
NOMENCLATURA DE NEOPLASIAS Y SU BASE EMBRIOLÓGICA	5
CARCINOGENESIS HORMONAL	8
INDUCCIÓN HORMONAL DE NEOPLASIAS	8
HORMONAS Y CÁNCER HUMANO	9
MODELOS ANIMALES	11
HORMONAS EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER	14
CÁNCER DE MAMA HUMANO	15
ETIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA	15
EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA	17
TERAPIA HORMONAL DEL CÁNCER DE MAMA	18
ADENOCARCINOMA DE MAMA EN RATÓN	22
AGENTES INDUCTORES	22
PROGESTERONA Y PROGESTÁGENOS	28
ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA (MPA)	28
MODELO EXPERIMENTAL	32
OBJETIVOS	34
MATERIALES Y MÉTODOS	36
ANIMALES	37
HORMONAS UTILIZADAS Y FORMAS DE ADMINISTRACIÓN	37
MANIPULACIONES QUIRÚRGICAS	37
ESTUDIOS DE RECEPTORES HORMONALES	38
COMPUESTOS UTILIZADOS	38
PROCESAMIENTO DE LOS TUMORES	38

MEDICIÓN DE RECEPTORES DE ESTROGENOS Y PROGESTERONA	38
ESTUDIOS HISTOLÓGICOS	39
ESTUDIOS DE CRECIMIENTO TUMORAL <i>IN VIVO</i>	40
MANTENIMIENTO Y CONTROL DE LOS TRANSPLANTES TUMORALES	
EXPERIMENTOS REALIZADOS CON LA LÍNEA C7-HD.	41
EXPERIMENTOS REALIZADOS CON LA LÍNEA C4-HD	44
EXPERIMENTOS REALIZADOS CON LA LÍNEA D5-HD	46
EXPERIMENTOS REALIZADOS CON LA LÍNEA 5A	47
EXPERIMENTOS REALIZADOS CON LA LÍNEA C7-HI	47
EXPERIMENTOS REALIZADOS CON LA LÍNEA D5-HI	48
EXPERIMENTOS REALIZADOS CON LA LÍNEA 55-HI	48
EXPERIMENTOS DE INDUCCIÓN TUMORAL	48
EFFECTO DEL MPA SOBRE HEMBRAS DE LA CEPA C3H	48
EFFECTO DE LA SIALOADENECTOMÍA Y DE LA OVARIECTOMÍA SOBRE LA CAPACIDAD TUMORIGÉNICA DEL MPA DEPOT.	49
EFFECTO DE LA PROGESTERONA SOBRE HEMBRAS BALB/C	49
RESULTADOS	50
PASAJES SINGENEICOS DE LOS ADENOCARCINOMAS DE MAMA	
INDUCIDOS POR MPA EN HEMBRAS BALB/C.	51
EFFECTO DE LOS SUCESIVOS PASAJES EN LAS LÍNEAS MPA-D	51
EFFECTO DEL AGREGADO TARDÍO DEL MPA EN LÍNEAS MPA-D	59
EFFECTO DE MPA DEPOT VS PELLET	62
INFLUENCIA DE LA REMOCIÓN DEL PELLET DE MPA	66
INFLUENCIA DE LA OVARIECTOMÍA	66
EFFECTO DE LA PROGESTERONA, ANDRÓGENOS Y ESTRÓGENOS	73
EFFECTO DE LA REMOCIÓN DE LOS PELLETS DE MPA O PROGESTERONA EN HEMBRAS OVARIECTOMIZADAS	78
EFFECTO DE LA SIALOADENECTOMÍA	83
EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ESTRÓGENOS	87

EN TUMORES MPA-D	87
RESISTENCIA TUMORAL AL TRATAMIENTO CON BE	89
EFFECTO DEL 17 B-ESTRADIOL (E ₂) SOBRE TUMORES C4-HD .	89
PASAJES DE TUMORES RESISTENTES AL TRATAMIENTO ESTROGÉNICO	92
EFFECTO DEL BE SOBRE TUMORES AUTÓNOMOS	97
INDUCCIÓN DE ADENOCARCINOMAS DE MAMA EN RATÓN POR PROGESTÁGENOS	102
EFFECTO DEL MPA EN LA CARCINOGENESIS MAMARIA DE LA CEPA C3H	102
EFFECTO DE LA SIALOADENECTOMÍA Y DE LA OVARIECTOMÍA SOBRE LA CARCINOGENESIS MAMARIA INDUCIDA POR EL MPA EN HEMBRAS BALB/C	105
LESIONES LOBULILLARES	105
LESIONES DUCTALES	107
INDUCCIÓN DE ADENOCARCINOMAS DE MAMA EN BALB/C CON PROGESTERONA	113
<u>DISCUSIÓN</u>	124
CAPACIDAD REGULATORIA DEL MPA SOBRE EL CRECIMIENTO TUMORAL	125
EFFECTO DE LA OVARIECTOMÍA	129
CRECIMIENTO DE TUMORES MPA-D EN AUSENCIA DE HORMONAS ESTIMULADORAS	131
INHIBICIÓN POR TRATAMIENTOS ESTROGÉNICOS	132
PROGRESIÓN DE LOS TUMORES MPA-D HACIA LA AUTONOMÍA HORMONAL	136
PROGRESIÓN A LA AUTONOMÍA Y ONCOGENES	140
ESTUDIOS DE LA CAPACIDAD TUMORIGÉNICA DEL MPA	142
EFFECTO DEL MPA EN LA CEPA C3H	142
EFFECTO DE LA OVARIECTOMÍA EN BALB/c	143

EFFECTO DE LA SIALOADENECTOMÍA EN BALB/c	144
EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE PROGESTERONA EN BALB/c	146
<u>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</u>	150
CONCLUSIONES	151
PERSPECTIVAS	153
<u>RESUMEN</u>	155
<u>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</u>	159
<u>GLOSARIO</u>	176

INTRODUCCIÓN

Cada año sólo en los EEUU alrededor de un millón de personas se enteran de que tienen algún tipo de cáncer. Mientras que en 1900 esta enfermedad constituía la octava causa de muerte, desde 1972 es la segunda, sólo superada por las enfermedades cardiovasculares (*Pitot, 1978*). En 1989 fue la causa del 22% del total de los decesos (500.000 muertes) en los EEUU (*Cotran, 1989*). El incremento en la tasa de incidencia de cáncer se debe, en parte, al envejecimiento de la población. El aumento de edad permitiría que los carcinógenos del ambiente tuvieran más tiempo para ejercer sus efectos y, además, las defensas inmunológicas de los ancianos suelen ser menos efectivas que las de la gente joven (*LiVolsi, 1989*). Sin embargo, es importante destacar que el cáncer puede aparecer a cualquier edad y que uno de los factores principales que llevan al aumento de la incidencia general es el incremento del cáncer de pulmón, principalmente provocado por el cigarrillo (*Pitot, 1978*). También en la Argentina el cáncer es la segunda causa de muerte desde 1960, con una proporción, en relación al total de muertes, en leve aumento entre 1960 (15,1%) y 1981 (17,3%). Para el sexo femenino, la tasa de mortalidad por tumores malignos era de 123,8 por cien mil en 1981, ocupando el segundo lugar como causa de muerte para todas las edades y el primero en el grupo comprendido entre los 15 y 64 años (*Ustarán y col., 1988*).

A excepción del cáncer de piel, el más común y curable de los cánceres humanos, el 75% de los tumores malignos se originan en 10 sitios anatómicos: colon y recto, mamas, pulmón y bronquios, próstata, útero, órganos linfoides, vejiga, estómago, sangre y páncreas (*Pitot, 1978*). Dentro de los cánceres que afectan al sexo femenino, considerando las tasas específicas de mortalidad según localizaciones, el cáncer de mama se encuentra en primer lugar en la Argentina, con tasas ajustadas por edad de 20,4 por mil para el año 1978, ocupando también el primer lugar entre los cánceres gónitomamarios. Nuestro país se encuentra entre los que poseen tasas de mortalidad más altas a nivel mundial. En un estudio reciente realizados en Buenos Aires (*Ustarán y col., 1988*) se observó que el mayor porcentaje de mujeres con cáncer de mama se presentó en el grupo de edades comprendido entre los 55 y 64 años siendo la edad mediana de 56,05 años. Esta edad se corresponde con otros estudios realizados en el país (*Sobel y col., 1984*) y en el exterior (*Harris y col., 1982; Helmrich y col., 1983; Trichopoulos y col., 1972*).

DEFINICIONES

TUMOR: masa de tejido claramente definida; estrictamente un tumor es cualquier hinchazón, incluyendo una masa inflamatoria, por lo tanto una cicatriz, un callo, un granuloma, un absceso crónico o una masa parasitaria son tumores. Sin embargo el término tumor se ha convertido en un sinónimo de **neoplasia** hasta el punto de ser igualado al término **cáncer**.

NEOPLASIA: James Ewing (*Ewing, 1940*) lo definió como un "*crecimiento relativamente autónomo de tejido*". Esta definición engloba varios conceptos:

- 1) **autonomía:** una neoplasia no está sujeta a los mecanismos de control que gobiernan el comportamiento de las células individualmente y sus interacciones en el organismo funcional;
- 2) **relatividad:** indica que las neoplasias no son totalmente autónomas;
- 3) **crecimiento:** puede referirse a la velocidad de división celular o a los procesos intracelulares involucrados en la síntesis de macromoléculas que serán utilizadas o excretadas por las células. La velocidad de crecimiento puede ser extremadamente lenta, diferenciándose muy poco de su contraparte normal, o muy rápida, semejante a la del tejido embrionario;
- 4) **tejido:** indica que una neoplasia puede ser definida únicamente en un organismo multicelular.

Las neoplasias pueden ser **benignas** o **malignas**:

- a) **Neoplasias benignas:** son aquellas que se extienden pero no invaden tejidos adyacentes ni se dispersan hacia otros sitios. Generalmente están asociadas a un buen pronóstico.
- b) **Neoplasias malignas:** son aquellas que pueden invadir tejidos adyacentes, infiltrándolos y destruyéndolos como consecuencia directa de su crecimiento dentro del tejido invadido y no por la compresión extratistular. Además son potencialmente capaces

de diseminarse y colonizar a distancia originando nuevos tumores que se conocen como metástasis. Generalmente se las asocia con un mal pronóstico de la enfermedad.

CÁNCER: proceso que tiene las características biológicas de una **neoplasia maligna**.

Todos las **neoplasias** benignas o malignas tienen dos componentes básicos:

- 1) el **parénquima**, constituido por las células neoplásicas proliferativas;
- 2) el **estroma**, constituido por tejido conectivo, vasos sanguíneos y otros elementos.

Aunque las células parenquimatosas representan la parte proliferativa de las neoplasias y determinan su naturaleza, crecimiento y evolución, éstas dependen críticamente de su estroma.

CLASIFICACIÓN HISTOGENÉTICA DE LAS NEOPLASIAS:

Pueden agruparse de acuerdo a los tipos de tejidos de los cuales surgen. Ritchie (1962) agrupó las neoplasias en base a su origen histogenético según:

1. Neoplasias de epitelios.
2. Neoplasias de tejido conectivo.
3. Neoplasias del sistema inmune y hematopoyético.
4. Neoplasias del sistema nervioso.
5. Neoplasias de origen celular histogenético múltiple.
6. Neoplasias varias (misceláneas).

Suelen clasificarse también de acuerdo al tejido del cual surgió la neoplasia y agregar un término descriptivo tal como papilar, quístico, folicular, etc., por ejemplo: carcinoma lobulillar de mama. Algunas neoplasias suelen nombrarse con el nombre del primer investigador que la describió, por ejemplo el tumor óseo de Ewing, la enfermedad de Hodgkin del tejido linfático y el tumor de riñón de Wilms.

NOMENCLATURA DE NEOPLASIAS Y SU BASE EMBRIOLÓGICA:

Las neoplasias **benignas**, epiteliales y mesenquimáticas, se suelen nombrar utilizando un prefijo referido al tejido del cual surgió la neoplasia y el sufijo *-oma*. Por ejemplo, se denominan **adenomas** a las neoplasias epiteliales benignas que tienen patrones de crecimiento glandulares o que se originan en tejido glandular aunque no reproduzcan este patrón.

Las neoplasias **malignas** se dividen en dos categorías de acuerdo a su origen embriológico. Una neoplasia que surge de estructuras derivadas del mesodermo se denomina **sarcoma**, si el tumor surge de estructuras derivadas del endodermo o del ectodermo, se llama **carcinoma**. Entonces los tumores malignos se denominan con el nombre del tejido del cual surgen más el término **sarcoma** o **carcinoma**. Por lo tanto los tumores malignos del tejido adiposo, por ejemplo, se denominan **liposarcomas**, y los del epitelio glandular se denominan **adenocarcinomas**. Además se acostumbra especificar el órgano de origen, por ejemplo un **adenocarcinoma mamario**.

Las neoplasias malignas del tejido linfático y de los melanocitos a las cuales sólo se les agrega el sufijos *-oma* los **linfomas** y los **melanomas** son excepciones de esta regla.

MECANISMOS CARCINOGENÉTICOS

En una célula cancerosa han ocurrido cambios irreversibles en el material hereditario celular por lo cual el cáncer puede ser considerado como una "enfermedad genética a nivel celular". Tanto la herencia como el ambiente influyen en la probabilidad de que se produzcan tales cambios (*Strong, 1977*). Además de la predisposición genética, entre los factores involucrados en la carcinogénesis pueden mencionarse factores ambientales químicos y físicos, virus e infecciones crónicas, medicamentos, estímulos hormonales, disminución de la inmunocompetencia debido al envejecimiento, etc (*Vorherr, 1980*).

Los doctores James y Elizabeth Miller (1966) han propuesto la siguiente definición para el término **carcinógeno**: "*es un agente cuya administración a animales no tratados previamente produce un aumento estadísticamente significativo de la incidencia de neoplasias malignas respecto de controles apropiados no tratados, independientemente de que éstos tengan una alta o baja incidencia espontánea de la neoplasia en cuestión*". Algunos agentes, incluyendo promotores e inhibidores de la respuesta inmune, pueden aumentar la incidencia de neoplasias malignas en tejidos tratados previamente con dosis subcarcinogénicas de carcinógenos; tales agentes no deberían ser llamados carcinógenos.

Los modelos experimentales de carcinogénesis *in vivo* se caracterizan por la prolongada latencia entre la aplicación del carcinógeno (físico, químico o biológico) y la aparición de tumores. Algunos autores, incluyendo Rous, Berenblum y otros, sugirieron, hace ya unos 50 años, que la carcinogénesis podía ser dividida al menos en dos estadios (*Pitot, 1978*):

Iniciación, que resultaba de la aplicación directa del carcinógeno a la población celular;

Promoción, que ocurría a continuación de la iniciación y se debía a factores ambientales o a la aplicación de los llamados agentes promotores.

Los **iniciadores** son mutágenos, provocan reacciones celulares electrofílicas que causan alteraciones en la estructura del ADN. Estos agentes pueden inducir el cáncer con una sola exposición. Los agentes **promotores** estimulan la replicación de las células mutantes. No son carcinógenos por sí mismos y deben actuar después del **iniciador** para inducir una neoplasia (*LiVolsi, 1989*).

Aunque el mecanismo de carcinogénesis en dos estadios fue establecido para explicar la acción de los carcinógenos químicos sobre la epidermis, existen analogías con otros carcinógenos sobre otros tejidos, por ejemplo los hepatomas inducidos por radiación en el ratón (*Pitot, 1978*).

En los modelos experimentales de carcinogénesis química se han definido tres tipos

de iniciadores :

- a) **Carcinógenos directos:** no requieren ser metabolizados para actuar sobre las células blanco;
- b) **Procarcinógenos:** requieren de una o más modificaciones para actuar y convertirse en carcinógenos;
- c) **Cocarcinógenos:** requieren de la presencia de otros agentes iniciadores para la inducción neoplásica (*Kolbye, 1976*)

La mayor parte de los estudios han demostrado que el proceso de iniciación es, en general, irreversible. Por ejemplo, en el modelo de carcinogénesis química en la piel del ratón, la aplicación de pequeñas dosis de carcinógenos indujo tumores aún cuando la aplicación del promotor se había demorado de 9 a 12 meses (*Berenblum y Shubick, 1947; Botwell, 1964*). Sin embargo, en este mismo modelo, *Roe y col. (1972)* han demostrado que si el plazo entre iniciador y promotor superaba el año, la incidencia tumoral era prácticamente nula. Esto indicaba que bajo ciertas circunstancias los tejidos eran capaces de reparar los daños del ADN asociados a la iniciación, es decir, que en estos casos la iniciación era reversible.

A diferencia del "estado iniciado" que es relativamente estable, la promoción puede ser modificada por diversos factores ambientales como son la edad, el sexo, el balance hormonal, etc. En los EEUU, los estudios epidemiológicos indican que un 80 y hasta un 90% de los cánceres humanos están relacionados con el estilo de vida y otras influencias ambientales (*Doll y Pet, 1981*).

Aunque los agentes carcinogénicos pueden ser estudiados por separado, muchos de ellos actúan conjuntamente. Existen evidencias experimentales y clínicas que indican que la transformación neoplásica es un proceso que involucra eventos múltiples y sucesivos (*Vogelstein y col., 1988*). Además parecería que todos los factores etiológicos afectarían finalmente a sólo dos grupos de genes: 1) los **proto-oncogenes**: precursores de los oncogenes y 2) los **anti-oncogenes** o genes supresores del cáncer. Ambos tipos son componentes nor-

males del genoma, y sus productos están involucrados en la regulación fisiológica del crecimiento celular normal.

CARCINOGENÉISIS HORMONAL

La diferenciación puede ser definida como el *proceso de adquisición de caracteres completamente individuales tal como ocurre en la diversificación progresiva de las células y tejidos embrionarios*. También se dice que la diferenciación es el *aumento de heterogeneidad morfológica o química* (*Dorland's illustrated Medical Dictionary, 1988*).

Muchas hormonas regulan la diferenciación celular durante el desarrollo ontogénico. En algunos casos, como en el de la hormona tiroidea sobre la metamorfosis del sapo o el de los andrógenos en la masculinización de ciertos tejidos de mamíferos, si el sistema hormona-receptor es afectado en un período crítico del desarrollo no se induce la morfogénesis. Otros tejidos requieren de hormonas no sólo para el comienzo de la diferenciación sino también para el mantenimiento de una morfología diferenciada. Por ejemplo, la ausencia de estrógenos produce la atrofia de la mucosa vaginal, del endometrio y del epitelio mamario en las hembras de mamíferos; en los machos la falta de andrógenos lleva a la atrofia de la próstata. Estos efectos en general son reversibles ya que el potencial para la diferenciación normal permanece y la administración de la hormona faltante hace que los tejidos retornen a su estado diferenciado (*Sutherland, 1987*).

El cáncer puede ser considerado como un desorden en la diferenciación en el cual células relativamente inmaduras continúan proliferando y no responden a los mecanismos homeostáticos que normalmente controlan la organización tisular y la morfología. Por lo tanto no es sorprendente que algunas hormonas que afectan la diferenciación puedan influir en el desarrollo del cáncer.

INDUCCIÓN HORMONAL DE NEOPLASIAS

Es un hecho ampliamente comprobado la importancia de las hormonas en el control fisiológico del medio interno. Por lo tanto, que la administración excesiva de hormonas exógenas o que una producción endógena anormal induzca la aparición de tumores sugiere que sería suficiente el simple desarreglo de los mecanismos homeostáticos del organismo para producir una transformación neoplásica. Hace ya mucho tiempo que diversos autores demostraron que las alteraciones de los mecanismos de retroalimentación entre la hipófisis y las glándulas endócrinas que ésta controla pueden llevar a la aparición de neoplasias (*Pasqualini, 1949*). Uno de los ejemplos clásicos es el trasplante de ovarios normales en el bazo de roedores castrados (*Biskin y Biskin, 1944; Gardner, 1948*). Los estrógenos producidos por el implante son llevados por el sistema venoso esplénico al hígado donde son metabolizados. Esto produce una ruptura en el circuito de retroalimentación negativa. Los estrógenos no entran en la circulación general, por lo tanto no inhiben la secreción de gonadotrofinas hipofisarias. La producción excesiva de gonadotrofinas produce un estímulo constante del implante ovárico e induce en éste la aparición de una neoplasia. También es posible inducir neoplasias de la hipófisis anterior por tiroidectomía (*Pitot, 1978*). Se supone que esto se debe a la falta de retroalimentación negativa por la ausencia de hormonas tiroideas circulantes. Por lo tanto, las manipulaciones que impiden la retroalimentación negativa provocarían un estímulo proliferativo descontrolado de los órganos blanco, lo cual llevaría a la aparición de neoplasias. También es posible inducir tumores en la hipófisis o en los órganos periféricos por la administración de hormonas específicas. En determinadas cepas de ratones se observó que el tratamiento con estrógenos induce la aparición de neoplasias de hipófisis y, en machos, la aparición de tumores testiculares a partir de las células de Leydig (*Gardner, 1948*).

Además de la inducción directa de neoplasias, las hormonas también actúan concertadamente con otros carcinógenos conocidos. Uno de los modelos más estudiados es el adenocarcinoma de mama murino, como se verá más adelante.

HORMONAS Y CÁNCER HUMANO

Existen datos epidemiológicos que sugieren que ciertas hormonas estarían involucra-

das en el desarrollo de algunos tumores en humanos. Por ejemplo, se asocian factores constitutivos tales como la diabetes mellitus, la obesidad o la nuliparidad a la aparición de carcinoma de endometrio (*Kurman y Norris*, 1987). Esta asociación probablemente refleje una serie de eventos endocrinológicos, cada uno de los cuales puede predisponer a altos niveles de estrógenos libres. La hipótesis de que niveles altos de estrógenos circulantes pueden ser causa directa del carcinoma de endometrio ha sido propuesta hace más de 40 años (*Pasqualini*, 1949). La nuliparición es frecuentemente acompañada por fallas en la ovulación; esto llevaría a períodos de prolongada estimulación estrogénica sin la actividad intermitente, supuestamente protectora, de la progesterona que sigue a la ovulación. El aumento relativo de la estimulación estrogénica también se produce en las mujeres obesas, en las cuales la gran cantidad de tejido adiposo metaboliza los andrógenos adrenales a estrógenos. Además la correlación existente entre adiposidad y niveles disminuídos de SHBG (globulina transportadora de hormonas sexuales) incrementa los niveles séricos de estrógenos libres en las mujeres obesas, aumentando sus efectos biológicos (*Siiteri y col.*, 1980). Por otra parte, tanto las pacientes con tumores ováricos secretores de estrógenos (*Dockerty y col.*, 1951; *Pasqualini*, 1949) como aquellas mujeres que estuvieron bajo tratamientos estrogénicos (*Antunes y col.*, 1979) muestran una mayor incidencia de carcinomas de endometrio.

En los hombres el desarrollo del cáncer de próstata parece depender de la presencia de andrógenos, principalmente de la testosterona. Esta suposición se ve confirmada por la ausencia de este tipo de cáncer en eunucos (*Moore*, 1944) y en pacientes con cirrosis. En éstos los niveles de estrógenos séricos son superiores a lo normal por fallas de la metabolización hepática; esto inhibe la secreción de LH y, consecuentemente, de testosterona (*Sutherland*, 1987). Todas las formas de crecimiento prostático (normal y neoplásico) son, por lo menos inicialmente, dependientes de andrógenos (*Cunha y col.*, 1980). La proliferación tumoral puede aumentar por la administración de andrógenos, como se observó en ratas portadoras de adenocarcinomas de próstata andrógeno-dependientes en las cuales el tratamiento con testosterona o dihidrotestosterona (DHT) estimuló la síntesis de ADN en las células neoplásicas (*English y col.*, 1986) o por un aumento de la hormona endógena, como el que se produce al comienzo de la terapia con análogos del LHRH (factor liberador de LH) (*Sutherland*, 1987).

En relación al cáncer de mama, se ha propuesto que factores hormonales aumentarían el riesgo de su desarrollo. Estos factores de riesgo involucrarían preponderantemente a los estrógenos: 1) menarca temprana y menopausia tardía; 2) edad avanzada para el primer embarazo; 3) dar a luz sin amamantamiento posterior o períodos de amamantamiento muy cortos; 4) nuliparidad; 4) fallas en la ovulación; 6) bajos niveles de andrógenos excretados; 7) hiperprolactinemia; 8) obesidad, diabetes mellitus, dietas ricas en grasas y proteínas; 9) tratamientos prolongados con altas dosis de estrógenos (*Vorherr y Messer, 1978*); 10) el uso de anticonceptivos orales (*Pike y col., 1983*).

En otros estudios se ha asociado la administración de píldoras anticonceptivas que contienen estrógenos y progestágenos a la aparición de adenomas hepáticos y más raramente de hepatocarcinomas (*Pitot, 1978*). Otra desafortunada relación entre las hormonas y el cáncer resultó de la administración de estrógenos sintéticos no esteroideos como el dietilstilbestrol (DES) a mujeres embarazadas para prevenir abortos espontáneos: en las hijas de estas mujeres se observó, durante la adolescencia, una alta incidencia de una forma inusual de cáncer de vagina, el adenocarcinoma de células claras (*Herbst y col., 1971*).

A pesar de la similitud de sus actividades biológicas, las hormonas sintéticas, como el DES, son químicamente diferentes de las hormonas naturales; además, las dosis administradas son, generalmente, suprafisiológicas. Por lo tanto, aunque ejerzan su acción terapéutica uniéndose a los receptores hormonales, su efecto tumorigénico podría deberse a mecanismos independientes. De todos modos, los datos epidemiológicos sugieren que las hormonas endógenas también podrían estar involucradas, directa o indirectamente, con la aparición de determinados tumores.

MODELOS ANIMALES

Algunos modelos animales han servido para aclarar la relación entre la acción hormonal y la inducción del cáncer. Un ejemplo es el desarrollo adenomas de tiroides por la estimulación crónica de la glándula (*Studer y col., 1989*). La hormona hipofisaria estimula-

dora de la tiroides es la tirotrófina (TSH). Su producción es estimulada por la disminución de los niveles de hormona tiroidea circulante o en respuesta a factores tróficos hipotalámicos. Se ha demostrado que animales tratados con bloqueantes de la síntesis de hormona tiroidea, desarrollaban hiperplasias de tiroides que retrogradaban al suspenderse el tratamiento. Si éste se continuaba, el tejido tiroideo se hacía invasor y podía ser implantado en animales singeneicos tratados con el mismo inhibidor metabólico. Nuevamente, la suspensión del tratamiento con el bloqueante producía la atrofia del tejido invasor. Sin embargo, con el tratamiento continuo se llegaba a un punto en el cual las células se hacían completamente autónomas e invasivas y ya no regresionaban con la remoción del inhibidor metabólico (*Sutherland, 1987*). Este experimento sugiere que la estimulación continua de una glándula permite el desarrollo de tumores, aunque no se puede descartar que el inhibidor metabólico utilizado actuara como iniciador tumoral mientras que la TSH sólo cumpliera el rol de promotor.

También en la carcinogénesis química se observó que las hormonas podían estar involucradas. Hormonas hipofisarias y ováricas son fundamentales en la inducción de tumores mamarios de ratas tratadas con carcinógenos químicos como el dimetilbenzantraceno (DMBA), el metilcolantreno (MCA) (*Welsch y Nagasawa, 1977*). En estos animales el bloqueo de la secreción de prolactina reducía significativamente la incidencia tumoral (*Clemens y Shaar, 1972*), lo mismo que la ovariectomía 30 días antes del tratamiento con el carcinógeno (*Dao, 1962*). Además, cualquier manipulación que alterase directa o indirectamente los niveles séricos de prolactina modificaba el crecimiento de estos tumores (*Welsch y Nagasawa, 1977*). La hipofisectomía y la ovariectomía (*Dao y Sunderland, 1959; Huggins y col., 1959; Welsch, 1971*) llevaba a la regresión de los tumores. Sin embargo, la regulación que ejercían los estrógenos sobre el crecimiento tumoral parecía producirse a través de modificaciones en la actividad de la prolactina (*Welsch y Nagasawa, 1977*). Algunos de los tumores inducidos por DMBA no respondían a la manipulación hormonal. Estos tumores carecían de receptores estrogénicos (RE) (*Mobbs, 1966*). Por lo tanto, mientras que la hormona estimuladora más importante parecería ser la prolactina, la capacidad de respuesta a la manipulación hormonal estaba más relacionada a la presencia de RE. Con frecuencia los tumores que regresionaban luego de la remoción de las hormonas estimuladoras no desapa-

recían completamente, y la reintroducción del factor trófico producía la reaparición del tumor (*Koenders y col., 1977*).

Estos tumores de mama de rata inducidos por un carcinógeno químico comparten algunas características con los tumores humanos: **la respuesta hormonal es variable , ésta puede preverse por el contenido de receptores para estrógenos y la erradicación tumoral por la terapia hormonal es incompleta.**

El tumor transplantable de ratón Shionogi 115 es un adenocarcinoma de origen mamario andrógeno-dependiente. Estos tumores se caracterizan porque generalmente no crecen en machos castrados o en hembras sino en machos intactos o en hembras tratadas con andrógenos (*Minesita y Yamaguchi, 1964*). Además, la eliminación de los andrógenos normalmente produce la regresión de los tumores que retoman el crecimiento cuando la hormona es reintroducida. Las células derivadas de los tumores hormono-dependientes transplantadas a un huésped sin andrógenos pueden permanecer "dormidas" largo tiempo hasta que las hormonas tróficas les son administradas nuevamente. Ocasionalmente el trasplante de células de tumores hormono-dependientes produce tumores aún en ausencia de andrógenos, lo que indicaría que estas células son capaces de adquirir autonomía hormonal.

Por lo tanto, los tumores Shionogi comparten algunas características con el cáncer de próstata humano: **la mayoría de los tumores inicialmente regresionan al ser privados de andrógenos pero subsecuentemente se hacen insensibles a la falta de hormonas.**

Por último, otro modelo para la modulación hormonal de la iniciación, progresión y tratamiento ha sido desarrollado en las ratas Nb (*Noble y Hoover, 1975; Noble, 1977*). Estos animales tienen una incidencia de carcinomas espontáneos de corteza adrenal y de mama normalmente baja, pero que puede ser aumentada si se les implanta un pellet de estrógenos. Seguidamente se desarrolló un modelo de progresión tumoral a partir de los trasplantes de estos tumores en ratas Nb tratadas o no con hormonas. Este modelo sugiere que la remoción completa de la hormona que supuestamente es promotora tumoral, puede au-

mentar la aparición de tumores hormono-independientes (*Noble, 1977*). Según estas observaciones, los intentos usuales por privar totalmente al tumor de los factores promotores podría favorecer la aparición de poblaciones celulares autónomas.

HORMONAS EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

Ciertas manipulaciones hormonales han demostrado ser útiles para el tratamiento de tumores como los de mama, próstata y endometrio, existiendo también respuestas ocasionales en otros tipos tumorales (*Campio y col., 1983*). En el cáncer de mama, la probabilidad de respuesta se correlaciona con la presencia de receptores para estrógenos y progesterona (*Baulieu, 1983*). También se ha demostrado que existen niveles elevados de receptores en carcinomas gástricos y melanomas; sin embargo, estos tumores que derivan de tejidos normalmente no respondedores, generalmente tampoco responden a la terapia hormonal (*Harrison y col., 1988; Walker y col., 1991*).

Supuestamente las manipulaciones hormonales que provocan regresión tumoral lo harían a través de dos mecanismos fundamentales:

- 1) Primariamente, a través de la disminución de las hormonas que estimulan el crecimiento del tumor.
- 2) Secundariamente, a través del bloqueo de la producción o liberación de otros factores tróficos que constituyen los estímulos directos para el crecimiento tumoral. Estos factores pueden ser producidos por (a) las mismas células tumorales (autócrinos), (b) las células vecinas (parácrinos) o (c) glándulas endócrinas distantes (endócrinos).

Pocos de los pacientes portadores de tumores hormono-respondedores tienen remisiones completas de la enfermedad después de la terapia hormonal. Alrededor de un 75-80% de los pacientes con cáncer de próstata (*Ekman y col., 1980*), 30-40% con cáncer de mama (*Pellegrini y col., 1983*) y 30% con cáncer de endometrio (*Schultz y col., 1988*) manifiestan una regresión observable o una disminución de los síntomas. Sin embargo, al menos para el cáncer de mama, a pesar de que un cierto número de pacientes inicialmente respon-

den a la terapia hormonal, esto no ha modificado la tasa de mortalidad. Inevitablemente, los tumores retoman su crecimiento y, aunque a veces haya respuestas secuenciales a las series de manipulaciones hormonales, finalmente los pacientes desarrollan tumores que no tienen ningún tipo de respuesta a la terapia hormonal (*Foulds*, 1969). Las posibles explicaciones de este fenómeno son:

1. Una insensibilidad fundamental de la célula troncal (stem) y de su progeie a las manipulaciones hormonales (*Ballaré y col.*, 1989).
2. La preexistencia de poblaciones no respondedoras en el tumor hormonodependiente (*Kim y Depowoski*, 1975).
3. En los tumores regresionando por el tratamiento hormonal surgen, al azar, poblaciones celulares autónomas que son seleccionadas positivamente (*Noble*, 1977)
4. La falta de una adecuada supresión de todas las hormonas o factores que pueden estimular el crecimiento tumoral (*Bélanger y col.*, 1985).

CÁNCER DE MAMA HUMANO

ETIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es una enfermedad multifactorial que involucra factores genéticos, ambientales, hormonales y dietéticos. Los factores ambientales son de mucha importancia, como lo muestran los datos epidemiológicos que se resumen más abajo; sin embargo éste es uno de los cánceres donde la historia familiar es un factor de predisposición relevante (*Vorherr*, 1980). También las hormonas endógenas han sido consideradas factores de riesgo dado que el incremento de la probabilidad de contraer la enfermedad con la edad es mayor antes que después de la menopausia, por lo tanto estos factores son de importancia etiológica. Uno de los factores operativos más importantes durante esos años puede ser la cantidad de tiempo que las mamas estuvieron expuestas a las hormonas ováricas endógenas. Esta hipótesis se basa en la observación de que el riesgo está asociado con una menarca temprana y una menopausia tardía, y que los embarazos múltiples y las lactancias prolongadas ejercen un efecto protector. Otro factor de riesgo importante en las mujeres premenopáusicas

es la edad avanzada para el nacimiento del primer hijo. Aunque este factor ha sido observado en numerosos estudios, el mecanismo por el cual opera aún no se conoce. La mayoría de los estudios también demostraron que en mujeres postmenopáusicas la obesidad estaba asociada con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama. Los niveles elevados de estrógenos endógenos encontrados en mujeres obesas explicarían esta asociación (*Thomas, 1991*).

A pesar de los numerosos y exhaustivos estudios epidemiológicos realizados, aún no existen evidencias concluyentes que expliquen la relación entre las hormonas endógenas y la aparición y desarrollo del cáncer de mama (*Toniolo y col., 1991*). Tampoco se ha comprobado que la administración de hormonas exógenas sea un factor de riesgo, aunque se ha sugerido que los tratamientos prolongados con estrógenos promueven el desarrollo del cáncer mamario (*Vorherr, 1980*).

Miller y Bulbrook (1986) resumieron de esta manera el consenso de una conferencia multidisciplinaria de la Unión Internacional Contra el Cáncer: "*El cáncer de mama está mediado por hormonas y los estrógenos son factores principales en la expresión del tumor*". Esta afirmación fue realizada cuando parecía muy probable que el riesgo de cáncer de mama estaba determinado por las concentraciones de estradiol biológicamente disponible en circulación. Sin embargo, las evidencias sugieren que la progesterona puede tener importancia etiológica. Esta evidencia incluye las siguientes observaciones: el riesgo se ha relacionado con un comienzo temprano de los ciclos ovulatorios regulares; los anticonceptivos orales combinados, que contienen tanto estrógenos como progesterona pueden aumentar el riesgo de cáncer de mama en mujeres jóvenes; la inoculación del anticonceptivo de acción prolongada **acetato de medroxiprogesterona depot** puede incrementar el riesgo en mujeres jóvenes; y los progestágenos cuando se administran junto con estrógenos en la menopausia también pueden estar asociados con un incremento en el riesgo (*Thomas, 1991*)

La etiología del cáncer de mama ha sido objeto de numerosas investigaciones. Sin embargo, aún permanecen oscuros los mecanismos involucrados en su desarrollo. Algunos factores de riesgo han sido identificados con una razonable certeza (por ejemplo: menarca temprana, menopausia tardía, ausencia de embarazos a término); pero, debido a su natura-

leza, no ha sido posible tomar medidas preventivas a partir del conocimiento de los mismos. Se han propuesto otros factores de riesgo más factibles de ser modificados (por ejemplo, ciertos factores dietéticos). Sin embargo, éstos no han sido confirmados en estudios epidemiológicos analíticos (*Le Marchand, 1991*).

Dado que no se sabe cómo impedir los factores causantes de la mortalidad por cáncer de mama, la estrategia de control se basa en mejorar la supervivencia a través de un diagnóstico prematuro y un mejor tratamiento de la enfermedad. Estos esfuerzos han alcanzado, sin embargo, logros limitados aún en países como los EEUU, donde las tasas de mortalidad no han disminuído en los últimos 15 años (*Le Marchand, 1991*).

El cáncer de mama inicialmente es una enfermedad localizada, luego se extiende por los vasos linfáticos a los ganglios linfáticos regionales, para luego diseminarse por vía hemática. Cuando se diagnostica clínicamente la diseminación metastásica del cáncer de mama, generalmente la muerte ocurre dentro de los 3 a 4 años subsiguientes (*Vorherr, 1980*).

Los informes sobre factores de protección y de riesgo para el cáncer de mama son muy controvertidos y existen discrepancias con respecto a los determinantes hormonales o bioquímicos que supuestamente ofrecen beneficios terapéuticos y/o diagnósticos para el paciente. En este momento es imposible formular principios prácticos para la solución del problema, particularmente debido a que las autoridades en este campo frecuentemente tienen opiniones diametralmente opuestas sobre los mismos temas. La controversia actual sobre el cáncer de mama se basa en la incapacidad para (a) identificar los agentes etiológicos, (b) definir adecuadamente los factores de riesgo, y (c) llevar a cabo una destrucción selectiva de las células cancerosas en los pacientes con enfermedad diseminada (*Vorherr, 1980*).

EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA

La epidemiología puede definirse como el estudio de la distribución de los determinantes ambientales de una enfermedad. Existen variaciones importantes en la incidencia de

cáncer de mama en los distintos países (*Henderson y Bernstein, 1991*). Las tasas de incidencia son 6 veces más altas en los EEUU, Canadá o el Norte de Europa que en Asia o Africa negra. Estas diferencias no están determinadas por una variación en la susceptibilidad genética (*Haenszel y Kurihara, 1968*). Las tasas de incidencia de cáncer de mama de las norteamericanas de raza negra son muy similares a las norteamericanas de raza blanca pero difieren de las de las africanas de raza negra. Además, las mujeres japonesas que migraron a Hawaii y a California tienen una mayor incidencia que las mujeres del Japón (*Buell, 1973; Dunn, 1977*). Las japonesas nativas que migran a los EEUU siendo jóvenes muestran un incremento pequeño de las tasas de cáncer de mama, mientras que la incidencia en las hijas de japoneses que han nacido en los EEUU, se aproxima a las de sus compatriotas de raza blanca. Esto sugiere que el riesgo de cáncer de mama está, por lo menos en parte, ligado a factores del medio que inciden durante las primeras etapas de la vida (*Henderson y Bernstein, 1991*).

TERAPIA HORMONAL DEL CÁNCER DE MAMA

Clásicamente, el tratamiento endócrino primario para las mujeres premenopáusicas era la ovariectomía. Las pacientes que habían atravesado la menopausia eran tratadas con andrógenos o antiestrógenos o, en presencia de un cáncer de mama avanzado, con dosis farmacológicas de estrógenos. Secundariamente, también se practicaba la adrenalectomía y la hipofisectomía en enfermas pre y postmenopáusicas. Estos tratamientos producían una regresión inicial en el 30 al 45% de los pacientes (*Vorherr, 1980*). Estos métodos actuaban disminuyendo la estimulación estrogénica ya sea directamente (ooforectomía), a través de la remoción del precursor necesario para la síntesis de los estrógenos (adrenalectomía) o por la remoción de las hormonas tróficas ACTH, FSH o LH que estimulan la síntesis de estrógenos (hipofisectomía). No se ha aclarado aún si la hipofisectomía ofrecía beneficios adicionales por la reducción de los niveles de otras hormonas como la prolactina.

Resulta interesante destacar que el tratamiento hormonal del cáncer de mama presentaba una paradoja: tanto la adición como el bloqueo de los estrógenos inducían la regre-

sión tumoral en las pacientes postmenopáusicas. La mejor explicación era que las dosis farmacológicas de estas hormonas producían un bloqueo de la respuesta estrogénica en lugar de la estimulación que normalmente producen las pequeñas cantidades de estrógenos naturales.

Actualmente, la aparición de drogas de probada eficacia disminuyó el uso de determinados procedimientos quirúrgicos. La ovariectomía, el tratamiento con antiestrógenos, dosis altas de progestágenos y/o aminoglutetimida (droga inhibitorio de la aromatasas) son, hoy en día, las manipulaciones hormonales más usuales. En general, la tasa media de respuesta es de un 30% y la mediana de la duración es de 12 meses, aproximadamente (*Pellegrini y col.*, 1983).

El tamoxifeno es el antiestrógeno más usado en pacientes pre y post-menopáusicas (*Pellegrini y col.*, 1983). En septiembre de 1985 la Conferencia de Consenso para el Desarrollo de Adyuvantes de la Quimioterapia reunida por el Instituto Nacional de Salud de los EEUU convino en que el tamoxifeno es la droga de elección para el tratamiento del cáncer de mama en pacientes post-menopáusicas con ganglios positivos y tumores que expresan receptores de estrógenos (RE+) (*Mouridsen y col.*, 1988). Análisis posteriores confirman esta recomendación aunque una gran proporción de pacientes con estas características no se benefician con la terapia (*Mouridsen y Rose*, 1988). Aunque no se conocen todos los mecanismos de acción del tamoxifeno, los efectos antiestrogénicos más importantes se deben a la competencia con el estradiol por el receptor estrogénico de alta afinidad, y su unión a este receptor (*Pellegrini y col.*, 1983). En la mayoría de los tejidos esta unión no produce efectos estrogénicos y deja a la célula refractaria a una estimulación estrogénica posterior. También existen evidencias que los antiestrógenos pueden modular el crecimiento celular uniéndose a proteínas distintas de los receptores esteroideos (*Sutherland y col.*, 1980), pero no se sabe la relevancia clínica que pueda tener esa unión.

Como se mencionó antes, en la terapia también se utilizan agentes progestagénicos como el MPA, que tienden a abolir los efectos tróficos de los estrógenos, o inhibidores de la aromatasas como la aminoglutetimida, que inhibe la síntesis de los estrógenos naturales

(*Pellegrini y col.*, 1983).

Todos los tratamientos mencionados anteriormente tienden a disminuir los niveles o los efectos de los estrógenos, aunque todavía no se puede asegurar que la responsable de la regresión de los tumores hormono-respondedores sea la disminución de la actividad estrogénica. *In vitro* se ha demostrado que los estrógenos regulan la producción de factores de crecimiento en células tumorales (*Dickson y Lippman*, 1987). Además, pueden modular los niveles de otras hormonas que podrían estar involucradas en el crecimiento de tumoral como, por ejemplo, la prolactina. Sin embargo, aunque se ha demostrado que esta hormona está involucrada en algunos modelos experimentales de tumorigénesis mamaria (*Welsch y Nagasawa*, 1977), no hay evidencias concluyentes de que la prolactina sea una hormona importante en el desarrollo del cáncer de mama humano (*Vorherr*, 1980; *Welsch y col.*, 1976)

En el cáncer de mama, la expresión de receptores para estrógenos y progesterona se asocia, en general, con un mejor pronóstico de la enfermedad (*Nagel y col.*, 1985). El contenido de receptores es el mejor indicador de la capacidad del tumor para responder a la terapia hormonal. Sin embargo, se ha observado que la correlación **presencia de receptores de estrógenos y progesterona (RE y RP) - respuesta a la terapia hormonal** no es perfecta: algunos pacientes con tumores que expresan receptores no responden a la terapia y algunos con "receptores negativos" responden (*Baulieu*, 1983; *Pellegrini y col.*, 1983). Esto puede deberse a:

- a) La existencia de "**falsos negativos**". La ausencia de receptores hormonales en el tumor puede deberse a condiciones endócrinas circunstanciales de la paciente (*Pellegrini y col.*, 1983), a que la muestra de tejido tumoral analizada sea inadecuada, o a errores en la manipulación de la misma (*Sutherland*, 1987).
- b) La existencia de "**falsos positivos**". La medición de receptores en las muestras tumorales indica, aproximadamente, la cantidad de receptores capaces de unirse a la hormona; esto no significa que los complejos hormona-receptor formados sean fun-

cionales (*Pellegrini y col.*, 1983; *Sibley y Tomkins*, 1974)

- c) La heterogeneidad existente en el contenido de receptores dentro de un mismo tumor es relativamente grande. Se ha observado esta heterogeneidad en los clones metastásicos que surgen de un tumor primario (*Holdaway y Bowditch*, 1983). Además, en ensayos realizados sobre múltiples biopsias secuenciales, la estimación de RE y RP cambió de positivo a negativo o viceversa en un 15 a 20% de los casos (*Hull y col.*, 1983; *Gross y col.*, 1984)
- d) Finalmente, la asociación existente entre la presencia de receptores hormonales y la respuesta al tratamiento hormonal no necesariamente revela una relación causa-efecto. Si esta relación no existiera, sería lógico esperar ciertas divergencias entre ambos eventos (*Sutherland*, 1987).

Existen, además, otros problemas aún no resueltos que complican la elección de una estrategia terapéutica adecuada en el tratamiento hormonal del cáncer (elección de hormonas, dosis, duración, etc.). Por ejemplo:

- a) Algunos regímenes terapéuticos tienen efectos colaterales ya que las dosis de hormonas administradas generalmente superan largamente los niveles fisiológicos normales. Estas concentraciones también puede producir efectos citotóxicos directos tanto en células neoplásicas como normales (*Pellegrini y col.*, 1983).
- b) Las hormonas, administradas en dosis suficientemente altas, pueden actuar a través de receptores no específicos (por ejemplo, progestágenos a través de los receptores de glucocorticoides o de andrógenos y andrógenos a través de receptores estrogénicos). Esta sería una explicación para el "efecto Huggins" por el cual un tumor puede responder tanto a la remoción como a la administración de dosis altas de una misma hormona altas (*Pellegrini y col.*, 1983)

ADENOCARCINOMA DE MAMA EN RATÓN

Los adenocarcinomas mamarios de ratones endocriados son de uso corriente en la oncología experimental pues ofrecen varias ventajas: primero, el tumor se localiza en un área circunscripta bajo la piel y puede ser fácilmente reconocido, medido cuantitativamente y removido *in toto* para cualquier tipo de estudio; segundo, la existencia de cepas endocriadas de ratones con incidencia reproducible de neoplasias mamarias provee una herramienta ideal para la investigación de factores etiológicos en la génesis de las mismas; tercero, se conoce mucho acerca de la biología del ratón endocriado por lo tanto puede ser fácilmente sujeto a manipulaciones experimentales. Por estas razones los tumores mamarios de ratón proveen uno de los mejores modelos para analizar el proceso neoplásico *in vivo* (Nandi y McGrath, 1973).

AGENTES INDUCTORES

a) Virus

Desde las primeras observaciones sobre los cánceres mamarios espontáneos se comprobó que ciertas colonias de ratones mostraban una alta incidencia de tumores a edad temprana, mientras que otras estaban prácticamente libres de la enfermedad (Bashford, 1909). Algunos años más tarde, cuando se dispuso de cepas endocriadas, la transmisión hereditaria de los tumores mamarios pudo ser estudiada en detalle. El cruzamiento recíproco entre ratones de alta y baja incidencia tumoral llevó al descubrimiento de que una influencia extracromosómica era uno de los factores causales (Staff of the R. B. Jackson Memorial Lab, 1933). En 1936, Bittner comprobó que la transmisión de este factor extracromosómico se hacía por la leche. Además el agente inductor del tumor mamario fue hallado en distintos órganos, tejidos y fluidos corporales en las cepas con alta incidencia de cáncer de mama (Gross, 1970). Estudios sucesivos demostraron que este agente tenía las propiedades físicas y químicas de un virus (Lyons y Moore, 1962). Se concluyó entonces que los tumores de ma-

ma de ratón pueden ser inducidos por un virus que se transmite por la leche materna, denominado inicialmente virus de Bittner y actualmente MMTV (mouse mammary tumor virus) de la familia de los retrovirus. Los retrovirus oncogénicos pueden dividirse en dos categorías:

- 1) los retrovirus transformantes portadores de oncogenes virales que han adquirido del genoma de una célula huésped;
- 2) los retrovirus que no tienen oncogenes propios sino que actúan por mutagénesis insercional activando los de la célula huésped; a este grupo pertenece el MMTV (*Nusse y col.*, 1988).

En la tumorigénesis mamaria inducida por el MMTV, la incidencia y la latencia tumoral son afectadas por distintos factores como la virulencia de las distintas variantes del virus, la susceptibilidad genética y el estado hormonal del huésped (*Michalides y col.*, 1983). El MMTV puede ser transmitido de dos modos: 1) por amamantamiento (MMTV exógeno) ó 2) genéticamente, vía gametas. Una cepa representativa del primer caso es la C3H, mientras que un ejemplo de la segunda es la GR. Ambas cepas son susceptibles y tienen alta incidencia tumoral. Otras cepas utilizadas para el estudio de la tumorigénesis mamaria son C57BL y B20, las cuales son resistentes, sin MMTV en la leche y con una incidencia tumoral baja o nula. La cepa BALB/c es susceptible pero su leche está libre del MMTV y presenta una baja incidencia espontánea de cáncer de mama: del 1 al 30% en hembras multíparas (*Schlom y col.*, 1973). Cuando esta cepa fue amamantada por C3H se demostró que la replicación e integración del MMTV facilita en alto grado la tumorigénesis mamaria en BALB/c (99% de incidencia respecto de un 1% en las amamantadas por BALB/c). Sin embargo, la integración de un MMTV exógeno no es indispensable para el desarrollo de neoplasias en esta cepa, ya que en los pocos tumores de mama espontáneos que aparecen, no se han hallado nuevas secuencias específicas insertadas en el ADN (*Breznick y Cohen*, 1982).

En todas las cepas susceptibles infectadas con MMTV surgen espontáneamente lesiones hiperplásicas lobulillares (HAN), que también pueden ser inducidas por tratamiento hormonal en ratones supuestamente libres del virus (*Medina*, 1973). Se considera a éstas

como lesiones preneoplásicas. El MMTV actuaría a dos niveles, transformando el tejido normal en HAN y estas lesiones en tumores.

b) Carcinógenos químicos

Los carcinógenos químicos más usados en la tumorigénesis mamaria del ratón son el 3-metilcolantreno (MCA), dibenzantraceno, benzopireno y 7-12 dimetilbenzantraceno (DMBA). Se hipotetiza que estos agentes actúan modificando el contenido o el flujo de información genética codificada en la secuencia de bases del ADN, transformando la célula normal en cancerosa. La administración de estos compuestos a animales experimentales produce derivados que se unen covalentemente a las macromoléculas celulares, ADN, ARN y proteínas (*Miller y Miller, 1966*). Basados en estas apreciaciones, se postula que durante el metabolismo de muchos carcinógenos se forman intermediarios altamente reactivos que reaccionan con los componentes celulares para iniciar la cadena de eventos que resultará en una neoplasia (*Dipple y col., 1968*).

Mientras que los tumores inducidos por MMTV se asocian a lesiones preneoplásicas HAN; la administración de DMBA y uretano a ratones BALB/c o C57BL, indujo una baja incidencia de HAN y alta incidencia de lesiones preneoplásicas ductales (DH), similares a las observadas en el cáncer de mama humano (*Medina, 1974; 1976*).

c) Hormonas

La relación entre las hormonas y los tumores de mama de ratón fue sugerida en un principio por Lathrop y Loeb en 1916 quienes demostraron que los cambios hormonales de la preñez conducían al desarrollo de neoplasias en ratones. Estos autores demostraron que hembras que habían tenido crías eran más susceptibles que las vírgenes a desarrollar tumores de mama y que la ovariectomía reducía la incidencia de los mismos.

En 1913, Lacassagne demostró que el tratamiento prolongado con hormonas estrogénicas llevaba a la aparición de carcinomas de mama en ratones machos de la cepa R III.

Posteriormente se confirmó que la administración de estrógenos aumentaba significativamente la incidencia de tumores de mama en otras cepas, como C3H (*Burns y Schenken, 1940; Gass y col., 1974; Heston y Deringer, 1953; Okey y Gass, 1968*). En 1939, Loeb y Kirtz, y en 1959 Muhlbock y Boot obtuvieron resultados similares en ratones portadores de injertos de hipófisis. Un estudio posterior de Yanai y Nagasawa (1972) sostenía que la prolactina es la hormona secretada por estos injertos y la responsable de la tumorigénesis mamaria murina. Por éste y otros experimentos (*Boot y col., 1962*) se supuso que la prolactina era fundamental en la tumorigénesis mamaria de roedores en general. Lo avalaba un hecho conocido durante años: en la mayoría de los casos, la hipofisectomía, sobre todo cuando se practicaba a muy corta edad, prevenía totalmente el desarrollo de tumores mamarios espontáneos (*Moon y col., 1951*). Sin embargo, la prolactina no actuaría en ausencia de estrógenos. Se ha demostrado que ratas o ratones ovariectomizados a corta edad también desarrollan menos tumores mamarios y la incidencia era prácticamente nula si, además, eran adrenalectomizados (*Bittner y col., 1961; Durbin y col., 1966; Richardson, 1967, Shimkin y Wyman, 1945*). Por otra parte, en los casos en los que la prolactina acentuaba la tumorigénesis mamaria en hembras deficientes de hormonas sexuales, los trabajos se realizaron en animales adultos que ya tenían un gran número de displasias mamarias. Por lo tanto la prolactina podría solamente promover el crecimiento de células ya transformadas. Sin embargo, aunque esta hormona parece ser fundamental durante los eventos tempranos de la tumorigénesis mamaria en el ratón, su presencia no sería relevante en el crecimiento de tumores espontáneos avanzados. En cepas como C3H, las neoplasias mamarias evolucionarían a partir de estadios dependientes a estadios independientes de la prolactina. Este proceso es mucho más frecuente en el ratón que en la rata (*Welsch y Nagasawa, 1977*).

Hasta el presente no se ha demostrado que las hormonas hipofisarias puedan inducir tumores de mama tempranamente en animales sin esteroides sexuales. Aún en el desarrollo de la mama normal, el rol mamotrófico de la prolactina podría estar mediado por su actividad luteotrófica, o sea por la progesterona (*El Etreby y col., 1979*). Se ha demostrado que ciertos progestágenos sintéticos son mucho más efectivos para estimular el crecimiento mamario que el benzoato de estradiol y/o la prolactina estimulada por el benzoato de estradiol. Por otra parte, tanto en ratas como en ratones los estrógenos estimulan la síntesis y

secreción de prolactina; la progesterona en cambio es mucho menos efectiva en este aspecto (*El Etreby y col.*, 1979). Esto sugiere que sería más probable que la prolactina estimulara la actividad mamotrófica de la progesterona y no que fuese ésta la que actuara indirectamente estimulando la secreción de prolactina.

Hormonas y MMTV

La capacidad tumorigénica del MMTV se caracteriza por ser marcadamente influenciada por hormonas. Esto se manifiesta de dos maneras: 1) en algunas cepas portadoras, el desarrollo de los tumores es modificado por los cambios hormonales que acompañan la preñez; y 2) los glucocorticoides modulan la expresión del genoma del MMTV a nivel de la síntesis del ARN (*Dickson y Peters*, 1983).

Estudios más recientes han demostrado que no sólo los glucocorticoides inducen la transcripción del MMTV sino que también lo hacen otros esteroides como progestágenos (*Cato y col.*, 1986; 1987) y andrógenos (*Cato y col.*, 1987; *Darbre y col.*, 1986) los cuales también inducen la transcripción del MMTV a nivel del promotor. En cambio, los estrógenos no son capaces de inducir la transcripción del MMTV en forma directa (*Cato y col.*, 1987; *Green y Chambon*, 1987).

En la cepa GR (portadora del MMTV en su genoma), se ha demostrado que tumores dependientes de la preñez que habían regresionado después del parto recrecían si las hembras eran tratadas con estrona y progesterona (*Van Nie y Thung*, 1965). Posteriormente se halló que en hembras vírgenes el tratamiento continuo con las mismas hormonas inducía la aparición de tumores de mama hormono-dependientes aunque esta dependencia se perdía a través de los pasajes (*Sluyser y Van Nie*, 1974). Estos informes indicaban que existía una estrecha relación entre hormonas esteroides y MMTV, relación que será luego discutida en más detalle.

Hormonas y carcinógenos químicos

La preñez o pseudopreñez generalmente acentúa el efecto de los carcinógenos químicos en muchas especies murinas (*Marchant*, 1961; 1963). Lin y col. (1976) demostraron que en BALB/c la estimulación previa de las glándulas mamarias con prolactina, insulina, aldosterona y cortisol, *in vitro*, y el tratamiento subsecuente con DMBA era suficiente para permitir cambios hiperplásicos en los cultivos que fueron indistinguibles de los las lesiones HAN observados *in vivo*. Parecería por lo tanto, que las hormonas mamotróficas incrementan la sensibilidad de la glándula a la acción de los carcinógenos químicos.

En la rata, las hormonas ováricas son esenciales para la transformación del epitelio mamario durante la inducción de tumores de mama por agentes tales como DMBA o el MCA (*Clemens y Shaar*, 1962; *Dao*, 1962; *Talwalker y col.*, 1964; *Welsch y col.*, 1968, 1975). La ovariectomía de animales con tumores mamarios inducidos por carcinógenos químicos, resulta en una abrupta y prolongada regresión de los tumores (*Dao y Sunderland*, 1959; *Huggins y col.*, 1959; *Welsch*, 1971) y el crecimiento tumoral no progresa a menos que los ovarios sean reimplantados.

Existen también otras evidencias que indicarían que la progesterona podría desempeñar un papel importante en el desarrollo de las neoplasias mamarias. Por ejemplo, la administración de progestágenos podría tanto aumentar como disminuir la incidencia de tumores mamarios inducidos por carcinógenos químicos dependiendo del momento y duración del tratamiento con respecto a la administración del carcinógeno (*Jabara*, 1967; *Jabara y col.*, 1973).

En el modelo tumoral ovario-dependiente MXT que se desarrolló a partir de un tumor de mama de ratón C57BL/DBA2 FI tratado con uretano con una hipófisis implantada en la cápsula renal, se demostró que pequeñas cantidades de progesterona aumentaban la proliferación de las células tumorales (*Watson y col.*, 1979).

PROGESTERONA Y PROGESTÁGENOS

Secreción y metabolismo de la progesterona

La progesterona es secretada por el ovario, principalmente a partir del cuerpo lúteo durante la segunda mitad del ciclo estral. Si el óvulo es fertilizado, durante la primera etapa de la preñez el trofoblasto secreta la gonadotrofina coriónica que permite la continuidad funcional del cuerpo lúteo. Posteriormente, la placenta comienza a secretar progesterona en grandes cantidades. Las concentraciones crecientes son de fundamental importancia para mantener la preñez. La progesterona también se sintetiza en testículo y corteza adrenal.

En general, la actividad de la progesterona es modulada por los estrógenos que pueden actuar tanto en forma sinérgica como antagónica. El antagonismo estradiol-progesterona es particularmente evidente a nivel de las mamas. Experimentalmente, cuando se administran grandes dosis de estrógenos se observa una proliferación tubular, dilatación de los conductos y fibrosis. En cambio cuando la progesterona es administrada junto con el estradiol se produce un desarrollo completo y normal de las mamas en hembras ovariectomizadas (*Mauvais-Jarvis*, 1983). Se ha informado que pacientes con tumores de mama benignos tienen un funcionamiento luteal inadecuado caracterizado por una relación progesterona/estradiol significativamente menor que la normal (*Mauvais-Jarvis*, 1983). Basándose en estos informes, algunos grupos han propuesto una interpretación patofisiológica de la epidemiología del cáncer de mama humano en términos de una insuficiencia en la etapa luteal (*Koreman*, 1980; *Mauvais-Jarvis*, 1983). Además, estudios epidemiológicos han relacionado el uso de anticonceptivos progestagénicos administrados antes de un embarazo a término con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama (*Pike y col.*, 1981; 1983) o de cuello de útero (*WHO*, 1984).

ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA (MPA)

El MPA es un progestágeno sintético derivado del pregnano (17- α -acetoxiprogesterono-

na). En general, los progestágenos se unen con alta afinidad a los receptores de progesterona y, con menor afinidad, a los receptores de andrógenos, estrógenos y glucocorticoides.

Los derivados del pregnano, en particular el MPA, tienen una alta actividad antiestrogénica, muy parecida a la de la progesterona (*Tseng y Gurpide, 1975*). Sin embargo, existen estudios que indican que el MPA puede tener propiedades estrogénicas, como la estimulación de la secreción de prolactina en mujeres tratadas con este progestágeno (*El Etreby y col., 1979*). Por otra parte, el MPA también puede tener actividad androgénica al unirse a los receptores de testosterona. En las glándulas salivales de ratones hembras y machos castrados esto produce un aumento de la síntesis del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (*Bullok y col., 1975*).

a) **Usos clínicos**

El MPA es administrado en el tratamiento de la amenorrea secundaria, metrorragia uterina disfuncional y endometriosis (*Murad y Guilman, 1975*). En algunos países se lo usa como anticonceptivo y también para prevenir abortos espontáneos recurrentes; para el tratamiento de la dismenorrea, tensión premenstrual, infertilidad luteal, pubertad precoz y diagnóstico de embarazo (*Sun, 1984*). El MPA también se emplea en el tratamiento de carcinomas de mama, endometrio, próstata, ovario y células renales (*Campio y col., 1983*). En pacientes con cáncer de mama avanzado, el tratamiento con dosis altas de MPA ha sido muy efectivo, obteniéndose respuestas positivas en un 30-50% de los casos (*Cortés Funes y col., 1983; Ganzina, 1979; Schulz y col., 1985*). Se observó además que la eficacia de la terapia está en relación directa con la presencia de RE (*Schulz y col., 1985*).

Se han propuesto diversos mecanismos para explicar la actividad terapéutica del MPA sobre el cáncer de mama avanzado. Fundamentalmente, su acción antitumoral se debería a: 1) su interacción con otras hormonas circulantes y 2) un efecto inhibitorio celular directo:

1) **Interacción con hormonas circulantes: estrógenos y andrógenos:** En los tumores de mama hormono-dependientes, los estrógenos estimularían el crecimiento tumoral y los andrógenos adrenales pueden ser aromatizados y convertidos en estrógenos en el tejido adiposo. Por lo tanto la disminución de los niveles circulantes de ambas hormonas son importantes en la terapia antitumoral.

La acción antiestrogénica del MPA tiene lugar: a) bloqueando la secreción de gonadotropinas, actuando a nivel de la hipófisis; b) bajando las concentraciones de estradiol intracelular, por su capacidad de aumentar la actividad de la enzima E_2 -deshidrogenasa; c) reduciendo la transformación de andrógenos a estrógenos al inducir la $5-\alpha$ -reductasa hepática que acelera el catabolismo de los andrógenos (*Robustelli Della Cuna y Preti, 1986*).

La acción antiandrogénica la ejerce a través de la disminución de los niveles de testosterona circulante por: a) inhibición de la secreción de la hormona luteinizante (LH) hipofisaria; b) aceleración del metabolismo de la testosterona a través de la inducción de la $5-\alpha$ -reductasa hepática (*Robustelli Della Cuna y Preti, 1986*).

2) **Efectos a nivel celular:** El MPA se une con alta afinidad a los RP, bloquea la síntesis de los RE y se une, con menor afinidad, a los receptores de andrógenos y corticosteroides. Además se han propuesto efectos citotóxicos directos no mediados por mecanismos endócrinos, que explicarían la actividad inhibitoria de dosis altas de MPA sobre tumores hormono-independientes (*Schulz y col., 1985*).

In vitro se observó que el MPA inhibe en más de un 80% la unión del 17- β -estradiol a su receptor y que regula negativamente los RP (*Robustelli Della Cuna y Preti, 1986*). Para superar esta regulación negativa, que llevaría a una resistencia al tratamiento, se propone el uso de terapias secuenciales con estrona o tamoxifeno (*Namer y col., 1980*).

b) **Actividades carcinogénicas y teratogénicas descritas en modelos experimentales.**

En diversos sistemas experimentales, el tratamiento con MPA produjo un aumento en la incidencia tumoral. En perros "beagle" su administración indujo un aumento en el número de hiperplasias lobulillares y las tres cuartas partes de los perros tratados con dosis altas de MPA desarrollaron tumores con metástasis mientras que en los controles ningún animal presentó tumores malignos (*Concannon y col., 1980, Frank y col., 1979*). También en monos rhesus se observó la aparición de carcinomas endometriales luego de la administración de dosis altas de MPA (*Sun, 1984*). En los tumores mamarios de rata inducidos por DMBA, un modelo clásico para el estudio de la dependencia hormonal del cáncer de mama, el tratamiento con MPA dio lugar a resultados controvertidos. Danguy y col.(1980) demostraron que la administración de dosis altas de MPA inhibía el crecimiento tumoral mientras que dosis bajas tenían el efecto opuesto. En cambio, Russo y col. (1989) han informado que el MPA no sólo no protegía de la tumorigénesis química cuando se utilizaban dosis similares a las usadas para la anticoncepción, sino que además, cuando la dosis se aumentaba 10 veces, la diferenciación de la glándula mamaria se inhibía con el consecuente aumento de la incidencia tumoral. Por otra parte, el MPA también aumentó la incidencia tumoral en la cepa SHN que es portadora del virus MMTV (*Nagasawa y col., 1988*).

En monos (*Macaca fascicularis*) se comprobó que la administración de una única dosis de 25 mg/kilo o de 100 mg/kilo a hembras preñadas tuvo efectos tóxicos específicos sobre los embriones. Tanto en los fetos de sexo femenino como masculino ambas dosis causaron anomalías en los genitales externos y en presencia de la dosis más alta se observó hipoplasia y/o atrofia de las adrenales (*Prahdala y col., 1985*).

MODELO EXPERIMENTAL

En nuestro laboratorio se demostró que el tratamiento con MPA inhibía la tumorigénesis por cuerpo extraño en ratones de la cepa BALB/c (*Lanari y col.*, 1986a). Inesperadamente, en el curso de esa investigación, se registró una alta incidencia de adenocarcinomas de mama en las pocas hembras tratadas con MPA. Tomando como base esa observación, se diseñó un experimento para comprobar si el MPA tenía capacidad carcinogénica en esta cepa. Durante un año se inocularon 40 mg de MPA depot cada dos meses a hembras vírgenes y el resultado fue la aparición de tumores de mama con una incidencia actuarial del 76% y una latencia media de 52 ± 2 semanas (*Lanari y col.*, 1986b).

El análisis histológico reveló que se trataba de carcinomas ductales, en su mayoría quísticos, infiltrativos y con distintos grados de diferenciación (*Molinolo y col.*, 1987). En algunos casos los animales presentaban metástasis ganglionares y pulmonares (*Lanari y col.*, 1986b).

Las lesiones preneoplásicas detectadas fueron, en su mayoría, displasias y carcinomas *in situ* de origen ductal (*Molinolo y col.*, 1987). Como se mencionó anteriormente, en los ratones portadores o infectados con MMTV las lesiones preneoplásicas más frecuentes son de origen lobulillar (*Nandi y McGrath*, 1973), mientras que en los animales tratados con carcinógenos químicos predominan las lesiones ductales (*Medina*, 1976; *Medina y Werner*, 1977). Por lo tanto, las alteraciones morfológicas que produjo el MPA en la glándula mamaria fueron más parecidas a las inducidas por los carcinógenos químicos que por el MMTV.

Los niveles de RP y/o RE en los tumores inducidos por MPA fueron superiores a los detectados en tumores de mama espontáneos de hembras multíparas; en cambio, los niveles de receptores para prolactina fueron similares. Los niveles de receptores para EGF en tumores espontáneos fueron significativamente más altos que en los inducidos por MPA (*Molinolo y col.*, 1987).

Algunos de los adenocarcinomas inducidos por MPA fueron transplantados en hembras BALB/C vírgenes sin tratamiento hormonal. Los tumores que crecieron a partir de estos trasplantes tuvieron un período de latencia de 4 a 12 meses y dieron origen a 6 líneas tumorales que se mantuvieron por sucesivos pasajes en hembras tratadas y no tratadas con MPA. Estas líneas se clasificaron en autónomas (MPA-I) y dependientes de MPA (MPA-D) según la respuesta de los tumores transplantados al tratamiento hormonal. En las líneas MPA-I los ratones, tratados o no con MPA, presentaban tumores de gran tamaño ($>400 \text{ mm}^2$) a los 2 meses del pasaje. En las líneas MPA-D los tumores de los animales sin MPA alcanzaban tamaños muy pequeños ($<150 \text{ mm}^2$) aún 6 meses después de transplantados. Además, entre los animales tratados y no tratados con MPA, existían diferencias significativas tanto en la latencia de aparición como en el tamaño de los tumores (*Lanari y col.*, 1989).

OBJETIVOS

A) **Caracterización de la hormonodependencia de las líneas tumorales originadas en los tumores inducidos por MPA.** Estudios de crecimiento tumoral *in vivo*:

1. Estudiar la capacidad regulatoria del MPA sobre tumores MPA-D que han permanecido largo tiempo en animales sin tratamiento hormonal.
2. Estudiar la influencia de la ovariectomía en el crecimiento de tumores MPA-D y MPA-I.
3. Determinar si el efecto estimulador de que ejerce el MPA sobre las líneas MPA-D se debe a su actividad progestagénica.
4. Estudiar el efecto de los estrógenos sobre el crecimiento de tumores MPA-D y MPA-I.
5. Determinar si el EGF proveniente de las glándulas salivales tiene capacidad regulatoria sobre el crecimiento de estas líneas tumorales.

B) **Inducción de adenocarcinomas de mama por progestágenos**

1. Estudiar el efecto del tratamiento con MPA en una cepa con alta incidencia de tumores de mama espontáneos (C3H).
2. Determinar si factores provenientes de los ovarios y/o las glándulas salivales modifican la capacidad carcinogénica del MPA en hembras BALB/c.

3. Determinar si la progesterona también tiene capacidad carcinogénica sobre las mamas de hembras BALB/c vírgenes.
4. Caracterizar morfológicamente y estudiar la hormono-dependencia de los tumores inducidos.

MATERIALES

Y

MÉTODOS

ANIMALES

En todos los experimentos *in vivo* mostrados en este trabajo se utilizaron ratones BALB/c nacidos en nuestro bioterio, a excepción de un experimento de inducción tumoral, que se realizó en ratones de la cepa C3H. Todos los animales tenían más de 2 meses de edad y fueron mantenidos con agua y comida *ad libitum*, con 12 horas de luz y oscuridad.

HORMONAS UTILIZADAS Y FORMAS DE ADMINISTRACIÓN

- a) Suspensión microcristales de acetato de medroxiprogesterona de liberación lenta (MPA depot) (Farlutale 500, Farmitalia). Se utilizó una dosis de 40 mg (0,2 ml.). En los pasajes tumorales, la hormona se inoculó subcutáneamente el mismo día (salvo en los casos que se indica especialmente) y en el flanco contrario al trasplante. El protocolo de los experimentos de inducción se indica más abajo.

- b) Pellets de silastic (Dr. E. Montuori, Laboratorios Dr. Gador, Argentina) conteniendo las siguientes hormonas:
 - 1) 40 mg de acetato de medroxiprogesterona (MPA) (Laboratorios Dr. Gador, Argentina).
 - 2) 40 mg de progesterona (P) (Schering).
 - 3) 35, 5 ó 0,5 mg de benzoato de estradiol (BE) (Sigma).
 - 4) 5 ó 0,5 mg de 17- β -estradiol (E_2) (Laboratorios Gador, Argentina).

Los pellets se implantaban subcutáneamente, la semana previa al pasaje tumoral.

MANIPULACIONES QUIRÚRGICAS

En distintos experimentos se realizaron extirpaciones de ovarios, glándulas salivales submaxilares o extirpaciones simuladas (sham), 5 a 7 días antes del trasplante tumoral. En

todos los casos los ratones fueron anestesiados con embutal por vía intraperitoneal.

ESTUDIOS DE RECEPTORES HORMONALES

Compuestos utilizados

[2,4,6,7-³H] Estradiol (E₂) (85 Ci/mmol) y 17 [α -metil ³H] R5020 (87 Ci/mmol) se obtuvieron de New England Nuclear Corp., Boston MA. Los esteroides no marcados [dietilbestrol (DES), cortisol, dihidrotestosterona (DHT), R5020], y Tris-base, ditioneitol (DTT), y EDTA disódico se obtuvieron de Sigma Chemical Co., St Louis, MO.

Procesamiento de los tumores

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

Medición de receptores de estrógenos y progesterona por la técnica de precipitación con carbón dextrano

Este método está basado en el original descrito por Korenman y Dukes (1970), modificado por Calandra y col. (1980). Alícuotas de 100 μ l de citosol fueron incubadas, por duplicado, con una serie de concentraciones de (³H)E₂ (0.2-30nM) o (³H)R5020 (0.2-30nM),

con o sin un exceso de 100 veces en molaridad de DES o R5020. La unión inespecífica del E₂ y el R5020 a la SHBG o a la proteína ligadora de cortisol fue eliminada mediante el agregado de un exceso de 200 veces en molaridad de DHT y cortisol respectivamente. Para analizar los datos se usaron gráficos de Scatchard (*Scatchard, 1949*). En otros casos, los ensayos fueron realizados con una concentración única de saturación. Tanto para estrógenos como para R5020 los resultados se expresaron en fmoles/mg de proteína.

ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

Para los estudios histológicos las muestras se fijaron en metanol para ser luego procesadas en alcoholes de gradación decreciente y xileno, y finalmente incluídas en parafina. Los tacos de inclusión se cortaron con micrótomo en láminas de 5 μ m , y se tiñeron con hematoxilina-eosina.

En los experimentos de inducción se utilizó la técnica del montaje total para observar el efecto de los tratamientos hormonales sobre las glándulas mamarias completas. Los pasos principales de esta técnica que permite colorear diferencialmente las estructuras mamarias son:

- 1) disección de las glándulas mamarias de la piel y músculo adyacentes;
- 2) fijación en formalina buffereada neutra;
- 3) hidratación en alcoholes de gradación decreciente;
- 4) tinción con azul de toluidina en buffer de Mc Ilvaine;
- 5) deshidratación en alcoholes de gradación creciente;
- 6) aclaración en xilol;
- 7) montaje con bálsamo.

Luego de la observación al microscopio, se eligieron ciertas áreas que se incluyeron en parafina y colorearon con hematoxilina-eosina según técnicas de rutina. Las muestras se

fotografiaron en un fotomicroscopio.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los resultados se expresaron como la media \pm error standard. Para comparar las latencias de aparición y tamaños tumorales se utilizó el test de "t" de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un $p < 0,05$.

En los experimentos de inducción, la distribución del tiempo libre de progresión o la incidencia actuarial se analizó mediante el producto del límite de Kaplan y Meier (1958). La diferencia entre los tratamientos se evaluó mediante el log-rank test (*Colton, 1974; Peto y col., 1978*), cuando en cada grupo experimental sobrevivía por lo menos un 10% de los animales.

La asociación entre los distintos tratamientos y las características morfológicas y la hormonodependencia de los tumores se analizó mediante el test de Chi^2 .

ESTUDIOS DE CRECIMIENTO TUMORAL *IN VIVO*

Mantenimiento y control de los trasplantes de adenocarcinomas de mama inducidos por MPA

Los adenocarcinomas de mama inducidos por MPA en hembras vírgenes BALB/c fueron transplantados en ratones singeneicos. Tal como se indica en el **MODELO EXPERIMENTAL**, a partir de 5 tumores primarios se establecieron 6 líneas tumorales (*Lanari y col., 1989b*). Los experimentos de regulación del crecimiento tumoral se realizaron en estas líneas tumorales. Como controles se utilizaron tumores de mama obtenidos de hembras multíparas BALB/c de nuestro bioterio.

Los pasajes tumorales se realizaron a través de trasplantes subcutáneos en la zona inguinal derecha del animal, mediante un trócar (trozos de 1 a 2 mm³), salvo en los casos en que se indica especialmente una suspensión celular determinada. Los tumores se midieron mediante un calibre Vernier cada 3 días (ancho y largo). En las curvas de crecimiento tumoral se consideró día 0 al día del trasplante tumoral y latencia de aparición tumoral al tiempo transcurrido entre el trasplante y la aparición de tumores palpables. Salvo en los experimentos que requerían de autopsias más tempranas, los animales fueron sacrificados cuando el tamaño de los tumores superaba los 400 mm² o después de 7 a 8 meses del trasplante tumoral.

Los tumores de los animales autopsiados se mantuvieron a -70°C para evaluar el contenido de receptores hormonales por el método bioquímico, como se detalló más arriba.

En los experimentos de progresión tumoral se utilizó principalmente la línea tumoral C7-HD porque, aunque el MPA estimula significativamente su crecimiento, los tumores también crecen lentamente en los ratones no tratados. Esta relativa autonomía permitió evaluar la participación de otros factores reguladores en el crecimiento de tumores MPA-D en ausencia de MPA.

Experimentos realizados con la línea C7-HD.

En los experimentos 1 al 6 los animales fueron inoculados con 10⁵ células tumorales.

1. Efecto del agregado de MPA 55 días después que el inóculo tumoral.

Veinticuatro ratones hembras fueron divididos en tres grupos de 8 animales cada uno: el grupo 1 recibió 40mg de MPA depot el mismo día del pasaje tumoral; el grupo 2 tuvo el mismo tratamiento hormonal 55 días más tarde y el 3 no fue tratado con hormonas.

2. Comparación del efecto de las distintas formas de administración del MPA.

Se dividieron 20 animales en 3 grupos: el grupo 1, de 8 ratones, fue inoculado con MPA depot; al grupo 2 (8 animales) se le implantó un pellet de MPA, el 3 fue el control no tratado.

3. Influencia de la remoción del pellet de MPA.

Este experimento se llevó a cabo en 12 animales de los cuales 8 fueron implantados con un pellet de MPA, mientras que 4 permanecieron como control, sin tratamiento hormonal. A 4 de los tratados se les retiró el pellet 40 días después del inóculo tumoral.

4. Influencia de la ovariectomía.

El experimento se realizó con 23 animales, 16 fueron implantados con pellets de MPA, 8 de ellos también estaban ovariectomizados; los 7 restantes no fueron inoculados con MPA, 3 de ellos estaban ovariectomizados.

5. Efecto de distintas hormonas en hembras ovariectomizadas.

De 27 hembras ovariectomizadas, 24 fueron sometidas a tratamiento hormonal mediante la implantación de pellets: 8 animales recibieron MPA, otros 8 progesterona (P); y 8 con benzoato de estradiol (BE). Las 3 hembras restantes corresponden a los controles no tratados. También se implantaron 5×10^5 células tumorales a 8 machos sin tratamiento hormonal.

6. Efecto de la remoción de los pellets de MPA o progesterona a hembras ovariectomizadas.

A 8 de las 16 hembras ovariectomizadas a las que se les había implantado un

pellet de MPA o P se les retiró el mismo a los 40 días después del inóculo tumoral.

7. Estudios de la respuesta al MPA de tumores surgidos en hembras ovariectomizadas provenientes del experimento anterior

- a. Se eligieron al azar cuatro de los tumores que habían retomado crecimiento en las hembras ovariectomizadas después de la remoción del progestágeno. Cada uno de estos tumores fueron transplantados en 8 ratones: 4 con MPA y 4 controles.
- b. El experimento 6) fue repetido usando un pasaje posterior de la línea en hembras ovariectomizadas, 4 de ellas tratadas con progesterona. Cuando los tumores retomaron su crecimiento después de la remoción del pellet, los animales fueron autopsiados: una parte de los tumores se usó para evaluar el contenido de RE y RP, y el resto fue transplantado. Cada tumor se pasó a 6 hembras (3 con MPA) y se controló la latencia de aparición de estos tumores.

8. Efecto de la sialoadenectomía.

Para evaluar el efecto de la sialoadenectomía en esta línea se utilizaron 35 animales divididos en 5 grupos: 1) sialoadenectomizados con MPA, 2) sialoadenectomizados sin MPA, 3) sham con MPA, 4) sham sin MPA.

9. Efecto de los estrógenos.

a. Efecto del implante de 35 mg de BE

Treinta y seis ratones fueron ovariectomizados y, salvo el Grupo 3 que corresponde al control, a todos se les implantó un pellet de 40 mg de progesterona 6 días antes de transplantar el tumor (día -6). Se implantaron además pellets de 35 mg de BE a distintos intervalos. Los grupos experimentales fue-

ron sometidos a los siguientes tratamientos hormonales: 1) con P hasta el final del experimento; 2) con P hasta el día 34; 3) sin tratamiento hormonal; 4) BE desde el día 34; 5) implante de BE y remoción de P el día 34; 6) BE desde el día -6; 7) BE desde el día -6 hasta el 77.

b. Efecto del implante de 5 y 0,5 mg de BE

Seis días antes del trasplante tumoral se ovariectomizaron 70 animales. Ese mismo día, 35 fueron implantados con P y otros 35 con MPA y, algunos de ellos, también con 0,5; 5 ó 35 mg de BE. Salvo los controles que permanecieron únicamente con los pellets de MPA o P, el resto recibió las mismas dosis de BE pero 46 días después del trasplante del tumor (n=4-6 por grupo).

c. Tumores resistentes a los estrógenos

Cinco tumores resistentes a algunos de los tratamientos estrogénicos mencionados en los puntos a. y b. se transplantaron para evaluar su respuesta a los tratamientos hormonales. Tres de estos tumores fueron pasados a 8 animales, 4 de ellos inoculados con 40 mg de MPA depot. Los otros dos fueron transplantados a 12 animales, 8 de los cuales se trataron previamente con: MPA (4) ó MPA y 35 mg de BE (4). Para denominar a los tumores resistentes a estrógenos, se usó el nombre de la línea parental más la letra R más un número correlativo (por ejemplo C7-HD-R1).

Experimentos realizados con la línea C4-HD

1. **Efecto del agregado tardío de MPA.**

Seis ratones recibieron el mismo día un trasplante de esta línea tumoral y

un inóculo de MPA depot, tres de estos animales recibieron un segundo inóculo 81 días más tarde. En este experimento como en el que sigue se graficó el crecimiento tumoral como porcentaje del tamaño máximo alcanzado después del primer inóculo hormonal.

2. Efecto del agregado tardío de MPA en animales ovariectomizados.

El tumor fue implantado en 3 hembras ovariectomizadas que contralateralmente recibieron 40 mg de MPA, 108 días más tarde los animales recibieron un segundo inóculo de la hormona. El tamaño tumoral fue evaluado de la misma forma que en el experimento anterior.

3. Efecto de la sialoadenectomía.

Once machos fueron sialoadenectomizados, 6 de ellos además fueron inoculados con 40 mg de MPA. Doce machos fueron sometidos a operaciones simuladas (sham), la mitad de los cuales también fueron inoculados con MPA. Todos los animales recibieron transplantes de tumores C4-HD por trócar.

4. Efecto de la administración de E_2 .

Seis días antes del transplante tumoral, 16 hembras fueron implantadas con pellets de 40 mg de MPA y se las dividió en cuatro grupos: 1) con 0,5 mg de E_2 desde el día -6 (n=4); 2) con 5 mg de E_2 desde el día -6 (n=4); 3) con 0,5 mg de E_2 desde el día 17 (n=4); 4) con 5 mg de E_2 desde el día 17 (n=4).

Tres tumores que tuvieron la capacidad de retomar crecimiento luego del tratamiento con 0,5 mg de E_2 fueron pasados. En el primer caso los 12 animales fueron divididos en tres grupos de 4 animales cada uno: 1) pretratado con MPA, 2) pretratado con MPA y 0,5 mg de E_2 y 3) con 0,5 mg de E_2 al día 71; el segundo tumor resistente se pasó a dos grupos de 3 animales cada uno: 1) pretratado con MPA y con 0,5

mg de E₂ desde el día 49, y 2) pretratado con MPA+0,5 mg de E₂; en el tercer caso el tumor se pasó a dos grupos de 3 ratones, uno pretratado con 0,5 mg de E₂ y el otro pretratado con MPA+0,5 mg de E₂.

Experimentos realizados con la línea D5-HD

1. Efecto de la administración tardía del MPA.

Ocho ratones recibieron un implante tumoral y 105 días más tarde la mitad fueron inoculados con 40 mg de MPA depot.

2. Crecimiento tumoral en machos.

Once machos, 6 de los cuales habían sido preinoculados con MPA y 10 hembras, 5 de ellas con MPA, fueron transplantados con tumor D5-HD.

3. Efecto de la sialoadenectomía en hembras.

Veinte hembras fueron separadas en cuatro grupos antes de recibir el implante tumoral: 1) inoculadas con MPA (n=6); 2) sialoadenectomizadas 6 días antes e inoculadas con MPA (n=4); 3) sialoadenectomizadas sin MPA (n=4); 4) controles sin MPA (n=6).

4. Efecto de la sialoadenectomía en machos.

Veintiséis machos fueron separados en cuatro grupos antes del trasplante tumoral y recibieron los siguientes tratamientos: 1) sialoadenectomizados con MPA depot (n=6); 2) sialoadenectomizados sin MPA (n=5), 3) sham con MPA (n=6); 4) sham sin MPA (n=5).

5. Efecto de la administración de BE.

Diez hembras fueron inoculadas con 40 mg de MPA depot el mismo día del trasplante tumoral; 20 días más tarde 4 de ellas fueron implantadas con un pellet de 35 mg de BE.

Experimentos realizados con la línea 5A

Efecto de la ovariectomía.

Veintitrés animales implantados con este tumor fueron divididos en 4 grupos: 1) con pellet de MPA ; 2) con pellet de MPA y ovariectomizados; 3) sin ningún tratamiento; 4) ovariectomizados sin MPA.

Experimentos realizados en la línea C7-HI

1. Efecto de la progesterona y crecimiento tumoral en machos.

Fueron inoculados con 3×10^6 células tumorales: 1) 5 hembras con pellets de MPA; 2) 6 hembras con P; 3) 6 hembras sin tratamiento hormonal; 4) 5 machos sin tratamiento hormonal.

2. Efecto de la sialoadenectomía.

Los animales se dividieron en 4 grupos: 2 de hembras con pellets de MPA, uno sialoadenectomizado y otro control, y 2 de machos sin MPA, uno sialoadenectomizado y otro control (n=6-8); tanto las sialoadenectomías como las operaciones sham de los controles se realizaron entre 14 y 8 días antes del trasplante tumoral. Todos los ratones fueron inoculados con 3×10^6 células tumorales.

3. Efecto del BE.

Se transplantó tumor C7-HI a 35 hembras. Cincuenta días más tarde, cuando los tumores superaban los 400 mm² y el 100% de los animales tenían metástasis pulmonares macroscópicas (*Bonfil y col.*, 1989), 3 grupos fueron implantados con 35, 5 ó 0.5 mg de BE; 2 grupos con 2 pellets: uno de MPA y otro de BE (5 ó 0,5 mg de BE) y un grupo permaneció sin control hormonal (n=5-6 por grupo).

Experimentos realizados en la línea D5-HI

Efecto de la ovariectomía.

Se dividieron 20 hembras en cuatro grupos, todos implantados con tumores D5-HI: 1) con MPA depot; 2) sin MPA; 3) ovariectomizados con MPA depot; 4) ovariectomizados sin MPA.

Experimentos realizados en la línea 55-HI

Efecto de la sialoadenectomía.

Dieciséis hembras, 8 sialoadenectomizadas y 8 controles, y 16 machos, 8 sialoadenectomizados y 8 controles fueron inoculados con $1,2 \times 10^5$ células tumorales. Las sialoadenectomías y las operaciones simuladas en los controles se realizaron 8 días antes del trasplante tumoral.

EXPERIMENTOS DE INDUCCIÓN DE ADENOCARCINOMAS DE MAMA POR PROGESTÁGENOS

Efecto del MPA sobre hembras de la cepa C3H

Treinta y seis ratones hembras de dos meses de edad de la cepa C3H fueron obtenidos de la Comisión Nacional de Energía Atómica y mantenidos en las mismas condiciones que los ratones de nuestro bioterio. Los animales fueron inoculados cada dos meses con 40mg de MPA depot subcutáneo durante 1 año. Los animales fueron controlados semanalmente para detectar la aparición de tumores. Como control se utilizaron 34 hembras vírgenes de la misma cepa inoculadas con excipiente. La dependencia hormonal y la presencia de receptores hormonales fue evaluada en los tumores que fueron transplantados en hembras singeneicas.

Efecto de la sialoadenectomía y de la ovariectomía sobre la capacidad tumorigénica del MPA depot.

Tres grupos de 48 hembras BALB/c vírgenes de 2 meses de edad fueron inoculadas cada 2 meses con 40 mg de MPA depot durante un año. El primero de estos tres grupos había sido previamente sialoadenectomizado, el segundo ovariectomizado, mientras que el tercero, sin tratamiento quirúrgico, permaneció como control. Como en el caso anterior, los animales fueron controlados semanalmente. Los animales portadores de tumores eran autopsiados y, siempre que fue posible, las muestras obtenidas de los tumores se destinaron a estudios histológicos y a la medición de receptores de estrógenos y progesterona. Las glándulas mamarias de estos animales fueron estudiadas por la técnica del montaje total. Además, los tumores se pasaron a animales singeneicos, inoculados y no inoculados con MPA para determinar su hormono-dependencia. En estos pasajes también se midió el contenido de receptores para las mismas hormonas.

Efecto de la progesterona sobre hembras BALB/c

Cuarenta y ocho hembras vírgenes BALB/c de dos meses de edad fueron implantadas con pellets de 40 mg de P al comienzo del experimento y seis meses más tarde se les agregó otro de 20 mg. Lo mismo se hizo con otras 48 hembras usando pellets conteniendo MPA en lugar de P. El procedimiento seguido durante el tratamiento de los animales y con los tumores surgidos en estos animales fue el mismo que en el experimento anterior.

RESULTADOS

**PASAJES SINGENEICOS DE LOS ADENOCARCINOMAS DE MAMA
INDUCIDOS POR MPA EN HEMBRAS BALB/c. ESTUDIOS SOBRE LA
REGULACION DEL CRECIMIENTO TUMORAL.**

Como se indica en **MODELO EXPERIMENTAL**, los trasplantes singeneicos de los adenocarcinomas de mama inducidos por MPA dieron origen a líneas tumorales que se clasificaron, según su patrón de crecimiento, en dos categorías: MPA-dependientes (MPA-D) y autónomas (MPA-I).

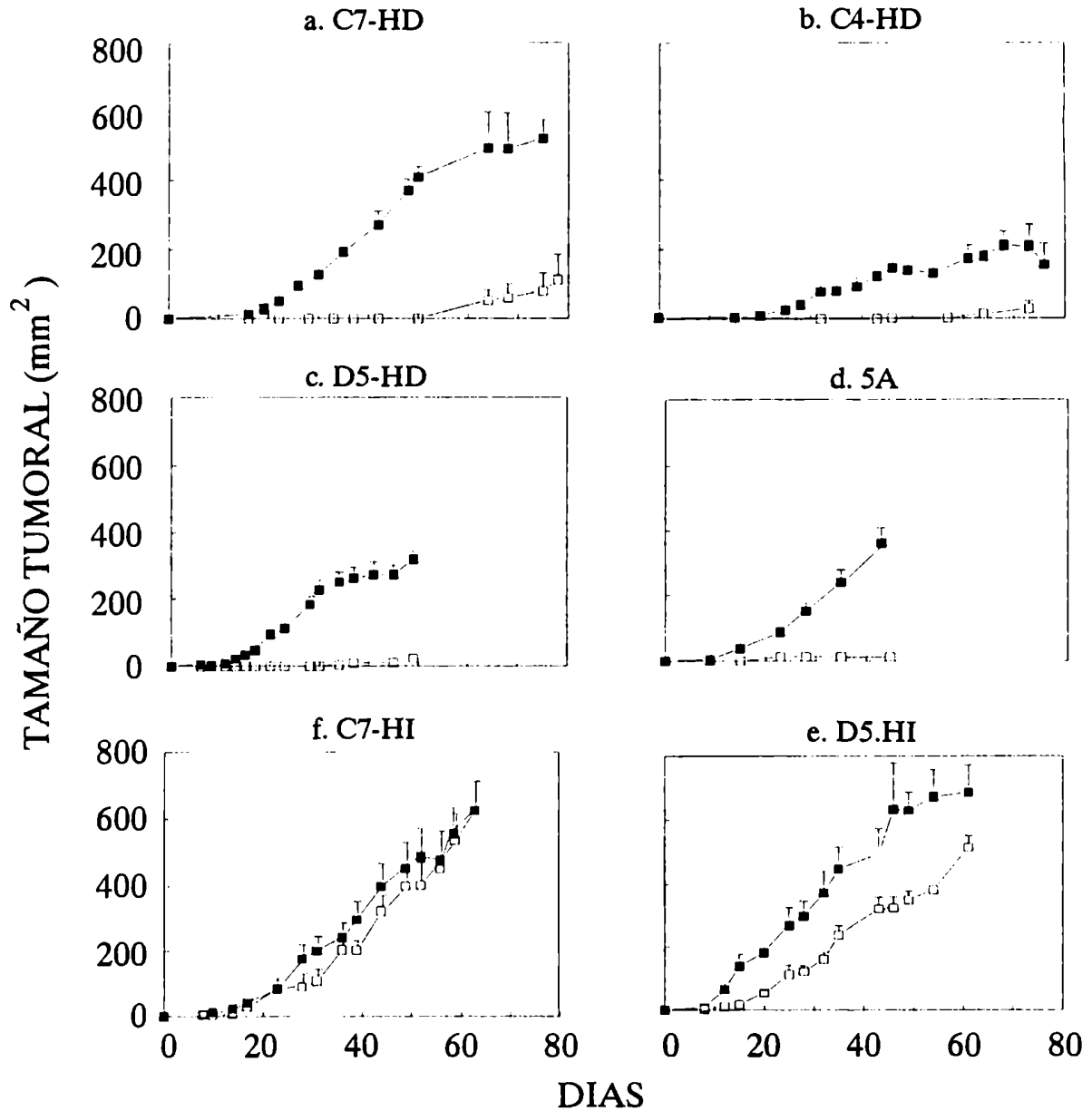
En los experimentos descriptos más abajo se utilizaron fundamentalmente 4 líneas MPA-D: C7-HD, C4-HD, D5-HD y 5A; y 2 MPA-I: C7-HI y D5-HI. La Figura 1 muestra las curvas de crecimiento de pasajes tempranos (pasajes 2 a 4) de estas líneas y las Tablas 1 y 2 sus latencias de aparición y la velocidad de crecimiento en ratones tratados o no con MPA.

Tanto los tumores MPA-dependientes como los autónomos expresaban receptores para estrógenos (RE) y progesterona (RP) (Tabla 3). Los gráficos de Scatchard realizados en la línea C7-HD con y sin MPA (Fig. 2) muestran que el tratamiento con MPA reducía significativamente el nivel de RP pero no modificó su constante de afinidad.

Para evaluar si el MPA podía regular el crecimiento de tumores de mama espontáneos, se utilizaron 3 adenocarcinomas de mama de hembras multíparas BALB/c de nuestro bioterio que fueron transplantados en hembras vírgenes tratadas o no con MPA. Estos tumores mostraron un comportamiento autónomo, aunque también aquí el MPA estimuló débilmente el crecimiento tumoral (Figura 3 y Tabla 4).

EFFECTO DE LOS SUCESIVOS PASAJES EN LAS LÍNEAS MPA-D

Figura 1



Crecimiento de 6 líneas tumorales *in vivo* derivadas de tumores inducidos por MPA, transplantadas en ratones tratados (■) y sin tratar (□) con MPA. En a), b), c) y d) se muestran las líneas en las que el tratamiento con MPA produce diferencias de tamaño estadísticamente significativas ($p < 0,05$); e) y f) corresponden a líneas tumorales autónomas.

Tabla 1
Latencia de aparición tumoral
(días)

Tumores	con MPA	sin MPA	p
C7-HD	19,0 ± 1,7	57,3 ± 2,7	≤ 0,01
C4-HD	19,6 ± 2,3	71,0 ± 14,0	≤ 0,01
D5-HD	11,1 ± 1,0	54,8 ± 5,6	≤ 0,01
5A	12,0 ± 1,7	46,0 ± 7,9	≤ 0,01
C7-HI	12,6 ± 2,4	15,8 ± 2,3	n. s.
D5-HI	9,3 ± 1,4	13,3 ± 3,6	n. s.

n.s. = no significativo

Tabla 2

Velocidad de crecimiento
Tumores MPA-D y MPA-I
Fase lineal de la curva de crecimiento

Tumores	tratamiento	velocidad* mm ² /días	r	cociente de veloc. con MPA/sin MPA
C7-HD (MPA-D)	con MPA	11,70 ± 0,53	0,99	3,18
	sin MPA	3,67 ± 0,41	0,98	
C4-HD (MPA-D)	con MPA	3,97 ± 0,25	0,98	6,26
	sin MPA	0,63 ± 0,06	0,96	
D5-HD (MPA-D)	con MPA	11,64 ± 0,60	0,99	19,00
	sin MPA	0,61 ± 0,05	0,97	
5A (MPA-D)	con MPA	8,82 ± 1,05	0,98	27,45
	sin MPA	0,32 ± 0,06	0,89	
C7-HI (MPA-I)	con MPA	11,48 ± 0,73	0,99	1,01
	sin MPA	11,27 ± 0,74	0,97	
D5-HI (MPA-I)	con MPA	13,94 ± 0,62	0,99	1,42
	sin MPA	9,78 ± 0,45	0,99	

*pendiente de la regresión lineal
r: coeficiente de correlación

Tabla 3

RE y RP en tumores MPA-D, MPA-I y espontáneos

Tumor	tratamiento	RE ^a	RP ^a
C7-HD	con MPA (n=6)	60 - 123	24 - 106
	sin MPA (n=6)	35 - 109	222 - 640
C4-HD	con MPA (n=4)	81 - 178	72 - 465
	sin MPA (n=4)	78 - 234	64 - 498
D5-HD	con MPA (n=2)	29 - 65	77 - 87
	sin MPA (n=4)	15 - 70	89 - 797
5A	con MPA (n=3)	45-63	83-179
C7-HI	con MPA (n=2)	31 - 36	0 - 6
	sin MPA (n=6)	0 - 75	0 - 383
D5-HI	con MPA (n=3)	25 - 47	90 - 119
	sin MPA (n=3)	16 - 31	108 - 198
tumores espontáneos *	sin MPA (n=5)	0 - 40	0 - 18

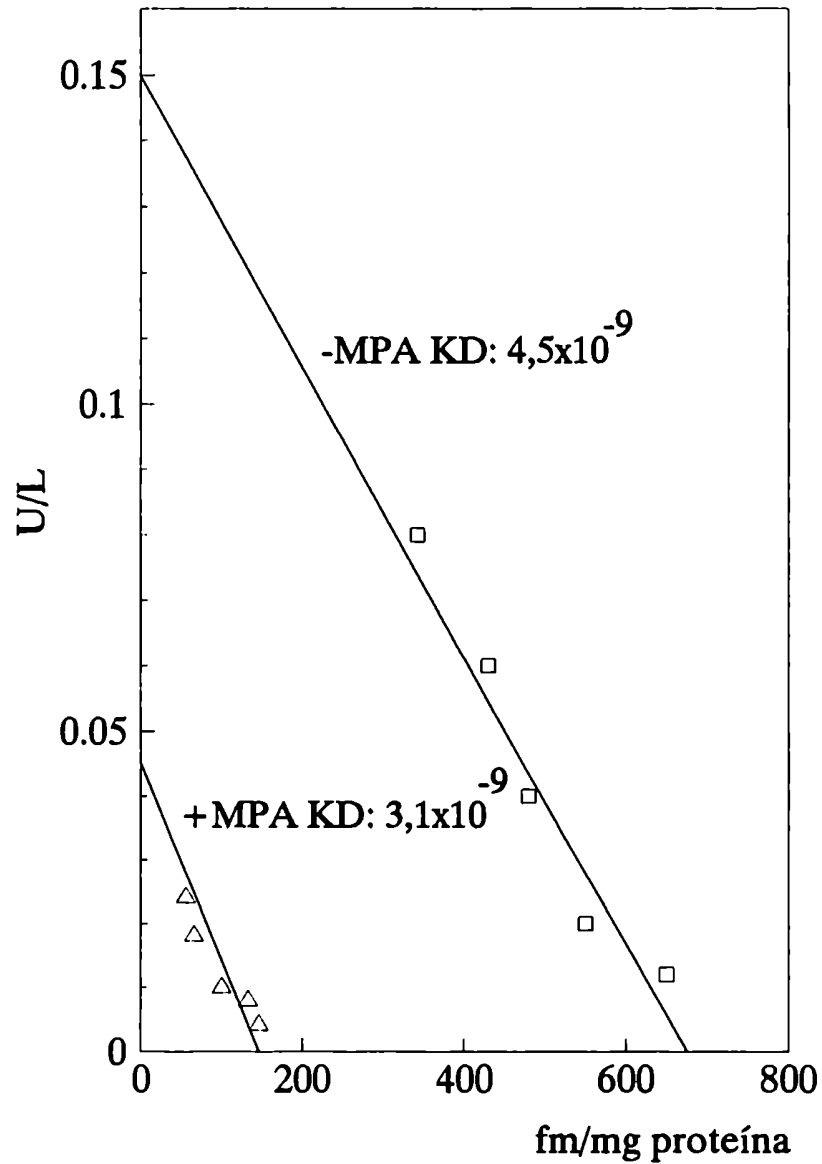
RE: receptores de estrogénos

RP: receptores de progesterona

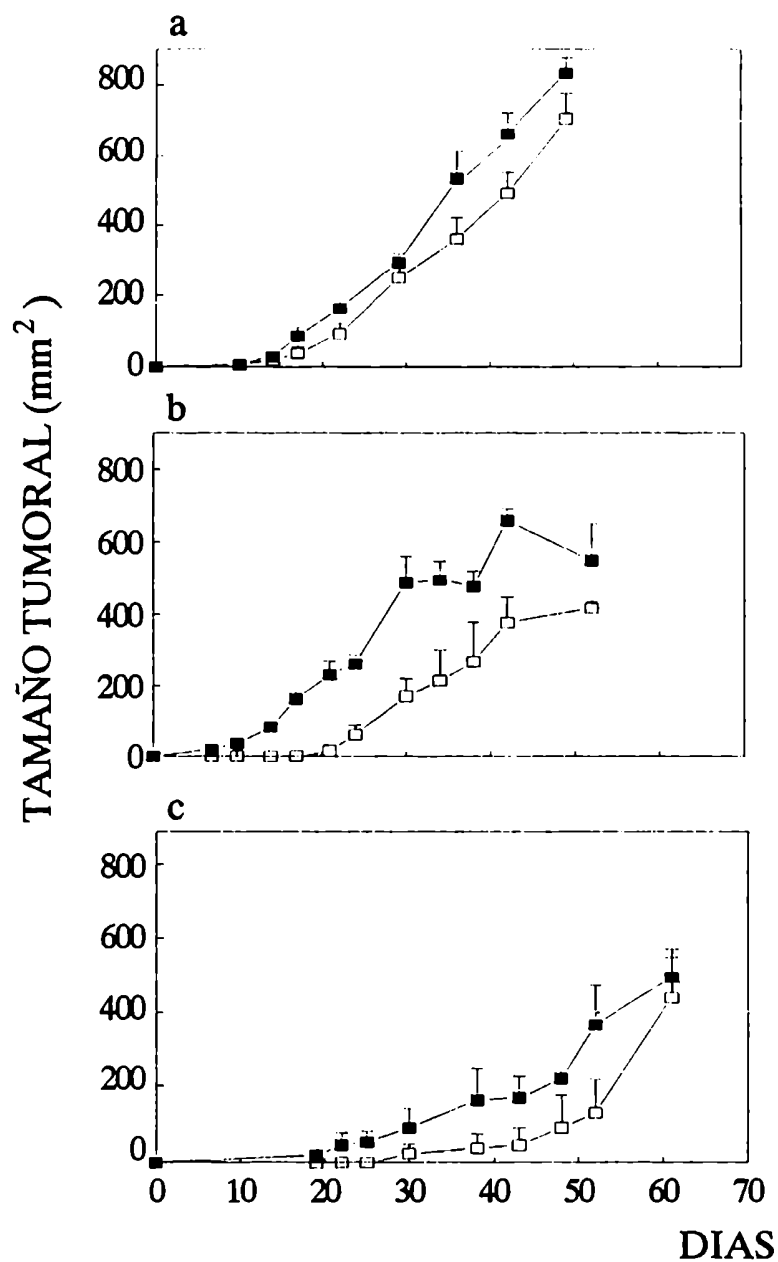
* tumores de hembras múltíparas del bioterio

a: fentomoles/mg prot (rango)

Figura 2



Gráficos de Scatchard para los receptores citosólicos de progesterona de la línea C7-HD en animales tratados (Δ) o no (\square) con MPA.

Figura 3

Crecimiento tumoral de transplantes de 3 adenocarcinomas de mama espontáneos en ratones BALB/c tratados (□) o no (■) con MPA.

Tabla 4

Pasajes de tumores de mama espontáneos
en la fase lineal de la curva de crecimiento

Adenocarcinomas de mama espontáneos		velocidad (mm ² /días)	r	cociente de veloc. con MPA/sin MPA
1	con MPA	22,16 ± 1,19	0,99	1,24
	sin MPA	17,88 ± 1,41	0,98	
2	con MPA	15,06 ± 1,78	0,94	1,09
	sin MPA	13,76 ± 1,27	0,98	
3	con MPA	10,74 ± 1,22	0,96	1,04
	sin MPA	10,31 ± 3,07	0,83	

* pendiente de la regresión lineal

r: coeficiente de correlación

p: T de Student velocidad de crecimiento con MPA vs sin MPA

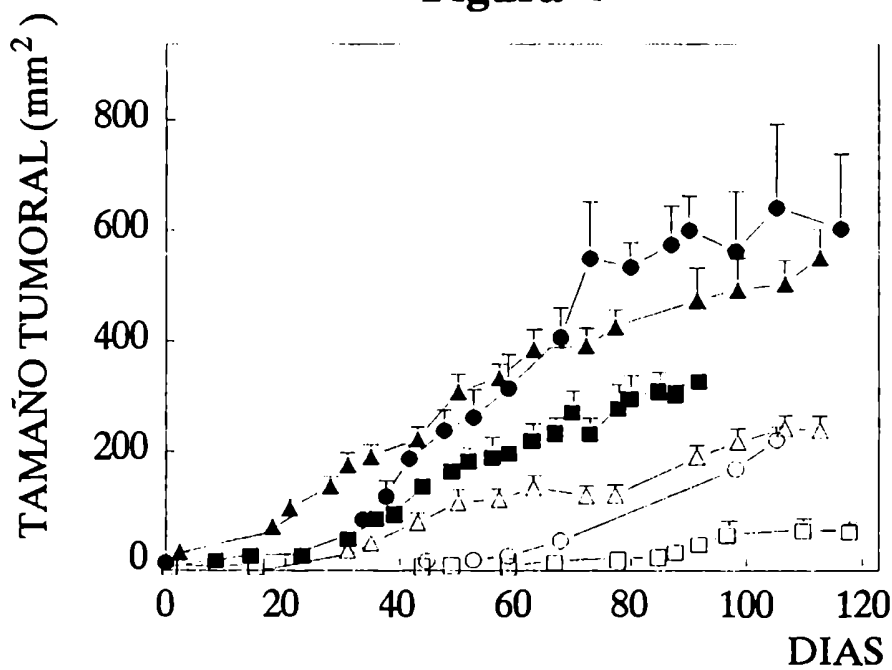
A través de los sucesivos pasajes las líneas MPA-D crecían cada vez más rápido tanto en presencia como en ausencia de MPA aunque conservaban la capacidad de responder a la estimulación hormonal. Estos cambios fueron más o menos abruptos dependiendo de la línea. En la C7-HD esta progresión fue relativamente rápida, en la Figura 4 se muestra cómo se modificaron las curvas de crecimiento a través de los pasajes 2, 4 y 5.

EFFECTO DEL AGREGADO TARDÍO DEL MPA EN LÍNEAS MPA-D

El objetivo de los experimentos descritos en esta sección fue comprobar si las células de las líneas tumorales MPA-D transplantadas en ratones sin tratamiento hormonal conservaban, a largo plazo, la sensibilidad al MPA.

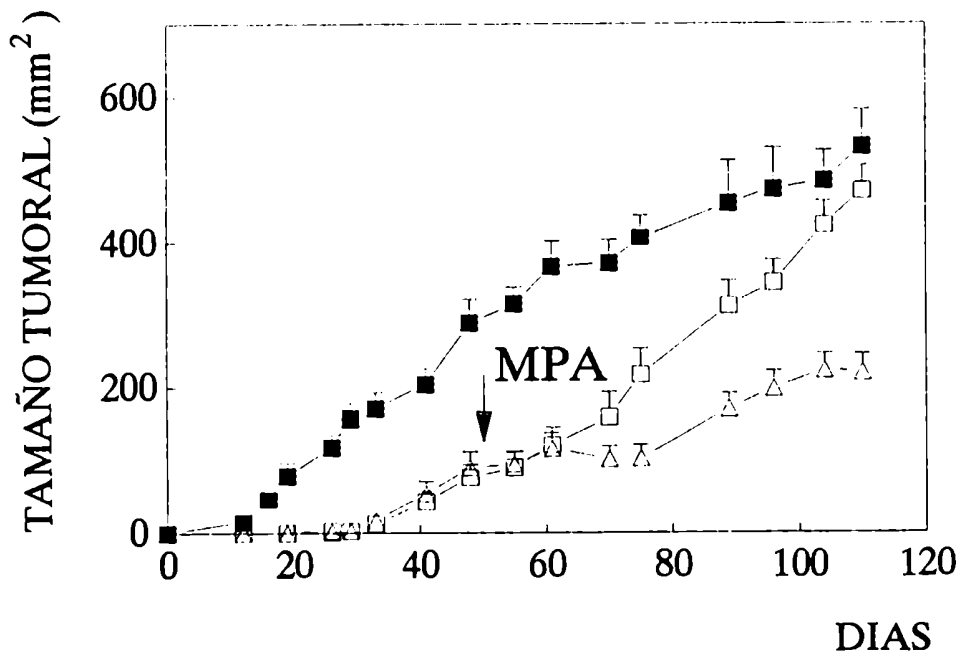
En el primer experimento de esta serie se utilizó la línea C7-HD y la Figura 5 muestra el efecto que tuvo la inoculación de 40 mg de MPA depot 55 días después del pasaje tumoral en animales sin tratamiento hormonal previo. Tratándose de una línea MPA-D, en los animales sin tratamiento hormonal los tumores aparecieron más tarde ($p < 0,001$) y el tamaño de los tumores fue menor ($p < 0,05$ hasta el día 96) que en los animales inoculados con MPA desde el principio. Los tumores respondieron al tratamiento con MPA aún cuando la hormona fue administrada 55 días después del pasaje. En la Figura 5 se observa que la velocidad de crecimiento tumoral en este grupo empezó a aumentar a los 5 días de inoculada la hormona, alcanzando una diferencia de tamaño significativa respecto de los controles ($p < 0,01$) a los 20 días. Como resultado de la aceleración del crecimiento tumoral, el tamaño de los trasplantes del grupo inoculado el día 55 fue acercándose a los del grupo con MPA desde un principio, hasta que al día 104 las diferencias de tamaño tumoral entre ambos grupos dejaron de ser significativas ($p < 0,05$). El agregado de MPA modificó significativamente la velocidad de crecimiento del tumor ($p < 0,0001$): la pendiente de la regresión lineal de la curva de crecimiento fue de $3,50 \pm 0,23$ antes de la inoculación con MPA, y de $7,20 \pm 0,28$ después de la misma. Esta modificación de la velocidad de crecimiento tumoral también se observa al comparar con los controles: antes del inóculo de la

Figura 4



Crecimiento de tumores de la línea C7-HD en el pasaje 2 (□-■), 4 (○-●) y 5 (△-▲), en animales tratados (■-●-▲) o no (□-○-△) con MPA.

Figura 5



Crecimiento tumoral en animales con MPA inoculado antes del pasaje (■), ó 55 días más tarde (□), o sin tratamiento hormonal (△). A partir del día 75 las diferencias de tamaño entre el grupo tratado desde el día 55 y los controles son estadísticamente significativas ($p < 0,001$). A partir del día 104 las diferencias de tamaño entre los dos grupos con MPA dejan de ser estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

hormona no había diferencias significativas (velocidad de crecimiento de los controles hasta el día 55: $3,83 \pm 0,44$); después del agregado del MPA las diferencias de velocidad se hacen extremadamente significativas ($7,20 \pm 0,28$ vs $2,80 \pm 0,43$; $p < 0,0001$).

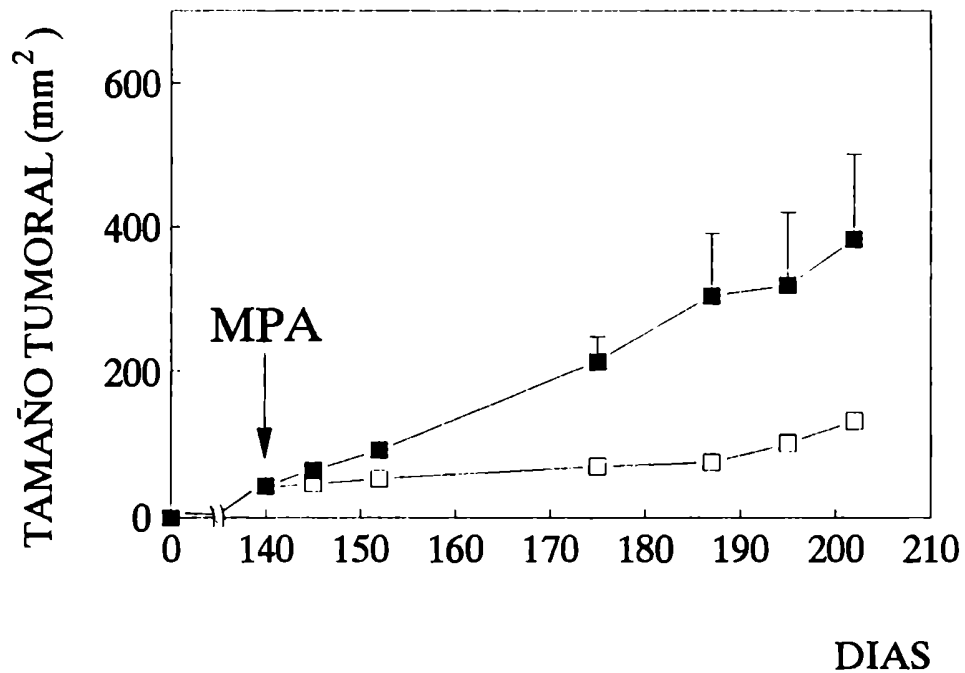
El siguiente experimento se llevó a cabo en la línea D5-HD. Ciento cuarenta días después del pasaje los tumores de los animales sin tratamiento hormonal eran apenas palpables. Para averiguar si las células tumorales eran aún susceptibles a la estimulación por MPA, la mitad de los ratones recibieron en ese momento 40 mg de MPA depot. Este tratamiento estimuló el crecimiento de los tumores: 12 días más tarde el tamaño tumoral en los animales con MPA era significativamente mayor que en los controles ($p < 0,01$) (Fig. 6).

En otras cuatro líneas MPA-D, los ratones sin MPA no mostraban tumores palpables 255 días después del pasaje. En ese momento se les inoculó la hormona a la mitad de los animales y solamente en estos ratones se observó la aparición y crecimiento de tumores (Fig. 7). Estos resultados muestran que en animales sin tratamiento hormonal los tumores MPA-D pueden permanecer largo tiempo en estado de quiescencia sin perder su capacidad respondedora.

En la línea C4-HD se observó que en ratones tratados con MPA el crecimiento de los tumores se detuvo alrededor de 70 días después del pasaje (Fig. 1b y Fig. 8). Si al día 81 los animales eran reinoculados con MPA, los tumores volvían a crecer (Fig. 8), sugiriendo que el estancamiento del crecimiento se debía a la depleción de la hormona circulante. Esto demostró que las células no sólo seguían siendo sensibles al MPA sino que además, transcurridos más de 2 meses del trasplante, la hormona les era indispensable para seguir proliferando. En este experimento el tamaño de los tumores fue desparejo por lo que se prefirió representarlo como el porcentaje del tamaño máximo alcanzado por cada tumor antes del segundo inóculo de MPA.

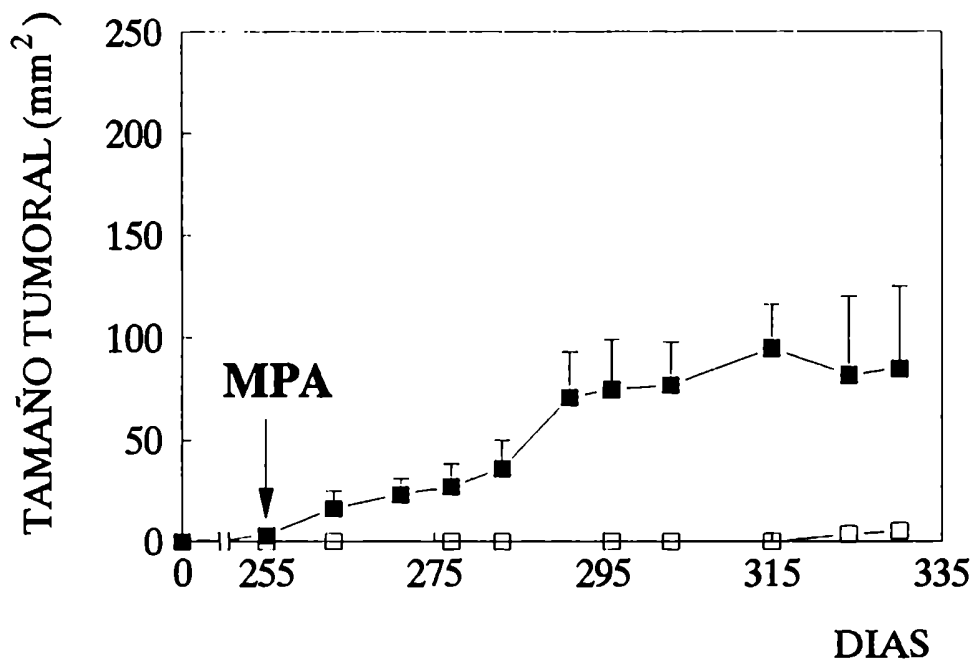
EFEECTO DE MPA DEPOT VS PELLET

Figura 6



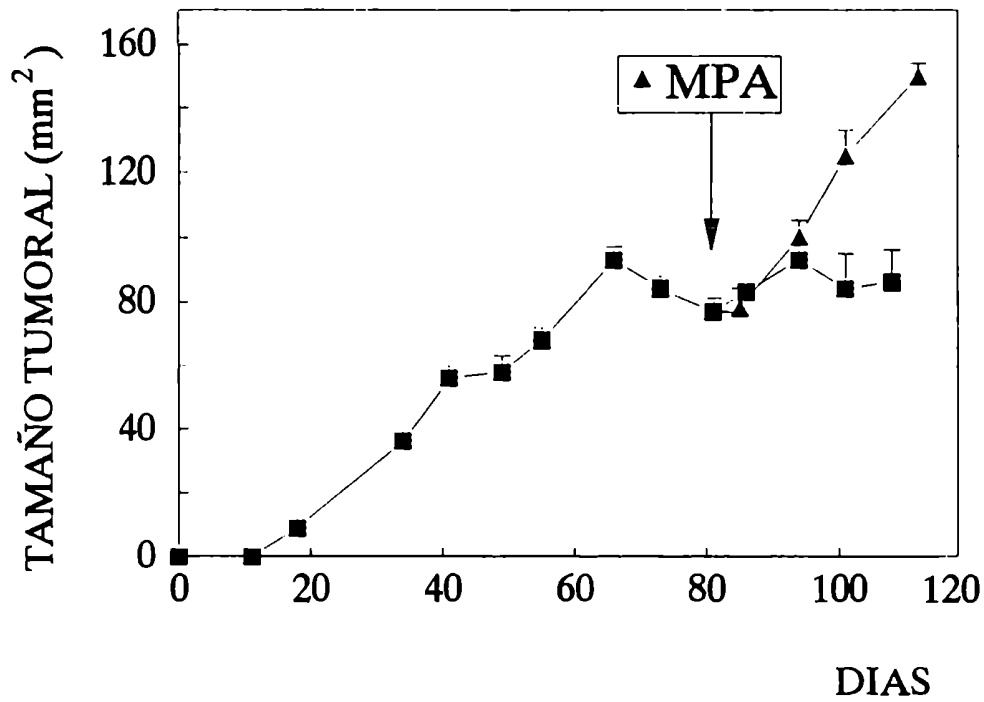
Crecimiento de tumores D5-HD en ratones con MPA desde el día 140 (■), o sin tratamiento hormonal (□). El tamaño tumoral de los tratados con MPA es significativamente mayor a partir del día 152 ($p < 0,01$).

Figura 7



Crecimiento de tumores MPA-D, con MPA desde el día 255 (■) o sin tratamiento hormonal (□).

Figura 8



Efecto de un segundo inóculo de MPA depot, 81 días después del pasaje tumoral, en la línea C4-HD.

El estudio de la respuesta de los tumores MPA-D a la interrupción del tratamiento hormonal se realizó usando pellets con MPA para facilitar su extracción. Antes de efectuar estos experimentos fue necesario comparar si ambas vías de administración, pellet y depot, eran equivalentes en la estimulación de un tumor MPA-D como el C7-HD. En la Figura 9 se observa que no hubo diferencias significativas en el crecimiento tumoral de los dos grupos tratados con MPA.

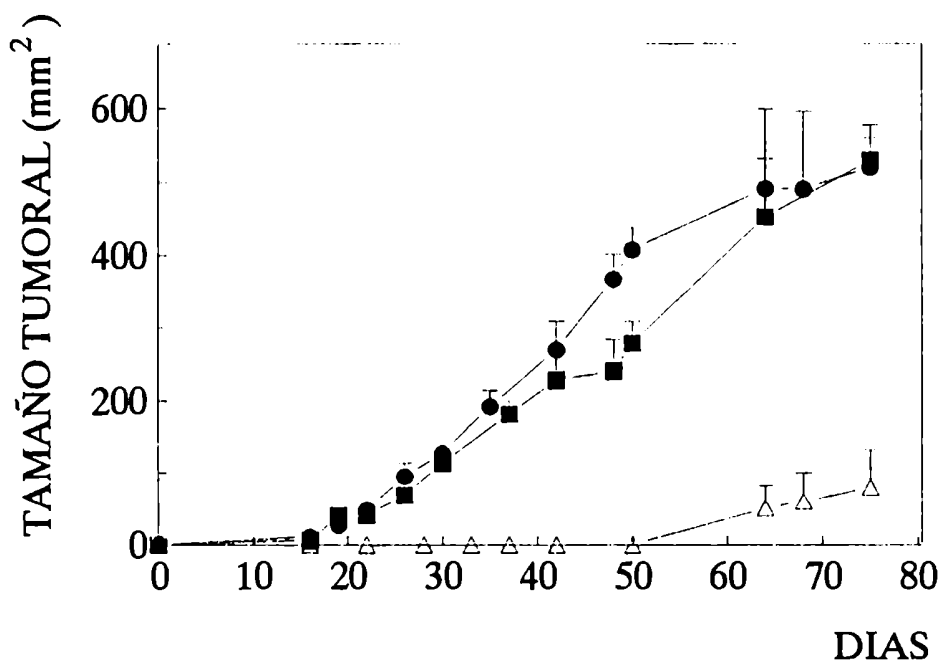
INFLUENCIA DE LA REMOCIÓN DEL PELLETT DE MPA

Este experimento se llevó a cabo en animales inoculados con células C7-HD a los cuales se les habían implantado pellets de MPA. Al día 40 la mitad de los pellets fueron retirados. Se observó entonces una reducción temporal en el tamaño de los tumores, aunque las diferencias de tamaño respecto de los animales portadores de pellets no resultaron estadísticamente significativas (Fig. 10).

INFLUENCIA DE LA OVARIECTOMÍA

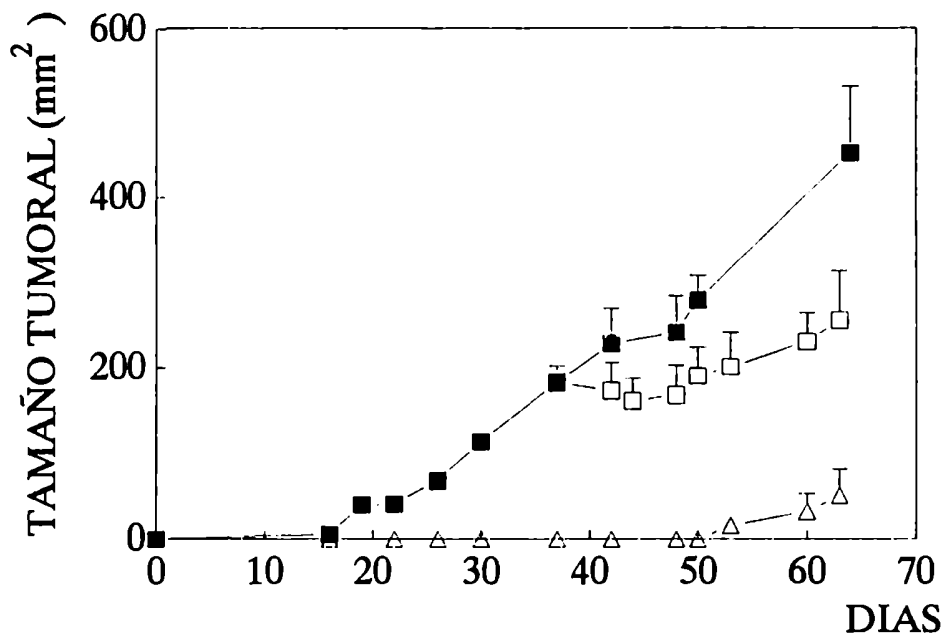
Para estudiar efecto de la administración de distintas hormonas esteroideas era necesario trabajar con hembras previamente ovariectomizadas para disminuir el aporte de hormonas sexuales endógenas. Los experimentos previos se realizaron en hembras intactas ya que las dosis de MPA administradas eran suficientes como para inhibir las hormonas ováricas a través del eje hipotalámico-hipofisario. Sorprendentemente, en hembras tratadas con MPA portadoras de transplantes C7-HD, los tumores aparecieron significativamente más tarde ($p < 0,001$) y el tamaño fue significativamente menor, hasta el día 63, en las hembras ovariectomizadas que en los controles sham ($p < 0,01$). De todos modos, en las hembras ovariectomizadas con MPA la latencia de aparición fue menor ($p < 0,001$) y el tamaño de los tumores mayor ($p < 0,005$) que en el grupo de hembras intactas sin tratamiento hormonal (Fig. 11). En la misma figura se observa que en los animales ovariectomizados sin MPA

Figura 9



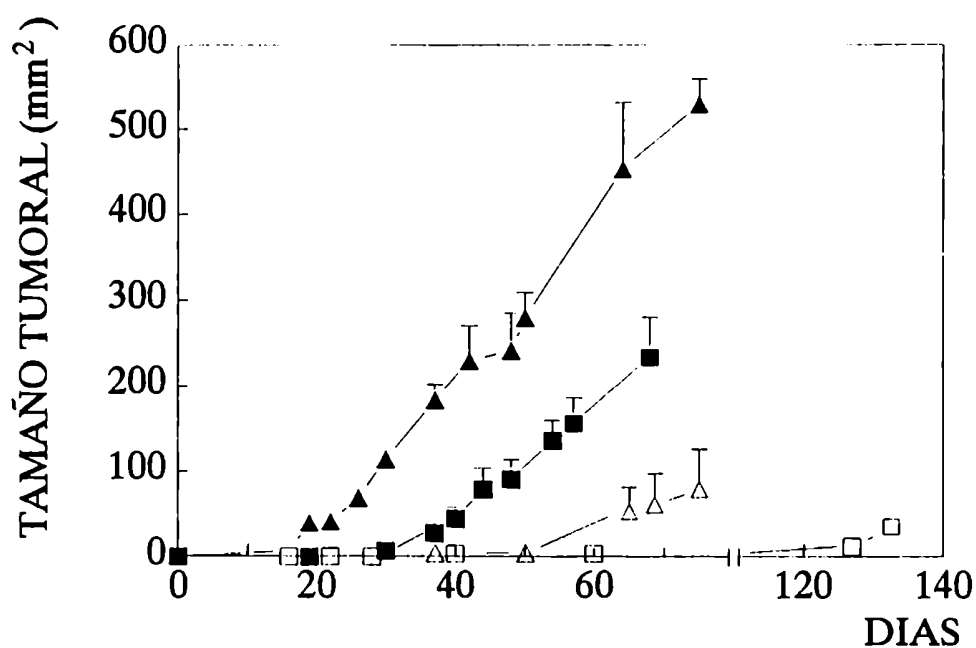
Efecto de 40 mg de MPA administrado en forma de depósito subcutáneo de microcristales (depot) (●) o en un pellet de silastic (■) sobre el crecimiento de tumores C7-HD, el tercer grupo corresponde a los controles (Δ).

Figura 10



Crecimiento de tumores C7-HD en animales portadores de un pellet de MPA durante todo el experimento (■), sin MPA desde el día 40 (□), o sin hormonas exógenas (△).

Figura 11



Crecimiento de tumores C7-HD en animales sham con MPA (▲), ovariectomizados con MPA (■), ovariectomizados sin MPA (□) y sham sin MPA (△).

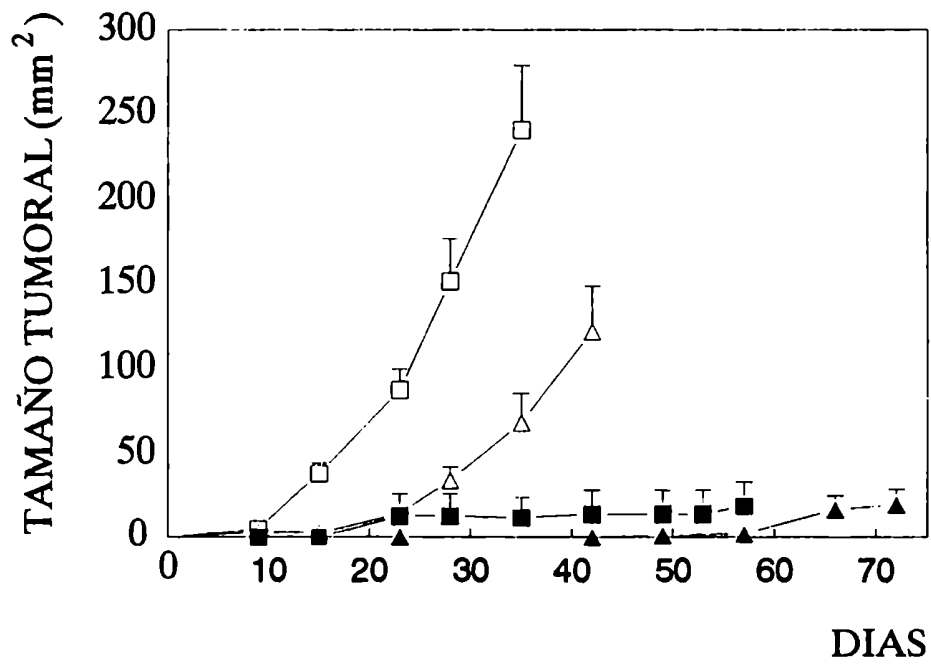
los tumores aparecieron mucho más tarde que en las hembras no operadas. En otro experimento que se realizó en hembras ovariectomizadas inoculadas con una menor cantidad de células tumorales ($2,5 \times 10^4$) ($n = 4$) 240 días después del trasplante los tumores aún no habían aparecido. Para comprobar si todavía los animales eran portadores de células tumorales vivas, se los inoculó con 40 mg de MPA depot. Un mes más tarde los tumores comenzaron a crecer en los cuatro ratones tratados. Posteriormente se observó que la ovariectomía también retardaba el crecimiento de los tumores de otras líneas MPA-D como la 5A (Fig. 12).

En los experimentos con la línea C7-HD se observó que la ovariectomía afectaba el crecimiento tumoral sólo bajo ciertas condiciones, no se encontraron diferencias en el crecimiento tumoral entre los animales ovariectomizados y no ovariectomizados si: a) los tumores eran implantados con trócar o b) se trataba de pasajes tumorales más avanzados y por lo tanto más agresivos.

En la línea C4-HD tuvimos dificultades para estudiar el efecto de ovariectomía ya que los trasplantes de esta línea no crecían si el pasaje tumoral se hacía a través de una suspensión celular y al implantar trocitos de tumor con trócar sucedía lo mismo que con los tumores C7-HD, aparentemente la cantidad de células era demasiado grande como para que la modulación ejercida por los ovarios pudiera ser observada. Sin embargo, la Figura 13 muestra que en animales ovariectomizados tratados con MPA, la depleción de la hormona circulante no sólo provocó el detenimiento del crecimiento (como en los ratones no operados) sino que, además, después del día 80 los tumores sufrían una profunda regresión. Tal como ocurrió con las hembras no ovariectomizadas, la reinoculación de la hormona, al día 108, hizo que los tumores retomaran el crecimiento.

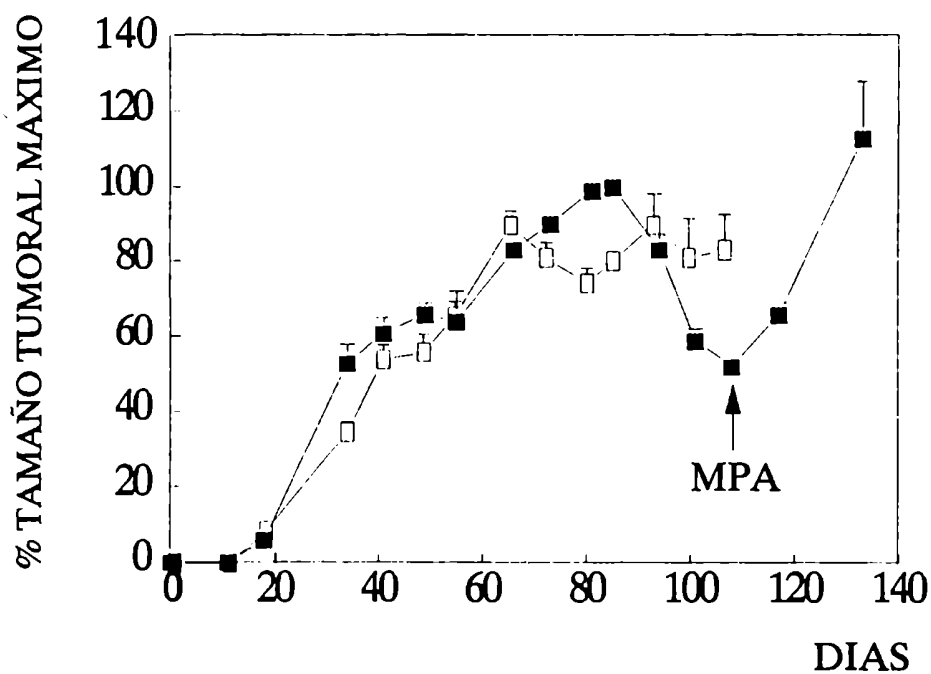
El efecto estimulador de los ovarios sobre los tumores MPA-D hizo que nos preguntásemos si la capacidad que tenían la líneas tumorales autónomas de crecer en ausencia del MPA no se debería a una mayor sensibilidad a hormonas producidas por los ovarios. Si esto fuera verdad, estos tumores serían capaces de crecer sin un aporte hormonal exógeno, a ex-

Figura 12



Crecimiento de tumores 5A en animales sham con MPA (□), ovariectomizados con MPA (△), ovariectomizados sin MPA (▲) y sham sin MPA (■).

Figura 13



Efecto de la reinoculación con MPA en ratones ovariectomizadas portadoras de tumores C4-HD. Hembras ovariectomizadas inoculadas con MPA al día 0 y 108 (■), controles enteros con un solo inóculo de MPA al día 0 (□).

pensas de hormonas ováricas y, por lo tanto, el crecimiento tumoral de células MPA-I en animales ovariectomizados debería verse inhibido. Sin embargo, nuestros experimentos demostraron que los tumores MPA-I eran capaces de crecer activamente en animales ovariectomizados (comprobado en 4 líneas MPA-I) y tampoco en estas condiciones el MPA modifica significativamente la velocidad de crecimiento. La Figura 14 muestra el crecimiento de tumores de la línea D5-HI en hembras ovariectomizadas con y sin MPA.

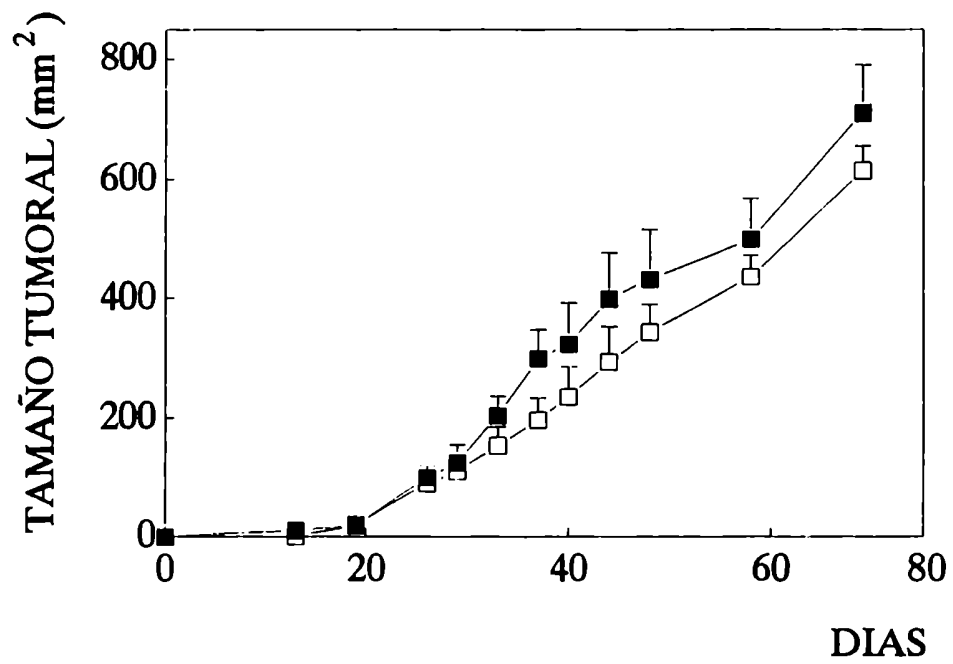
EFFECTO DE LA PROGESTERONA, ANDRÓGENOS Y ESTRÓGENOS

En distintos modelos se observó que además de su actividad progestagénica, el MPA podía ejercer actividades estrogénicas (*El Etreby y col.*, 1979) y androgénicas (*Bullock y col.*, 1975). Para determinar cuál de estas actividades era la responsable de la estimulación del crecimiento tumoral se siguió el crecimiento de tumores C7-HD en hembras ovariectomizadas a las que se había implantado pellets conteniendo 40 mg de progesterona (P) ó 35 de benzoato de estradiol (BE) y en machos intactos.

No hubo diferencias significativas en el crecimiento de los tumores en animales tratados con MPA y con P. En cambio, los ratones implantados con BE no presentaron tumores palpables durante los 6 meses que duró el experimento (Fig. 15). En los machos los tumores se desarrollaron mucho más tarde que en las hembras enteras (Tabla 5), lo cual sugiere que la estimulación androgénica, y por lo tanto la actividad androgénica del MPA, no jugarían un rol fundamental en la estimulación de la proliferación de esta línea tumoral. También en la línea C4-HD se observó que en las hembras con progesterona el desarrollo de los tumores fue similar al de las hembras las tratadas con MPA.

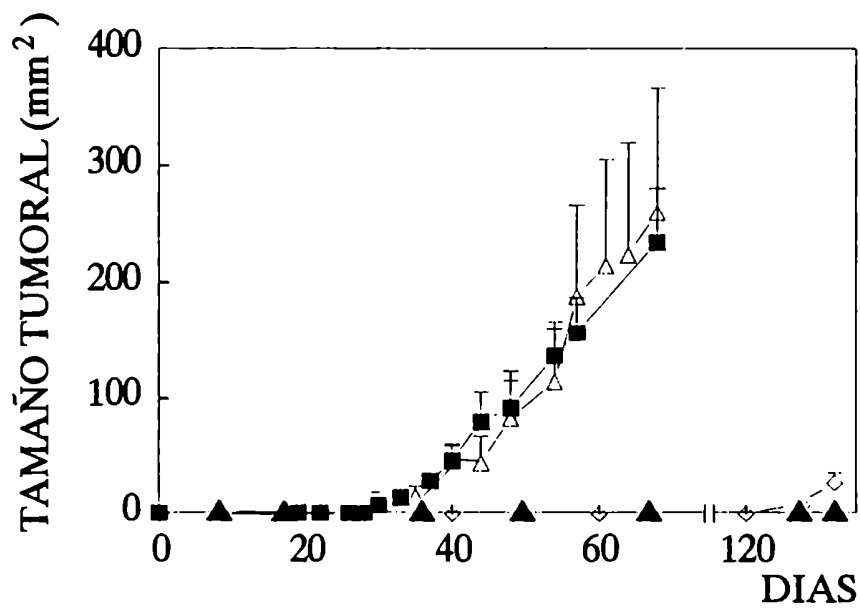
En los tumores de la línea autónoma C7-HI, se observó que la progesterona estimula el crecimiento tumoral, aunque en menor medida que el MPA. En cuanto a los animales sin aporte hormonal exógeno, no hubo diferencias significativas entre las hembras y machos (Fig. 16).

Figura 14



Crecimiento tumoral de la línea D5-HI en hembras ovariectomizadas con (■) o sin (□) MPA.

Figura 15



Crecimiento de tumores C7-HD en hembras ovariectomizadas implantadas con pellets de MPA (■), P (△), BE (▲), o sin tratamiento hormonal (◇).

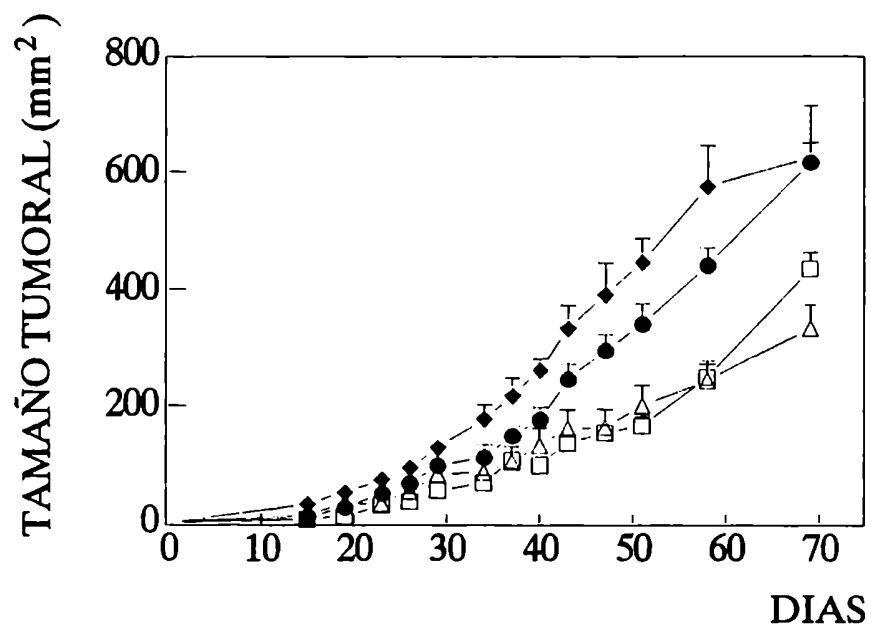
Tabla 5

Toma tumoral en la línea C7-HD

Días *	machos	hembras enteras	hembras ovariectomizadas
60	2/12	7/9	3/11
90	3/12	7/9	5/11
120	5/12	7/9	7/8

***: días después del pasaje tumoral**

Figura 16



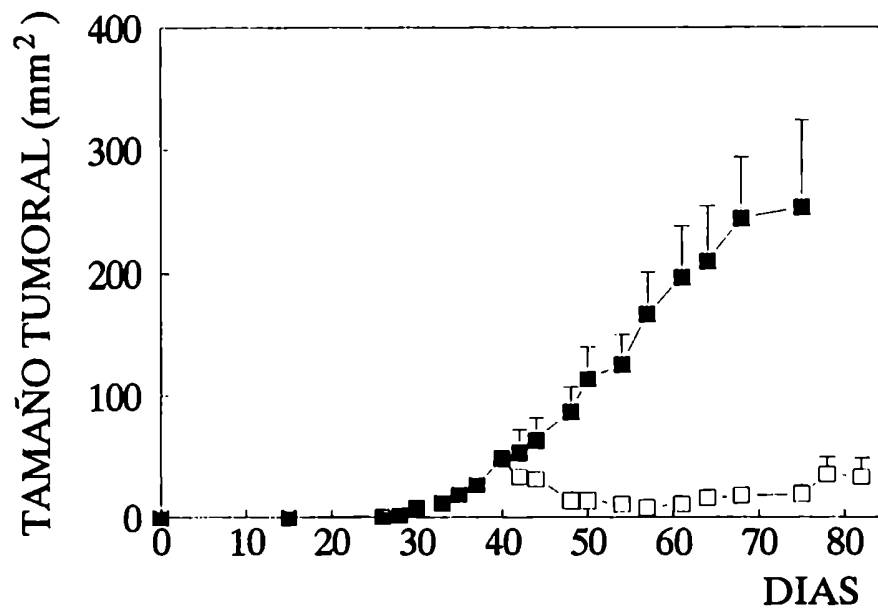
Crecimiento de tumores C7-HI en hembras con pellets de MPA (◆), P (●), o sin tratamiento (□), y en machos (Δ).

EFFECTO DE LA REMOCIÓN DE LOS PELLETS DE MPA O P EN HEMBRAS OVARIECTOMIZADAS

Teniendo en cuenta que los ovarios estaban involucrados en el desarrollo de los tumores MPA-D (Figs. 11; 12 y 13), quisimos estudiar qué efecto tendría la remoción del estímulo progestagénico en hembras ovariectomizadas portadoras de tumores C7-HD. Para este experimento se utilizaron ratones implantados con pellets de MPA o de P ya que no se habían observado diferencias en la capacidad de ambas hormonas para estimular el crecimiento tumoral (Fig. 15). En la figura 17 se observa que la remoción de los pellets de MPA o P 40 días después del inóculo tumoral indujo la regresión de los tumores. Las diferencias del tamaño de los tumores respecto de los ratones que todavía tenían pellets se hizo significativa 8 días después de la remoción de las hormonas ($p < 0,001$). En 3 animales la remisión fue total. Sin embargo, los tumores comenzaron a crecer nuevamente algunas semanas más tarde en todos los ratones sin pellets. Era posible que estos tumores, que crecían sin estímulo hormonal aparente, hubieran surgido a partir subpoblaciones celulares hormonoindependientes. Para evaluar esta posibilidad, se pasaron 4 de estos tumores a ratones tratados o no con MPA. Tres de estos pasajes mostraron los rasgos características de todos los tumores MPA-D tanto en la latencia de aparición (Fig. 18) como en la velocidad de crecimiento (la Fig. 19a muestra las curvas de crecimiento tumoral de uno de ellos). El pasaje del tumor restante mostró un patrón de crecimiento semejante al de las líneas MPA-I que son estimulables por la hormona (Fig. 19b).

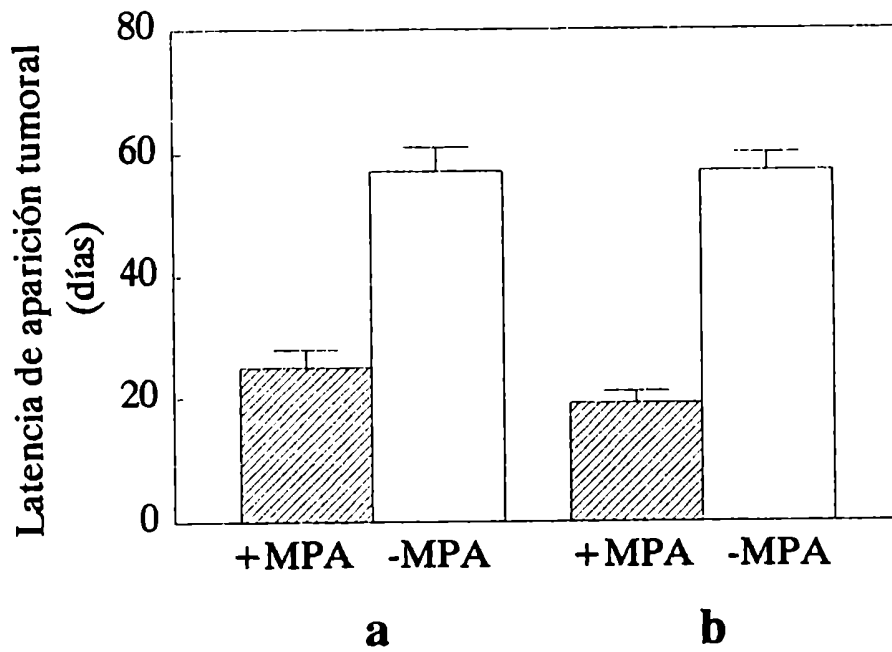
Este experimento se repitió en un pasaje más avanzado de la misma línea C7-HD: se estudió la dependencia al MPA en los pasajes de 4 tumores que crecían en ratones ovariectomizados a los que se les había retirado el pellet de P. Las latencias de aparición de estos subpasajes mostraron que solamente uno de ellos podría clasificarse claramente como MPA-D, mientras que en los otros tres no hubo diferencias significativas entre los animales con y sin MPA (Fig. 20). Sin embargo, el contenido de RP de los cuatro tumores originales

Figura 17



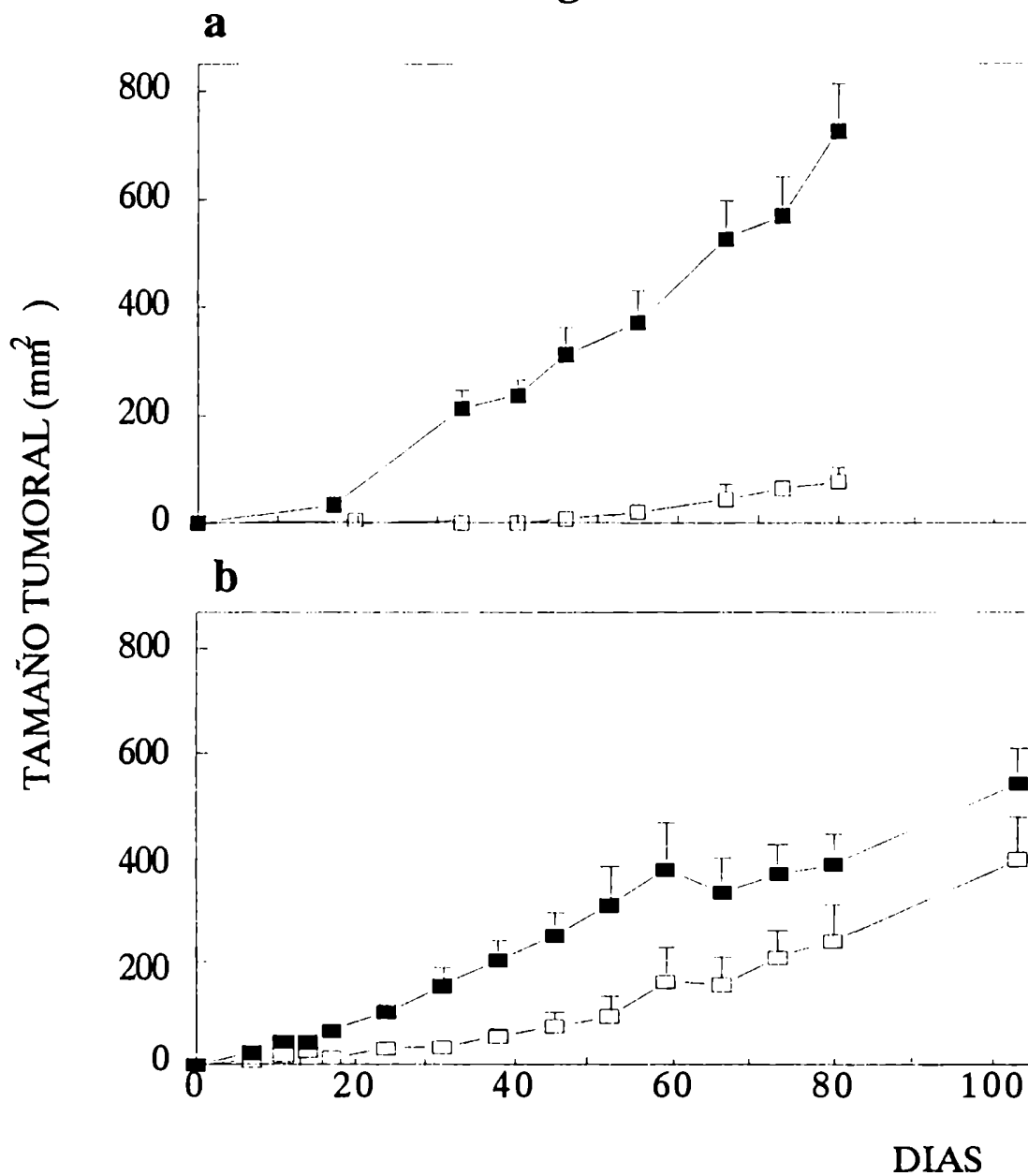
Crecimiento de tumores C7-HD en hembras ovariectomizadas implantadas con pellets de MPA o P (■) o sin progestágenos exógenos desde el día 40 (□).

Figura 18



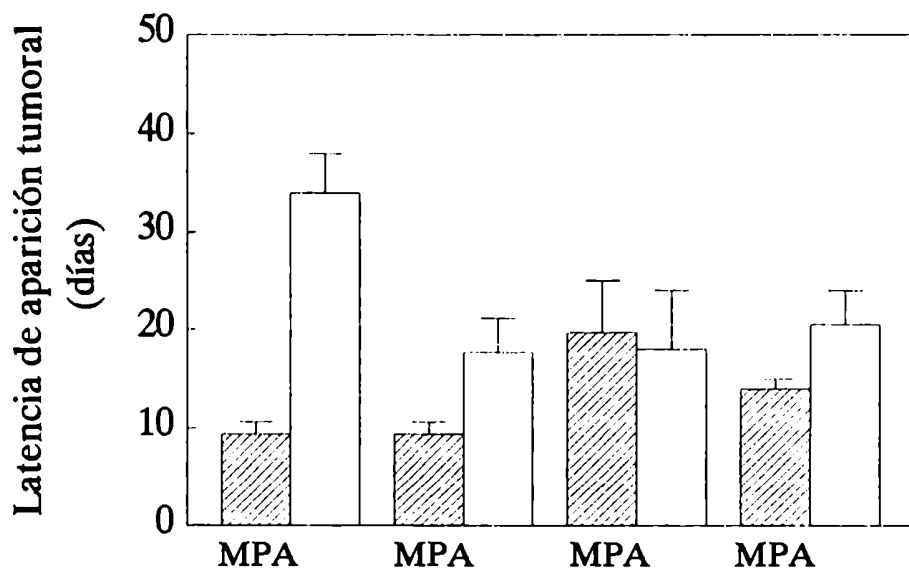
Crecimiento tumoral en hembras con o sin MPA en los pasajes de 2 tumores C7-HD que habían retomado crecimiento después de la remoción de los pellets con progestágenos; a) ejemplo de un pasaje MPA-dependiente y b) ejemplo de un pasaje de crecimiento autónomo.

Figura 19



Crecimiento tumoral en hembras con (■) o sin (□) MPA en los pasajes de 2 tumores C7-HD que habían retomado crecimiento después de la remoción de los pellets con progestágenos; a) ejemplo de un pasaje MPA-dependiente y b) ejemplo de un pasaje de crecimiento autónomo.

Figura 20



Latencias de aparición de 4 tumores de la línea C7-HD (pasaje 8) en hembras tratadas o no con MPA. Pasajes de tumores que habían retomado crecimiento después de la remoción del pellet de progesterona en hembras ovariectomizadas.

y de sus respectivos subpasajes no mostró cambios significativos con respecto al resto de los tumores C7-HD (Tabla 6) (comparar con la Figura 2). El Kd del RP también fue el característico de la línea C7-HD (4×10^{-9} M). Además, en estos pasajes se observó que el tratamiento con MPA elevaba el contenido de RE en los tumores (Tabla 6).

EFEECTO DE LA SIALOADENECTOMÍA

El MPA estimula la síntesis del factor de crecimiento epidérmico (EGF) en las glándulas salivales submaxilares del ratón (*Bullock y col., 1975*). Por lo tanto era posible que el MPA estimulara el crecimiento tumoral a través de un aumento de los niveles de EGF circulante. Para investigar esta posibilidad se siguió el crecimiento de tumores pertenecientes a distintas líneas MPA-D y MPA-I en animales a los cuales se les habían extirpado sus glándulas salivales submaxilares (sialoadenectomizados).

En la línea C7-HD no se observaron diferencias significativas en el crecimiento de los tumores entre las hembras sialoadenectomizadas y los controles, con o sin MPA (Fig. 21a). En cambio en la línea D5-HD la sialoadenectomía retardó la aparición de los tumores ($p < 0,005$) en las hembras tratadas y no tratadas con MPA, así como también el tamaño de los tumores fue significativamente menor en algunos puntos de la curva de crecimiento de los animales operados (Fig. 21b). A continuación se estudió el efecto de la sialoadenectomía en machos, ya que la estimulación de la síntesis de EGF en las glándulas salivales es una actividad típicamente androgénica. La Figura 22 (a y b) muestran que la ausencia de dichas glándulas no modificó el desarrollo de los tumores D5-HD o C4-HD, en machos con o sin MPA. En cambio, los tumores de la línea C7-HI crecieron un poco más lentamente en los machos sialoadenectomizados que en los enteros. Sin embargo, la estimulación que produce el MPA en esta línea no estaría mediada por las glándulas salivales ya que no hubo diferencias entre las hembras operadas y los controles con MPA (Fig. 22c). Sin embargo, en otro tumor autónomo (55-HI) se observó que la sialoadenectomía producía cierta inhibición del crecimiento tumoral únicamente en las hembras (Fig. 22d). Estos resulta-

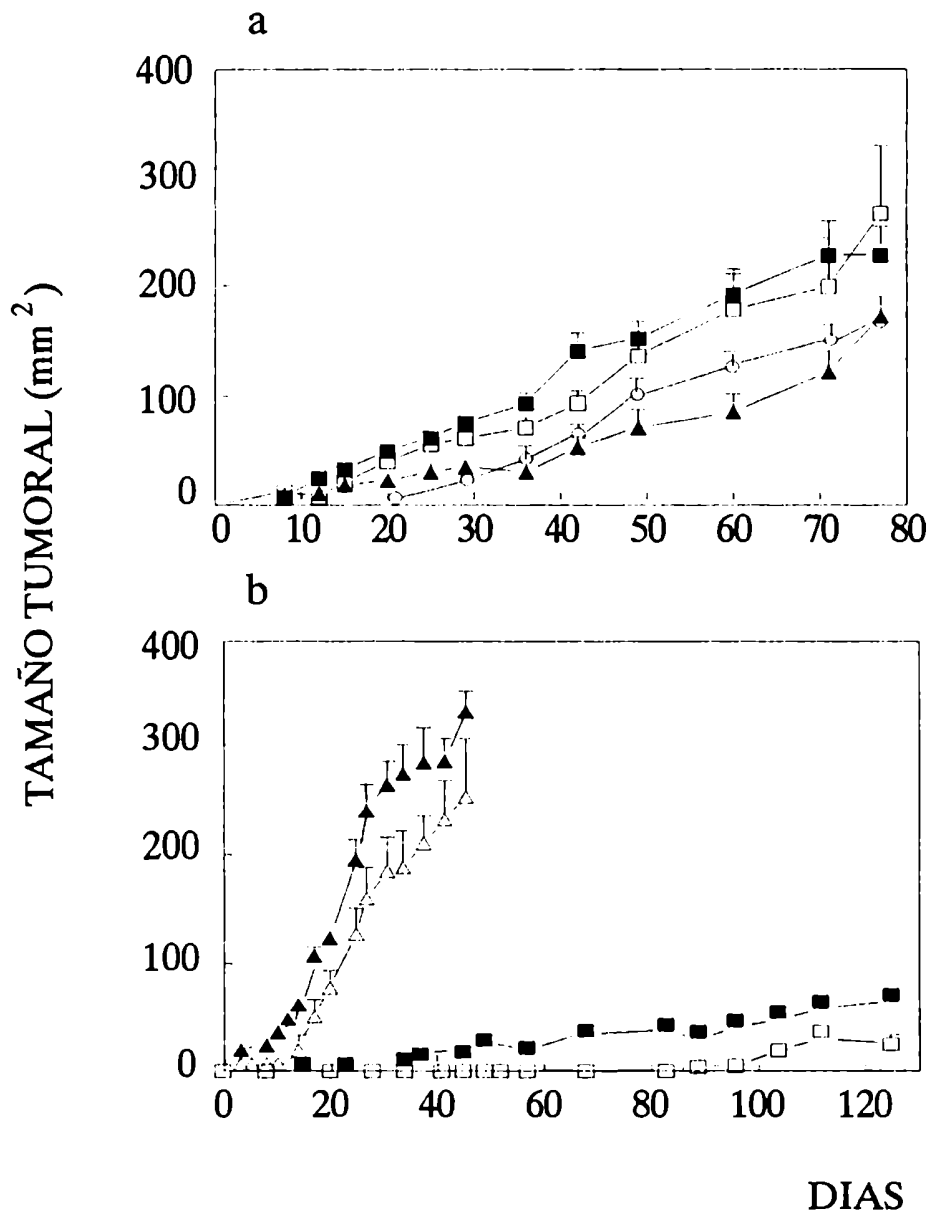
Tabla 6

RE y RP de tumores C7-HD

Tumores	RE [*]	RP [*]
Parental ovx sin MPA	116 ± 13	442 ± 72
pasaje con MPA	146 ± 12	124 ± 14
pasaje sin MPA	68 ± 35	367 ± 76

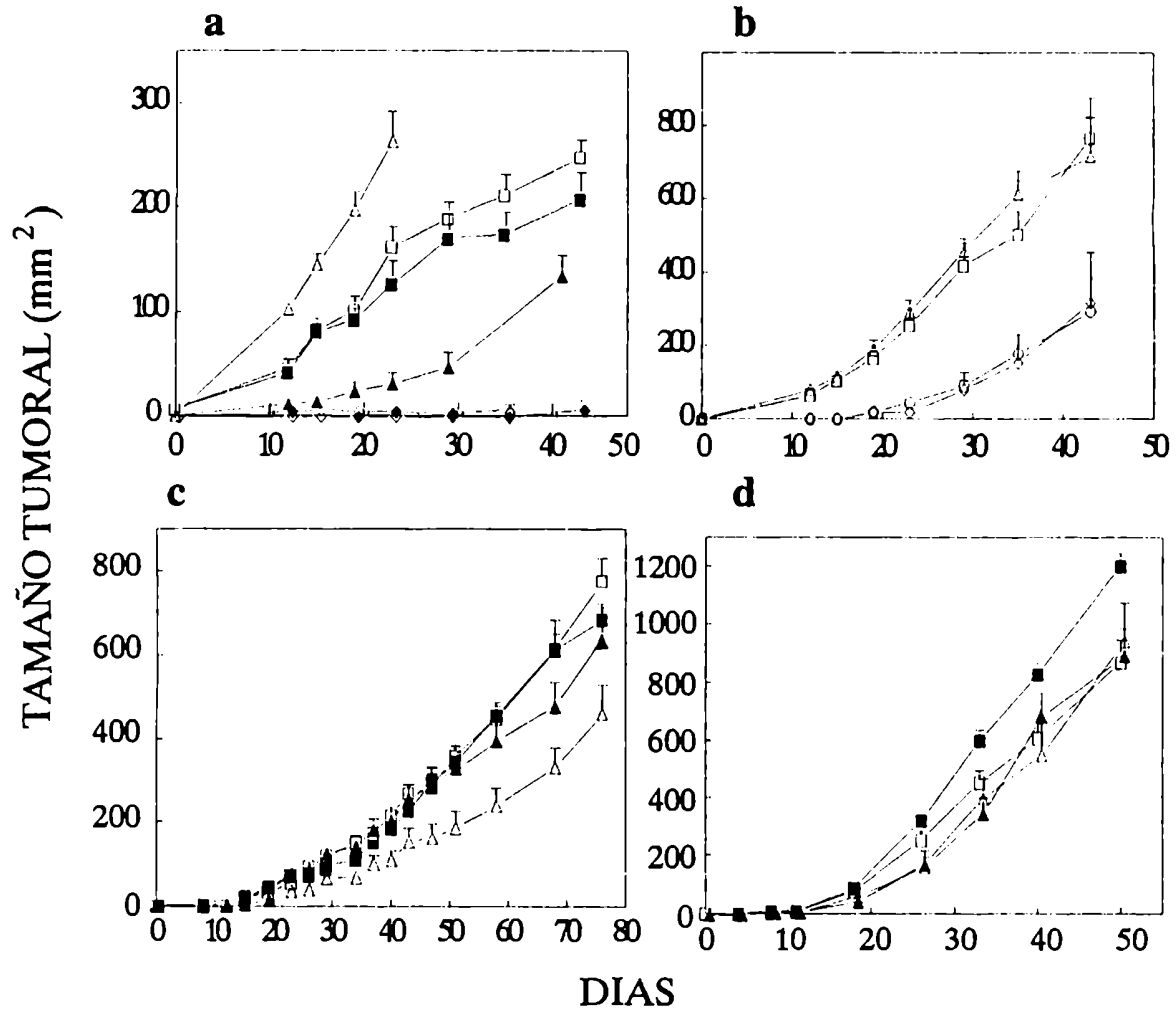
* : fmol/mg prot

Figura 21



Efecto de la sialadenectomía en hembras portadoras de tumores: **a)** C7-HD: sialoadenectomizadas con MPA (□), controles con MPA (■), sialoadenectomizadas sin MPA (▲), controles sin MPA (○); **b)** D5-HD: sialoadenectomizadas con MPA (△), controles con MPA (▲), sialoadenectomizadas sin MPA (□) y controles sin MPA (■).

Figura 22



Efecto de la sialoadenectomía en ratones portadores de tumores: **a)** D5-HD: machos sialoadenectomizados con MPA (■), machos controles con MPA (□), machos sialoadenectomizados sin MPA (◆), machos controles sin MPA (◇), controles hembras con (Δ) y sin MPA (▲); **b)** C4-HD: machos sialoadenectomizados con MPA (Δ), machos controles con MPA (□), machos sialoadenectomizados sin MPA (○) y machos controles sin MPA (◇); **c)** C7-HI: hembras sialoadenectomizadas con MPA (□), hembras controles con MPA (■), machos sialoadenectomizados (Δ), machos controles (▲); **d)** 55-HI: hembras sialoadenectomizadas (□), hembras control (■), machos sialoadenectomizados (▲), y machos control (Δ).

dos muestran que el rol que juegan las glándulas salivales difiere según la línea tumoral observada. De todos modos, en ninguna de ellas parecen ser fundamentales en la regulación del crecimiento tumoral.

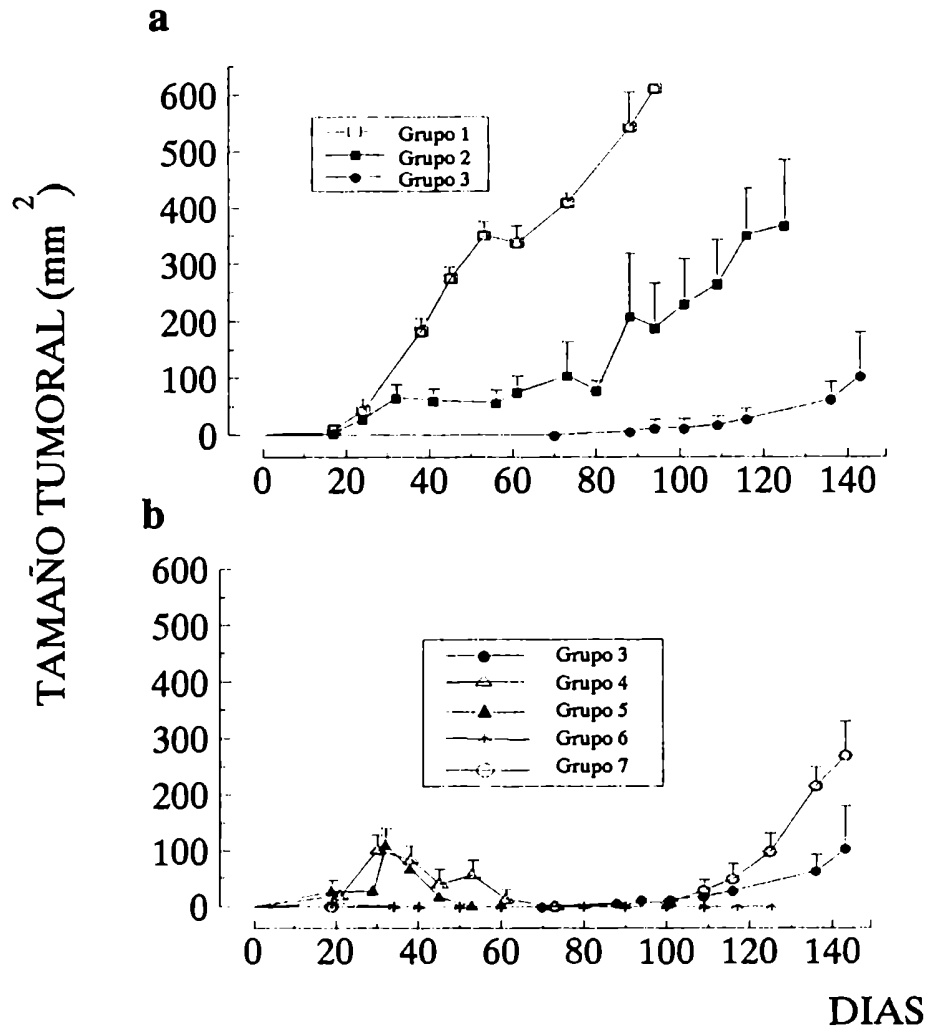
EFEECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ESTRÓGENOS

Como se ha indicado anteriormente, el pretratamiento de los ratones con dosis altas de BE (35 mg) inhibía el crecimiento de los tumores C7-HD en los pasajes singeneicos. El propósito de los experimentos descritos más abajo fue estudiar el efecto de distintas dosis de estrógenos en distintas líneas tumorales MPA-D y MPA-I.

EFEECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ESTRÓGENOS A RATONES PORTADORES DE TUMORES MPA-D

El objetivo del primer experimento de esta serie era comprobar el efecto inhibitorio del BE sobre el crecimiento de tumores C7-HD y compararlo con la inhibición producida por la remoción del estímulo progestagénico. Como se había observado en un pasaje más temprano (Fig. 17), la remoción del pellet de P inhibió temporalmente el crecimiento de los tumores en hembras ovariectomizadas (Fig. 23a), aunque no produjo regresiones totales como algunas de las observadas anteriormente. En cambio, la implantación de los pellets de BE produjo una remisión completa de los tumores (Fig. 23b). Los tumores regresionaron antes en los animales implantados con BE a los que se les retiró la progesterona, que en aquellos que permanecían con ambos pellets. La remoción del BE al día 77 indujo la aparición de los tumores en los ratones tratados con ambas hormonas desde un principio. A partir de ese momento estos trasplantes crecieron con una velocidad similar a la observada en los animales que habían sido tratados únicamente con P (Fig. 23b).

Figura 23



Efecto de la P y del BE sobre el crecimiento de tumores C7-HD en hembras ovariectomizadas. a) Efecto de la remoción del pellet de P. Grupo 1: P desde el día -6; Grupo 2: P desde el día -6 hasta el día 34; Grupo 3: sin tratamiento hormonal. El tamaño tumoral entre el grupo 1 y 2 fue estadísticamente significativo entre los días 41 y 88 ($p < 0,01$). b) Efecto de 35 mg de BE. Grupo 4: P desde el día -6, BE desde el día 34; Grupo 5: P desde el día -6 hasta el día 34, BE desde el día 34; Grupo 6: BE y P desde el día -6; Grupo 7: igual que Grupo 6, pero el BE fue removido el día 77. El tamaño tumoral medio del Grupo 1 fue significativamente diferente del Grupo 5 a partir del día 41 y del Grupo 4 a partir del día 38 ($p < 0,05$).

Dosis menores de BE (5 y 0,5 mg de BE) también impidieron el crecimiento e indujeron regresión tumoral en presencia de P o MPA (Fig. 24 a y b). El dosaje de estrógenos séricos en los animales tratados con 35 y 5 mg de BE alcanzó un rango de 5875-2537 y 2675-1250 pg/ml, respectivamente, entre los días 6 y 68 después del implante de los pellets. Estos niveles son muy superiores a los hallados en hembras normales durante la fase estral (175 pg/ml). Los niveles séricos en ratones tratados con 0,5 mg de BE también fueron altos durante el primer mes (863-209 pg/ml), pero en este grupo se alcanzaron niveles fisiológicos después de 50 días (107-63 pg/ml), cuando aún persistía la inhibición del crecimiento tumoral.

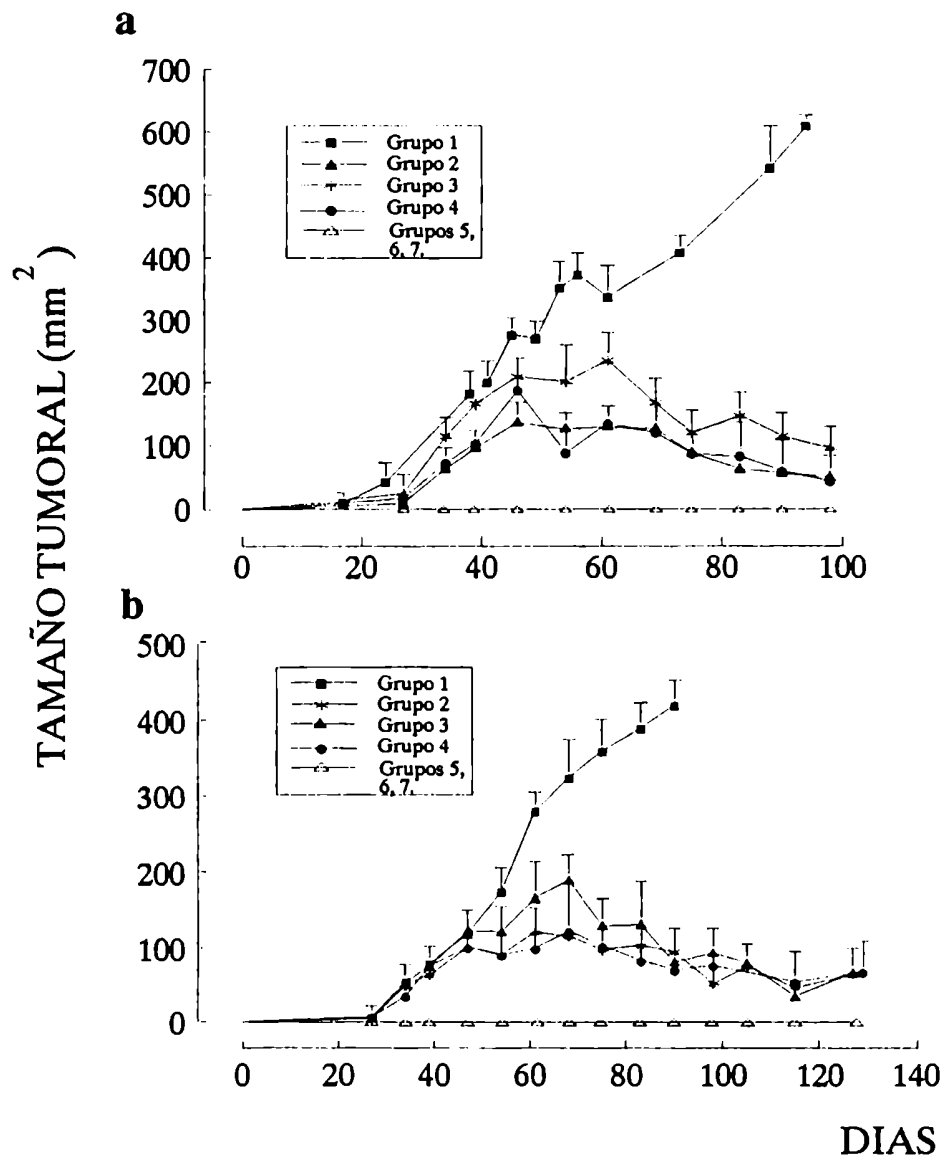
RESISTENCIA TUMORAL AL TRATAMIENTO CON BE

Algunos de los tumores que habían sido inhibidos por el tratamiento estrogénico fueron capaces de crecer nuevamente. Sin embargo, hubo una retoma del 100% a los 90 días de la implantación de los estrógenos únicamente en el grupo tratado con MPA+0,5 de BE (Tabla 7). En esa fecha había más tumores creciendo en el grupo tratado con MPA que con P, aunque la diferencia sólo fue marginalmente significativa ($p = 0,06$) (Tabla 7). Esto podría deberse a una mayor actividad estimuladora del MPA. Cuando los pellets de BE fueron implantados antes del inóculo tumoral, de 27 animales sólo 2 tenían tumores después de 150 días. A los 190 días este número sólo llegaba a 3. En este caso no se observó que el MPA tuviera una mayor actividad estimuladora, probablemente por la depleción de los pellets de hormona.

EFEECTO DEL 17 β -ESTRADIOL (E_2) SOBRE TUMORES C4-HD

El implante de 5 ó con 0,5 mg de E_2 previo al transplante tumoral inhibió el crecimiento de tumores de la línea C4-HD. La latencia de aparición en animales con MPA + E_2 fue de 54 ± 6 días ($n = 8$) mientras que en los implantados sólo con MPA fue de $8 \pm$

Figura 24



Efecto de diferentes dosis de BE sobre el crecimiento de tumores C7-HD en hembras ovariectomizadas. Los pellets de BE fueron implantados antes (Grupos 5, 6 y 7) ó 46 días después del pasaje tumoral (Grupo 2, 3 y 4), en ratones implantados con pellets de P (a) o MPA (b). Grupos: 1 con P o MPA únicamente; 2 y 5 con 0,5 mg de BE; 3 y 6 con 5 mg de BE; y 4 y 7 con 35 mg de BE.

Tabla 7

Recidiva tumoral en ratones tratados con BE

BE (mg)	0 - 90 ^a			0 - 160 ^a		
	+ MPA	+ P	+ MPA + P	+ MPA	+ P	+ MPA + P
35	3/8 ^b	0/7	3/15	5/8	3/7	8/15
5	0/3	1/5	1/8	2/3	2/5	4/8
0.5	4/4	2/6	6/10	4/4	4/6	8/10
Total	7/15	3/18	10/33	11/15	9/18	20/33

a: días de implantación del BE

b: portadores de tumor/total

1 días (n = 8). En todos los animales portadores de tumores C4-HD palpables, que habían sido pretratados sólo con MPA, la implantación de pellets de 5 ó 0,5 mg de E₂ (n = 7) produjo regresión tumoral. El nivel de estrógenos séricos de los ratones tratados con E₂ fue menor (Tabla 8) que el de los tratados con BE a pesar de lo cual, la actividad inhibitoria fue muy similar. Sin embargo, se observó una mayor retoma del crecimiento tumoral. En 5 de los 8 animales implantados con 5 ó 0,5 mg de E₂ antes del pasaje tumoral y en los 7 ratones en los cuales el E₂ había provocado la regresión de tumores palpables, los transplantados crecían nuevamente a los 70 días del implante de los pellets (comparar con Tabla 7).

La línea tumoral D5-HD fue la única MPA-D (RE+) en la que la implantación del BE no produjo cambios en el desarrollo de los tumores que crecían en presencia de MPA (Fig. 25).

PASAJES DE TUMORES RESISTENTES AL TRATAMIENTO ESTRÓGENICO

A continuación, se estudió la respuesta hormonal de 5 de los tumores C7-HD que fueron capaces de crecer en los ratones con tratamiento estrogénico. En 3 de ellos (Fig. 26 a, b y c) se probó la capacidad de respuesta al MPA: sólo uno de ellos había perdido la MPA-dependencia. Esto indicaba que la resistencia a los estrógenos no implicaba, necesariamente, la adquisición de un patrón de crecimiento hormono-independiente. A continuación se estudió la sensibilidad al MPA y al BE en los subpasajes de otros 2 tumores BE-resistentes (Fig. 26 d y e). Los subpasajes de uno de estos tumores mantuvieron la sensibilidad al MPA, pero ninguno respondió al tratamiento con BE. Los subpasajes de tres tumores C4-HD E₂-resistentes tampoco recuperaron la sensibilidad a los estrógenos aunque también conservaron la MPA-dependencia (la Fig 26f muestra uno de estos pasajes). Tanto los subpasajes que resultaron MPA-dependientes como los autónomos expresaban RE y RP; sin embargo, el tratamiento con estrógenos reducía el número de RE (Tabla 9). Por lo tanto

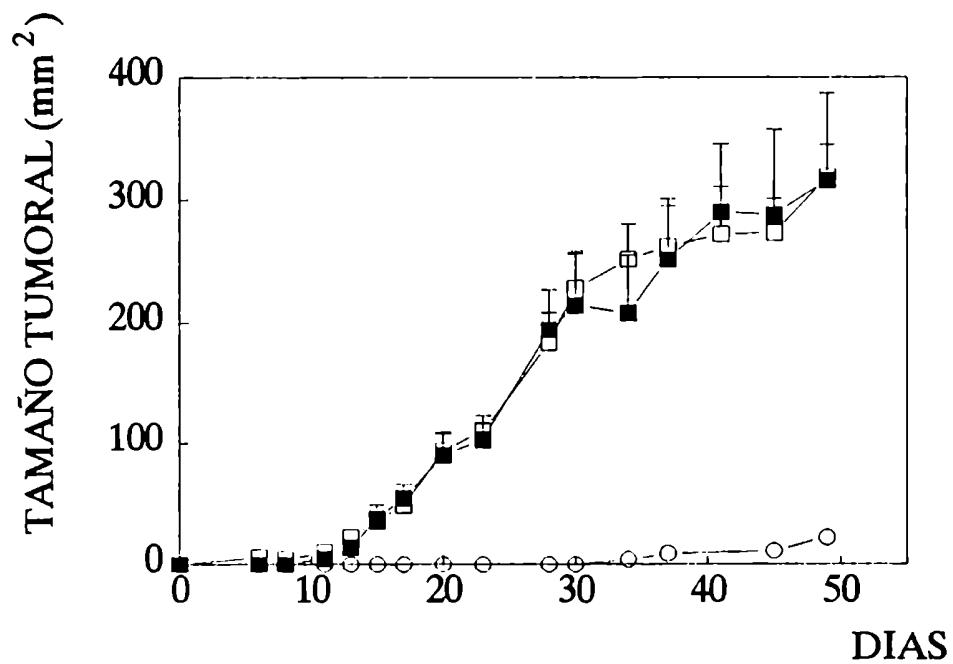
Tabla 8Niveles séricos de estrógenos en ratones tratados con E₂

Pellet de E ₂	DÍAS DE IMPLANTACION DEL PELLETT		
	20	50	90
5 mg	623 ± 41 ^a (550-720) ^b	341 ± 18 (300-375)	210 ± 10 (196-225)
0,5 mg	69 ± 13 (28-100)	45 ± 11 (23-82)	44 ± 19 (14-19)

a: Media + ES

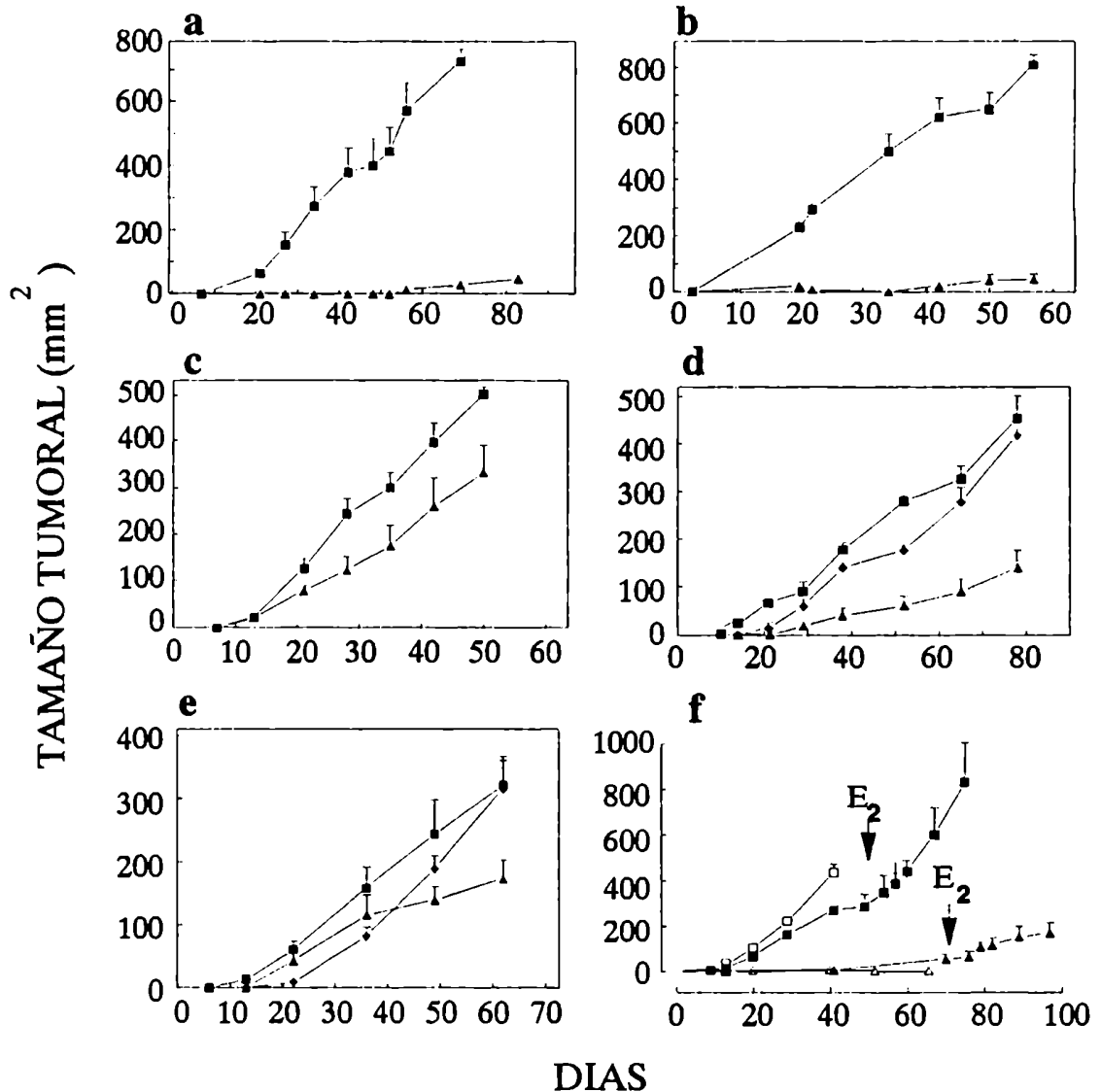
b: Rango

Figura 25



Efecto de 35 mg de BE sobre el crecimiento de tumores D5-HD. Hembras tratadas únicamente con MPA (□), con MPA desde el día 0 y BE a partir del día 20 (■), y controles sin tratamiento hormonal (○).

Figura 26



Tumores resistentes al tratamiento con estrógenos. a, b, c, d, e: pasajes de la línea C7-HD, hembras pretratadas con MPA (□), con MPA + BE (◆) y controles (▲); f: tumor de la línea C4-HD: con MPA+E₂ desde el día -6 (□), con MPA y E₂ desde el día 50 (◆), sólo con E₂ desde el día -6 (▲) y sólo con E₂ desde el día 70 (▼).

Tabla 9

RE y RP en tumores resistentes a estrógenos

Tumores resistentes a estrógenos	Pasajes con MPA		Pasajes con BE o E ₂	
	RE ^a	RP ^a	RE	RP
C7-HD-R1	47	116	15	65
C7-HD-R2	18	76	0	99
	26	57	0	73
	34	24	NR	NR
C4-HD-R1	50	109	13	71
	50	128	0	124

a: fmoles/mg proteínas

NR: no realizado

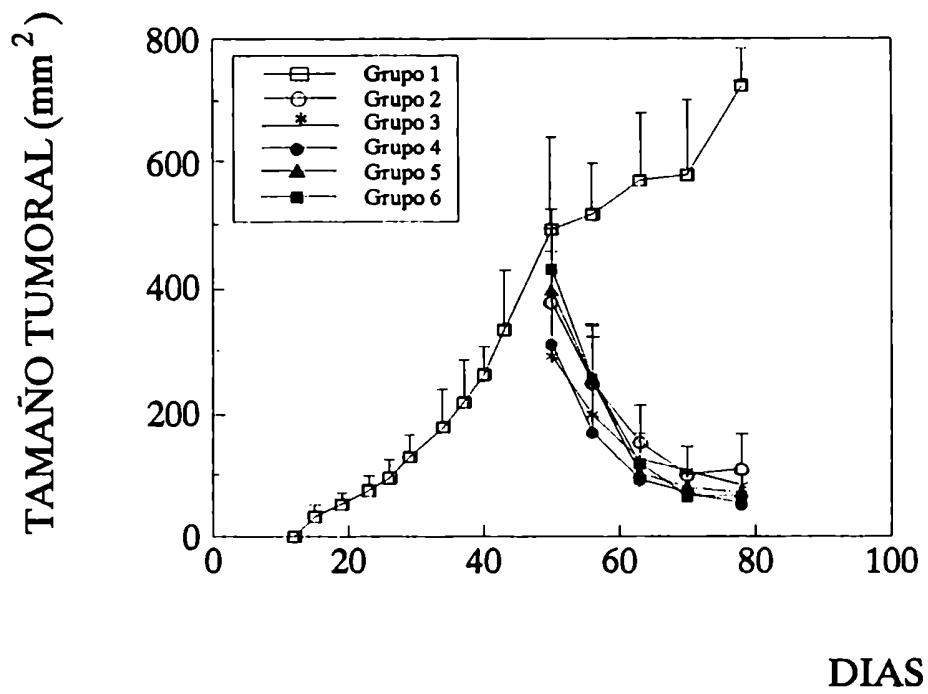
cabía la posibilidad de que una regulación negativa de los RE fuera la responsable de la falta de respuesta al tratamiento estrogénico. Esta posibilidad fue evaluada en el subpasaje de un tumor C4-HD E₂-resistente. Para permitir la recuperación de los RE, los pellets de E₂ se implantaron en animales tratados o no con MPA a los 50 ó 70 días del pasaje tumoral, respectivamente. También en esta caso los tumores fueron estimulables por MPA pero no inhibibles por E₂ (Fig 26f).

EFFECTO DEL BE SOBRE TUMORES AUTÓNOMOS

Para estudiar el efecto del BE sobre un tumor autónomo que expresa RE y RP se usó la línea C7-HI. Además esta línea nos permitía saber si el BE ejercía algún efecto sobre la formación de metástasis. Anteriormente se había demostrado que en la línea C7-HI el 100% de los animales tenían metástasis pulmonares 40 días después del pasaje tumoral (*Bonfil y col.*, 1989). Por lo tanto se dejó que los tumores crecieran en hembras enteras sin tratamiento hormonal hasta el día 50, en ese momento se les implantó 0,5; 5 ó 35 mg de BE solos o junto con 40 mg de MPA. Las tres dosis de BE indujeron la regresión de los tumores tanto en presencia como en ausencia de MPA (Fig. 27). Histológicamente los tumores en regresión mostraron amplias zonas de calcificación y ausencia casi completa de diferenciación tubular. Se observaron células tumorales remanentes, dispersas en un estroma eosinófilo con focos de esclerosis. Estas células presentaban un citoplasma claro sin estructura evidente, o bien con áreas filamentosas. El núcleo no presentaba alteraciones histológicas significativas. No se observó infiltración inflamatoria evidente en los casos estudiados (Fig. 28). La inspección macroscópica de los pulmones mostró que el BE también inhibió el crecimiento de las metástasis (Tabla 10 y Fig. 29). Los tumores C7-HI que habían regresionado mostraron un contenido muy bajo de RE por la técnica de desplazamiento de carbón-dextrano (menos de 10 fmol/mg de proteínas) y cuando se evaluó con un anticuerpo anti-RE no se encontró expresión de la proteína.

También se evaluó el efecto de la implantación de 35 mg de BE en los pasajes de

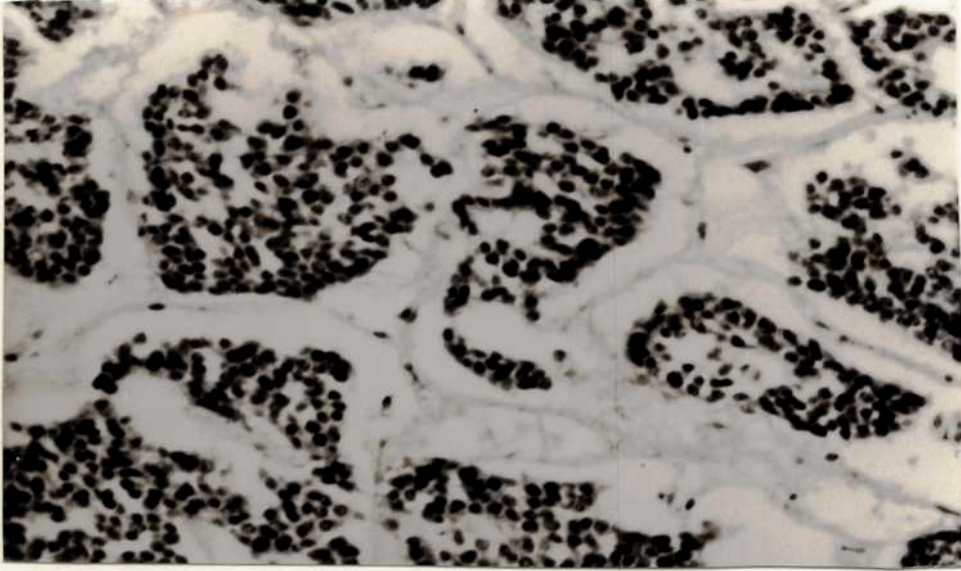
Figura 27



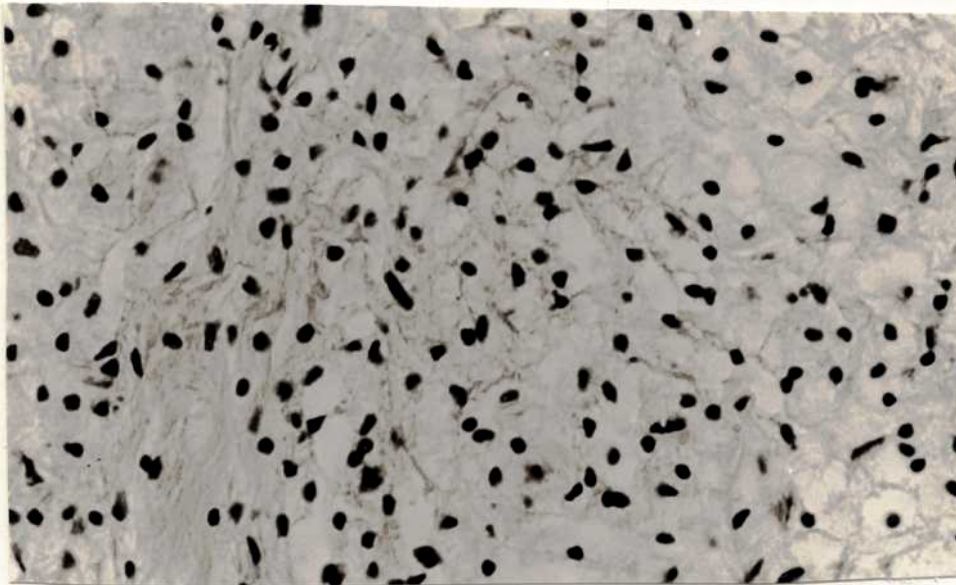
Efecto del BE sobre tumores C7-HI. Los pellets de BE y de MPA se implantaron al día 50. Grupos: 1) sin tratamiento hormonal; 2) MPA + 0,5 mg de BE; 3) MPA + 5 mg de BE; 4) 0,5 mg de BE; 5) 5 mg de BE; 6) 35 mg de BE.

Figura 28

a



b



a) Tumor C7-HI sin tratamiento hormonal. Islotes o masas de células neoplásicas que diferencian pequeñas cavidades glandulares (imagen cribiforme), inmersas en un estroma laxo. Existe retracción de las estructuras epiteliales debido a la fijación en alcohol.

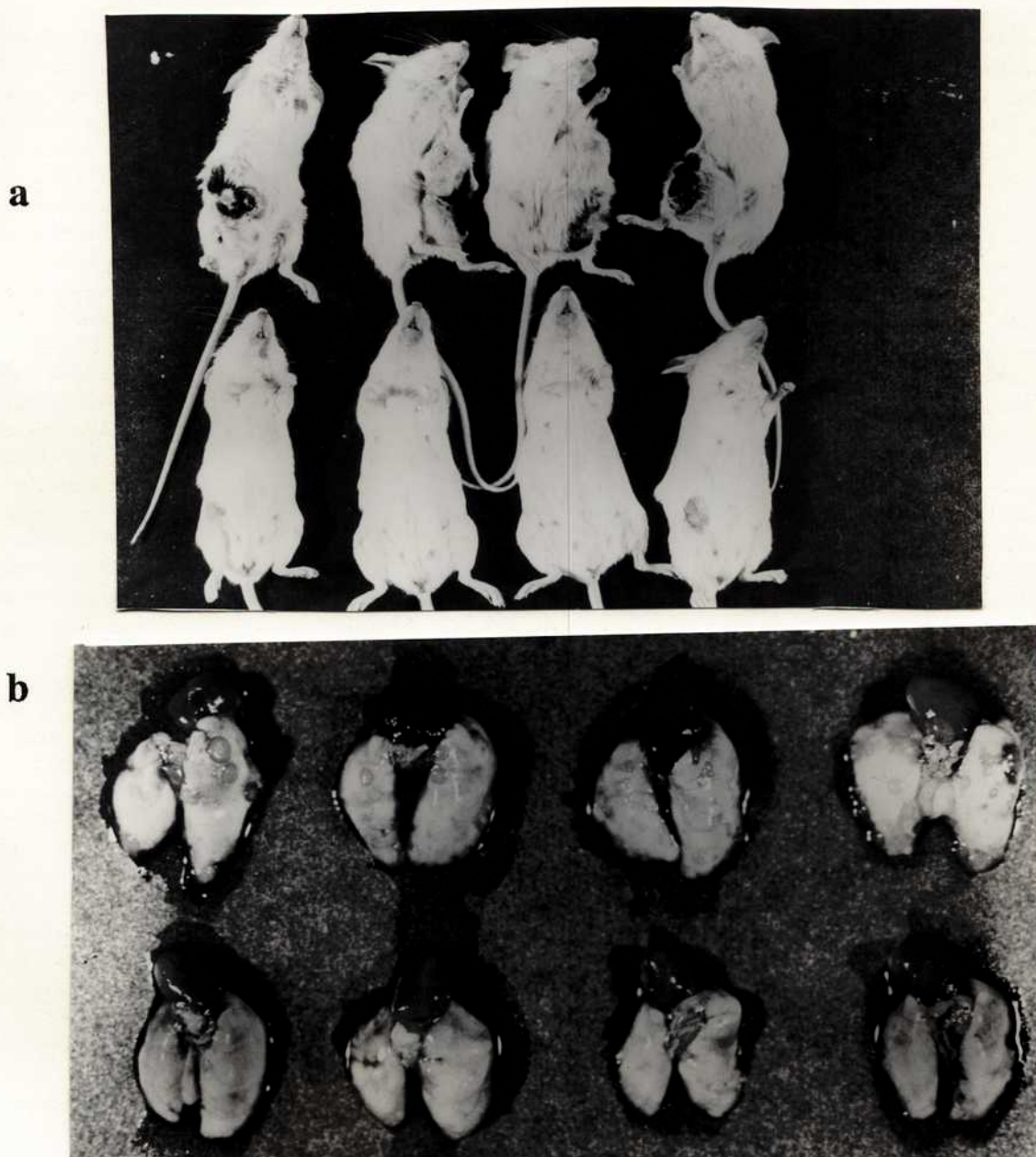
b) Tratado con BE: se observa pérdida de la histoarquitectura, con ausencia de diferenciación glandular. Las células neoplásicas remanentes muestran un núcleo oscuro, ovoide o redondeado, rodeadas por un citoplasma claro, vacío ("soplado"), o de aspecto fibrilar (Hematoxilina-Eosina, 125X).

Tabla 10

Incidencia de metastasis C7-HI con BE

Tratamiento hormonal	Met. axilares	Met. pulmonares			
		< 10	10 a 100	> 100	totales
BE 35 mg	0/6	2/6	0/6	0/6	2/6
BE 5 mg	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
BE 0,5 mg	0/5	2/5	0/5	0/5	2/5
MPA + BE 5 mg	0/5	1/5	0/5	0/5	1/5
MPA + BE 0,5 mg	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
controles	6/6	0/6	2/6	4/6	6/6

Figura 29



Tumor C7-HI tratado con BE. a) Fila superior: ratones portadores de tumores C7-HI sin tratamiento hormonal, 80 días después del pasaje tumoral; fila inferior: animales tratados con 5 mg de BE a partir del día 50. b) Imagen de los pulmones correspondientes a los animales mostrados en a).

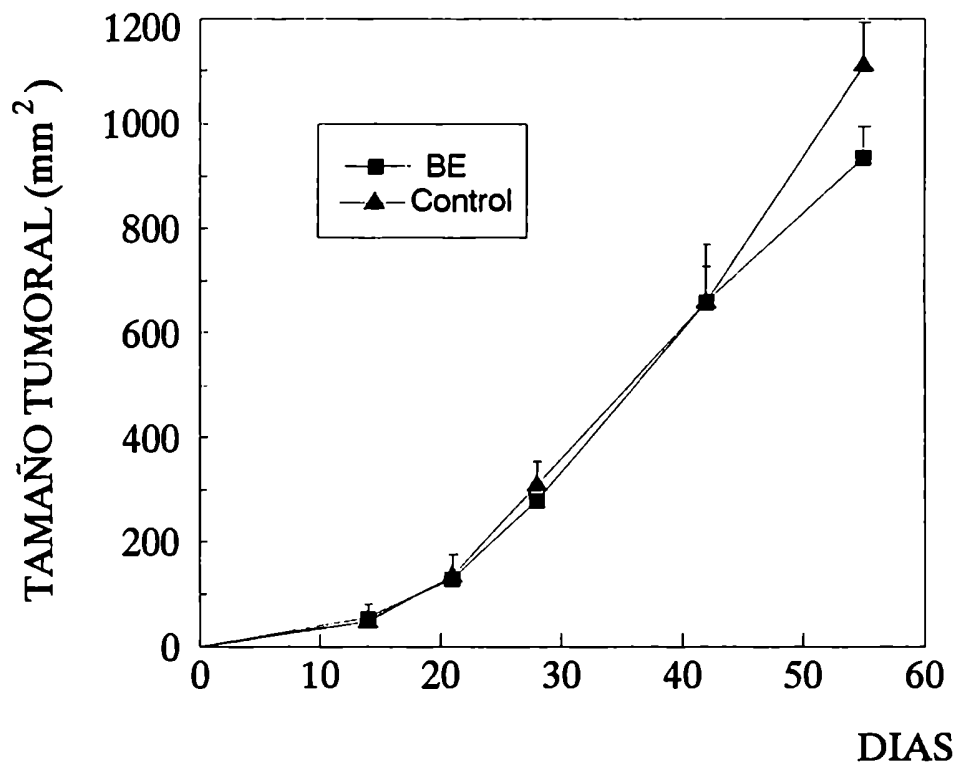
3 tumores de mama espontáneos (RE-) de hembras BALB/c multíparas. En ningún caso se observó que el tratamiento produjera alguna inhibición (la Fig. 30 muestra el comportamiento de uno de estos tumores).

INDUCCIÓN DE ADENOCARCINOMAS DE MAMA EN RATÓN POR PROGESTÁGENOS

EFFECTO DEL MPA EN LA CARCINOGENESIS MAMARIA DE LA CEPA C3H

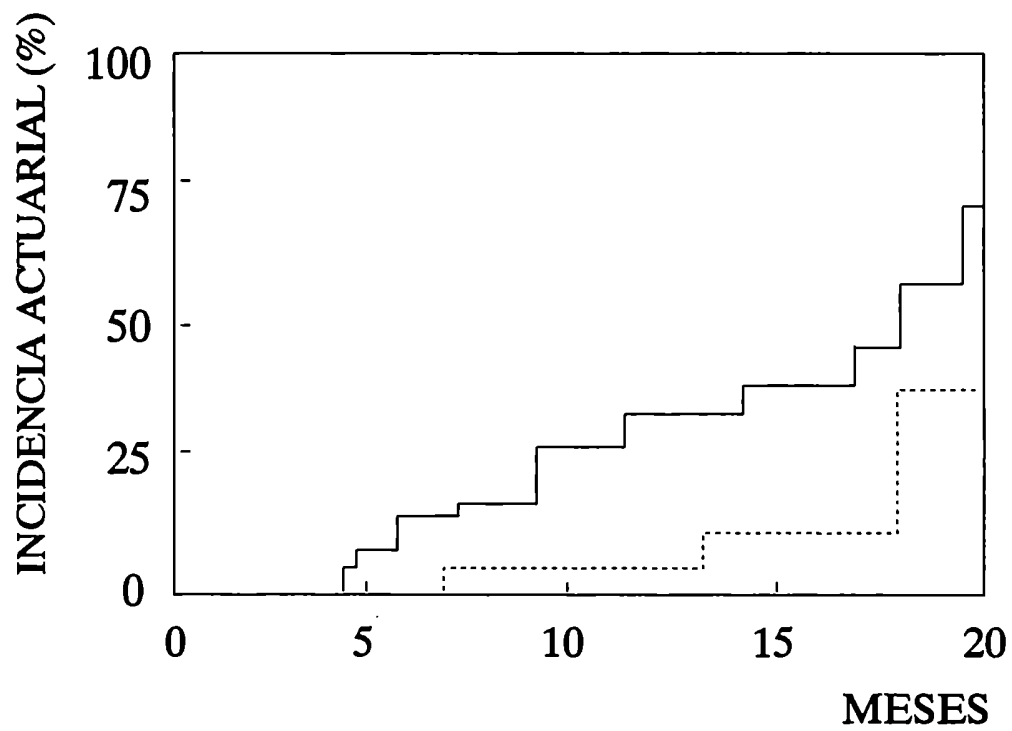
El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto del tratamiento con MPA en una cepa con alta incidencia de tumores de mama espontáneos como la C3H, portadora del MMTV. Se inocularon hembras vírgenes de esta cepa con 40 mg de MPA depot cada dos meses de acuerdo con el modelo experimental en la cepa BALB/c (ver MODELO EXPERIMENTAL). En el grupo tratado con MPA ($n = 36$) aparecieron 12 ratones con uno o más tumores, mientras que en los controles ($n = 30$) aparecieron 6 ratones con tumores de mama. Al año de comenzado el experimento, la incidencia actuarial fue del 32% y 16%, respectivamente ($p = 0,0858$) (Fig. 31). Por lo tanto, el tratamiento con MPA duplicó la incidencia de tumores de mama, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Además, en el grupo tratado con MPA, de los 12 animales portadores de tumor, 4 presentaban 2 tumores cada uno. En los 6 animales del grupo control, sólo apareció un tumor por ratón. Las latencias de aparición de los tumores en ambos grupos fueron similares: $43,7 \pm 6,0$ semanas para los animales con MPA y $45,3 \pm 8,4$ semanas para los controles. Los tumores que aparecieron en el grupo tratado con MPA no se diferenciaban morfológicamente de los que surgieron en el grupo control. Los trasplantes singeneicos de estos tumores fueron MPA-independientes, expresaron niveles bajos de RE (nivel medio = 10 fmoles/mg de proteína) y no se detectaron RP ($n = 6$).

Figura 30



Efecto del implante de 35 mg de BE 20 días después del pasaje de un adenocarcinoma de mama espontáneo hormono-independiente (ER-PR-).

Figura 31



Incidencia actuarial de tumores de mama en hembras vírgenes C3H. Tratadas con MPA depot (—) y controles (-----).

EFFECTO DE LA SIALOADENECTOMIA Y DE LA OVARIECTOMÍA SOBRE LA CARCINOGENESIS MAMARIA INDUCIDA POR EL MPA EN HEMBRAS BALB/c

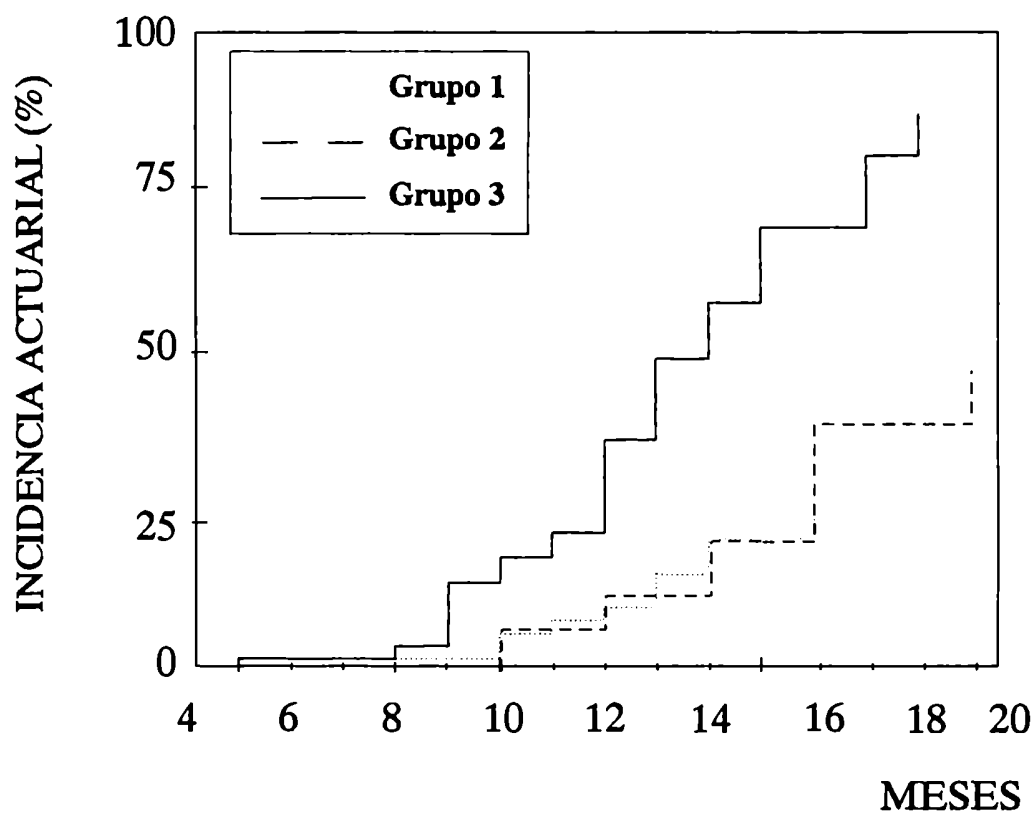
Kurachi y col. (1985) y, posteriormente, Inui y col. (1989), demostraron que el EGF proveniente de las glándulas salivales estaba involucrado en la tumorigénesis mamaria del ratón en cepas de alta incidencia espontánea. Sabiendo además que el MPA es un potente estimulador de la secreción de EGF de las glándulas salivales de estos animales, nos preguntamos si la ausencia de estas glándulas afectaría el poder carcinogénico del MPA. En cuanto a la ovariectomía, habiendo comprobado que ésta retardaba el crecimiento de los tumores MPA-D, quisimos averiguar si también afectaba la capacidad tumorigénica del MPA. Los resultados indican que tanto la ovariectomía como la sialoadenectomía disminuyeron significativamente ($p < 10^{-4}$) la incidencia tumoral (Fig. 32). En el grupo ovariectomizado la incidencia actuarial a los 18 meses de tratamiento fue del 44% (12/47), en el sialoadenectomizado del 32% (11/48) y en el control del 98% (34/47). En cambio, no hubo diferencias significativas en las latencias de aparición de los tumores: $57,6 \pm 3,4$ semanas en el grupo ovariectomizado; $52,5 \pm 3,8$ semanas en el sialoadenectomizado y $50,1 \pm 2,1$ semanas en el control.

El análisis histológico de los tumores permitió clasificarlos en lobulillares y ductales.

LESIONES LOBULILLARES

Los carcinomas lobulillares se caracterizaban por estar compuestos de células atípicas redondas o poligonales, con un alto índice mitótico, que formaban masas infiltrantes sólidas o con pequeñas estructuras glandulares uniformes (carcinoma tubular). El estroma era escaso. Los conductos no mostraban lesiones llamativas. En etapas posteriores la proliferación destruyó los tejidos adyacentes y borró las lesiones preneoplásicas. No hemos observado metástasis. Aún en carcinomas invasores se pudieron reconocer áreas con hiperplasia acinar de tipo HAN, con aumento en el número de las estructuras lobulillares y displasia, y secre-

Figura 32



Incidenca tumoral en hembras BALB/c vírgenes tratadas con MPA depot. Grupo 1: ovariectomizadas; Grupo 2: sialoadenectomizadas y Grupo 3: controles.

ción focal en algunos lobulillos. Los carcinomas *in situ*, se caracterizaban por la presencia de masas sólidas de células redondas, de citoplasma claro y núcleo redondo central, que ocupaban parcial o totalmente los acinos. Estas estructuras dilatadas comprimían parcialmente el estroma circundante pero la proliferación respetó la membrana basal. En la Figura 33 se muestran imágenes características de las lesiones preneoplásicas (a) y de los carcinomas (b) lobulillares.

LESIONES DUCTALES

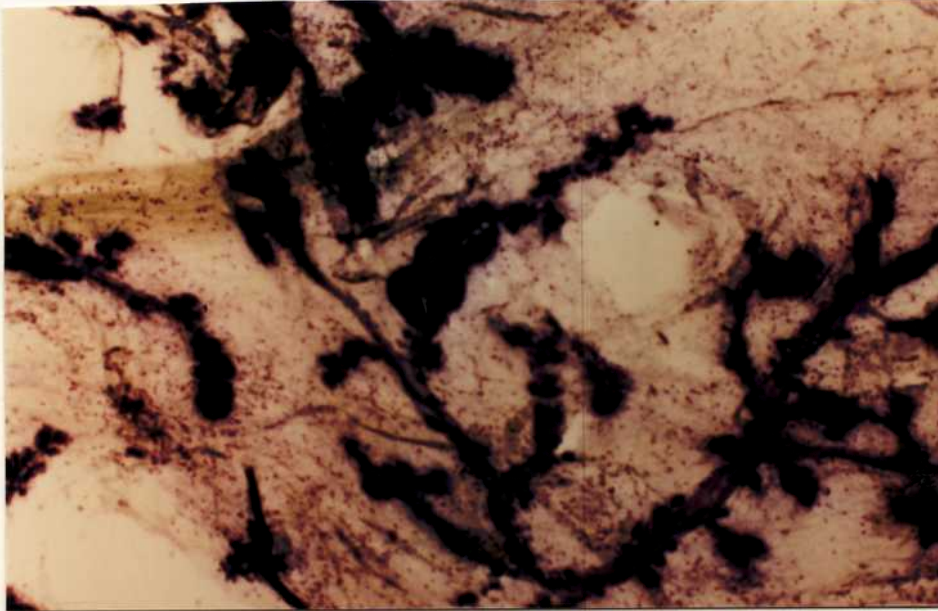
Los carcinomas ductales consistían estructuras quísticas, tapizadas por epitelio glandular con varias capas de células, con diferenciación tubular ocasional. En otros focos se observaba proliferación sólida, también con áreas de diferenciación tubular y con una extensa infiltración del estroma. Los tumores estaban compuestos por células poligonales grandes, con evidentes atipías, en ocasiones con citoplasma espumoso ("células claras"). El índice mitótico fue, en general, bajo (menos de una mitosis por campo de mayor aumento). El estroma era fibroso y mostraba una extensa infiltración linfoplasmocitaria. En algunos focos se reconocieron alteraciones preneoplásicas del epitelio ductal caracterizadas por la presencia de estructuras ductales dilatadas, revestidas de epitelio atípico, a veces con estructuras papilares, con delgados ejes conectivo-vasculares. En otras áreas se observó proliferación intraductal sólida con ocasional adenosis intraductal o conductos con un revestimiento sólido, constituido por varias capas de células. El estroma de estas lesiones preneoplásicas presentaba un aumento de la sustancia amorfa intercelular e infiltración inflamatoria crónica. La Figura 34 muestra imágenes características de las lesiones preneoplásicas (a) y de los carcinomas ductales (b).

En tres grupos (ovariectomizados, sialoadenectomizados y controles), predominaron los tumores ductales (Tablas 11, 12, 13).

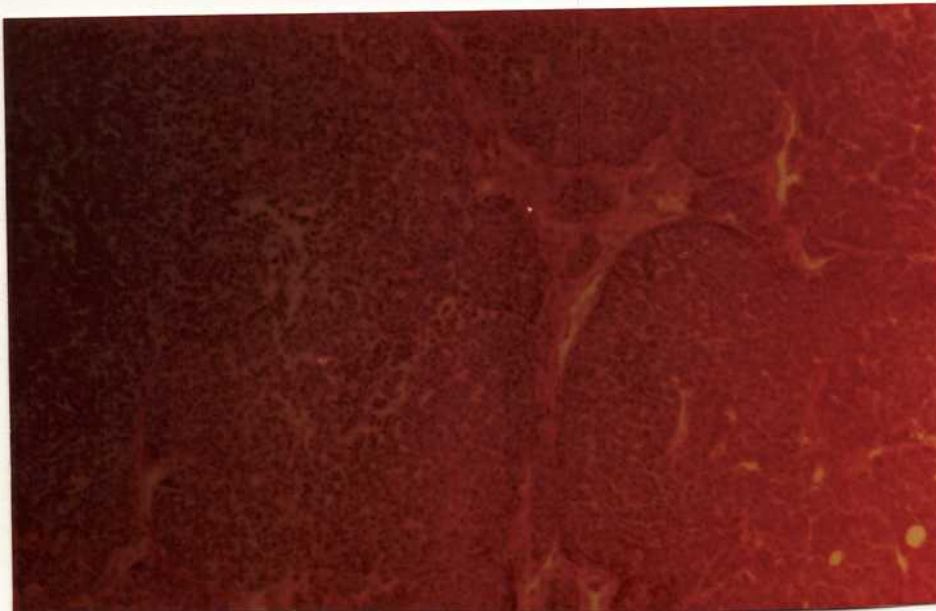
Nueve tumores de los que aparecieron en el grupo ovariectomizado, 8 del grupo sialoadenectomizado y 27 de los controles se transplantaron en animales singeneicos, tratados

Figura 33

a



b

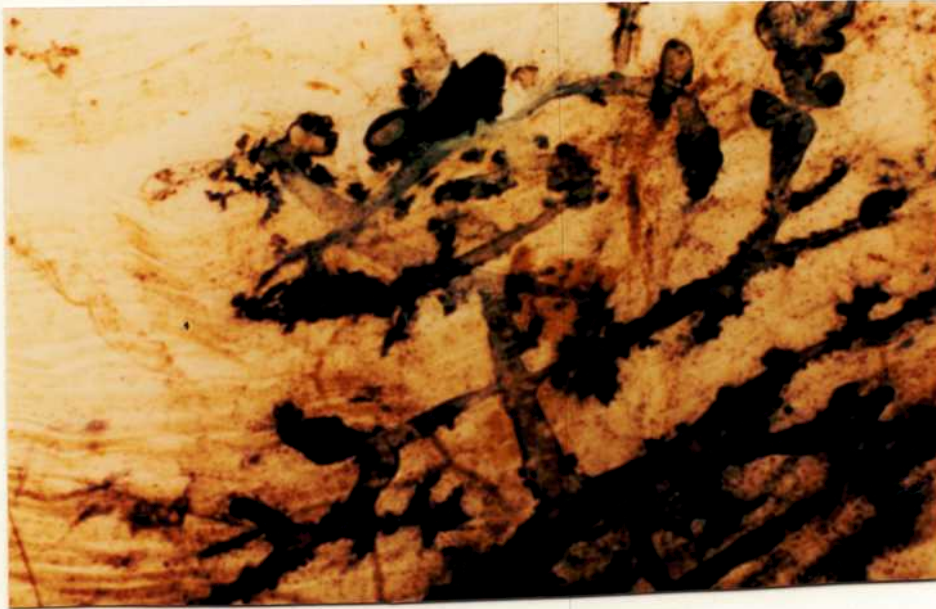


a) Lesiones preneoplásicas lobulillares. Se observa la proliferación de estructuras lobulillares a lo largo de conductos delgados que se ramifican en forma relativamente uniforme. Esta proliferación es irregular y en distintos focos se observa hiperplasia lobulillar proximal, con desarrollo menor de las áreas distales (Montaje total, Azul de Toluidina, 25X).

b) Carcinoma lobulillar compuesto por grupos de células que diferencian islotes o cordones sólidos y que en áreas tienden a formar tubos glandulares o acinos de luz pequeña. El estroma es fibroblástico y escaso, y el tumor está bien vascularizado (Hematoxilina-Eosina, 40X).

Figura 34

a



b



a) Lesiones preneoplásicas ductales. Las estructuras ductales están dilatadas irregularmente, se observan divisiones en ángulo recto con inversión del sentido de aumento del calibre ductal. Existen también numerosos brotes hiperplásicos paraductales y alteraciones de la forma y tamaño de las brotes terminales (Montaje total, Azul de Toluidina, 25X).

b) Carcinoma ductal. El tumor está compuesto por grupos de células que forman láminas sólidas. Éstas delimitan una cavidad quística irregular que contiene sangre, células descamadas y material amorfo. La lesión infiltra extensamente el estroma adyacente que es fibroblástico denso. La vascularización es completa (Hematoxilina-Eosina, 40X).

Tabla 11

Grupo ovariectomizado con MPA depot

Tumores	histología tumor original	comportamiento pasajes	RE*	RP*
1	ductal	HD	79	110
5	ductal	HD	NR	NR
7A	NR	HD	115	154
7B1	NR	HD	NR	NR
7B2	NR	HD	NR	NR
7B3	NR	HD	NR	NR
9A	lobulillar	HI	NR	NR
9B	ductal	HD	0-42	58-182
11	NR	HI	0	4

* fmol/mg proteína

NR: no realizado

Tabla 12**Grupo sialoadenectomizado con MPA depot**

Tumores	histología tumor original	comportamiento pasajes	RE*	RP*
17.1	ductal	HD	53	133
17.2	ductal	HD	91	137
17.3	ductal	HD	NR	NR
17.4	ductal	HD	64	247
22A	lobulillar	HI	87	126
22B	ductal	HD	NR	NR
23	ductal	HD	40	179
24	lobulillar	HI	47	NR

* fmoles/mg proteína

NR: no realizado

Tabla 13

Grupo MPA depo control

Tumores	histología	comportamiento pasajes	RE *	RP *
49A	ductal	HD	33	193
49B1	ductal	HD	NR	NR
49B2	ductal	HD	35	120
50A	lobulillar	HI	4	5
50B1	ductal	HD	86	311
50B2	NR	HD	53	105
51	NR	HD	NR	NR
52A	ductal	HD	8-46	29-280
52B	lobulillar	HI	NR	NR
53A	NR	HD	NR	NR
53B	ductal	HI	61	73
53C	lobulillar	HI	54	0
54	lobulillar	HI	0-29	27-29
55A	NR	HI	8-80	0-44
55F	ductal	HD	30	14
55E	ductal	HD	NR	15
55B	lobulillar	HI	5	0
56A	ductal	HD	63	57
56B	NR	HD	11	0
56C	NR	HD	0	NR
57A	NR	HD	NR	NR
57B	ductal	HD	4-18	41-205
58A	NR	HD	75-131	60-315
58B	lobulillar	HI	NR	NR
59A	ductal	HD	67,41	40-156
60A	lobulillar	HI	0-64	0-159
60B	ductal	HD	NR	NR

* fmol/mg proteína
NR: no realizado

o no con MPA. Estos pasajes se clasificaron en HI y HD: se consideraron HI a aquellos tumores capaces de crecer hasta alcanzar tamaños superiores a los 400 mm³ en animales sin tratamiento hormonal y HD a aquellos que alcanzaron tamaños comparables únicamente en ratones tratados con MPA. Siete de los nueve (78%) del primer grupo, 6/8 (75%) del segundo y 18/27 (67%) del grupo control se comportaron como HD en el primer pasaje y la mayoría expresaban RE y RP (Tablas 11, 12 y 13). Los resultados resumidos en la Tabla 14 indican que los tumores de mama que surgieron en los animales ovariectomizados y sialoadenectomizados eran similares a los de los controles en cuanto a sus características histológicas y a su hormonodependencia. En todos los casos puede decirse que el MPA indujo la aparición de tumores en su mayoría ductales y hormonodependientes. En cambio, resultó sumamente llamativa la asociación entre las características histológicas y la hormonodependencia de los tumores. En los tres grupos se observó que la mayoría de los pasajes de tumores ductales resultaron HD, mientras que los lobulillares se comportaron en forma autónoma (Tabla 15) ($p < 10^{-5}$).

INDUCCIÓN DE ADENOCARCINOMAS DE MAMA EN BALB/c CON PROGESTERONA

La P tuvo una capacidad estimuladora similar al del MPA sobre el crecimiento de tumores inducidos por MPA. Quisimos entonces averiguar si la P también tenía actividad carcinogénica. En este experimento debíamos usar pellets de silastic para tener un sistema de liberación lenta de P, por lo tanto los controles positivos fueron implantados con pellets de MPA en lugar de usar MPA depot. Al comparar los dos sistemas de administración del MPA encontramos que, aunque la cantidad de hormona suministrado por ratón fue mucho menor (160 mg depot vs 60 mg en dos pellets a lo largo de todo el experimento), el MPA conservó su capacidad tumorigénica (Fig. 35). La P también tuvo la capacidad de inducir tumores de mama (9/48) (Fig. 36). A los 16 meses de comenzado el experimento, la incidencia actuarial fue significativamente menor que en los animales tratados con MPA ($p = 0,047$), aunque el grado de significación fue menor que en la inhibición por ovariectomía

Tabla 14

Tumores inducidos por MPA

Características histológicas y hormonodependencia de los pasajes

Tratamiento	ductal	lobulillar	HD	HI
ovx	75% (3/4)	25% (1/4)	78% (7/9)	22% (2/9)
sialx	75% (6/8)	25% (2/8)	75% (6/8)	25% (2/8)
control	63% (12/19)	37% (7/19)	67% (18/27)	33% (9/27)
Total	68% (21/31)	32% (10/31)	70% (31/44)	30% (13/44)

p=n.s.

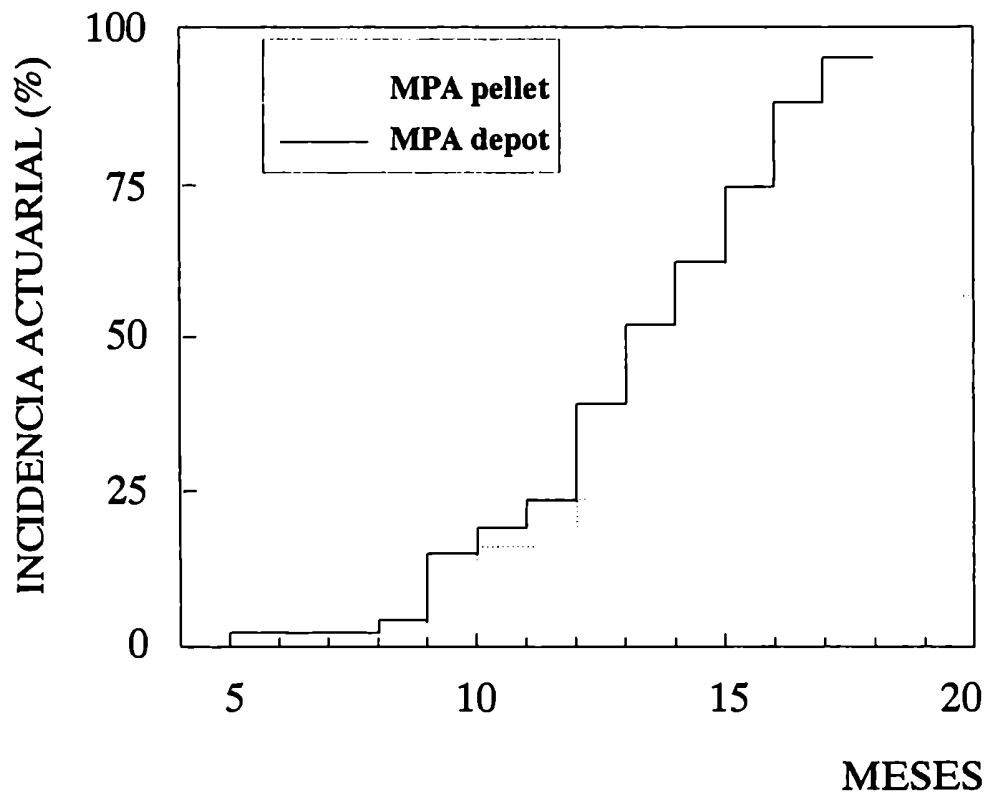
p=n.s.

Tabla 15

**Tumores inducidos por MPA depot
Relación entre histología y hormonodependencia**

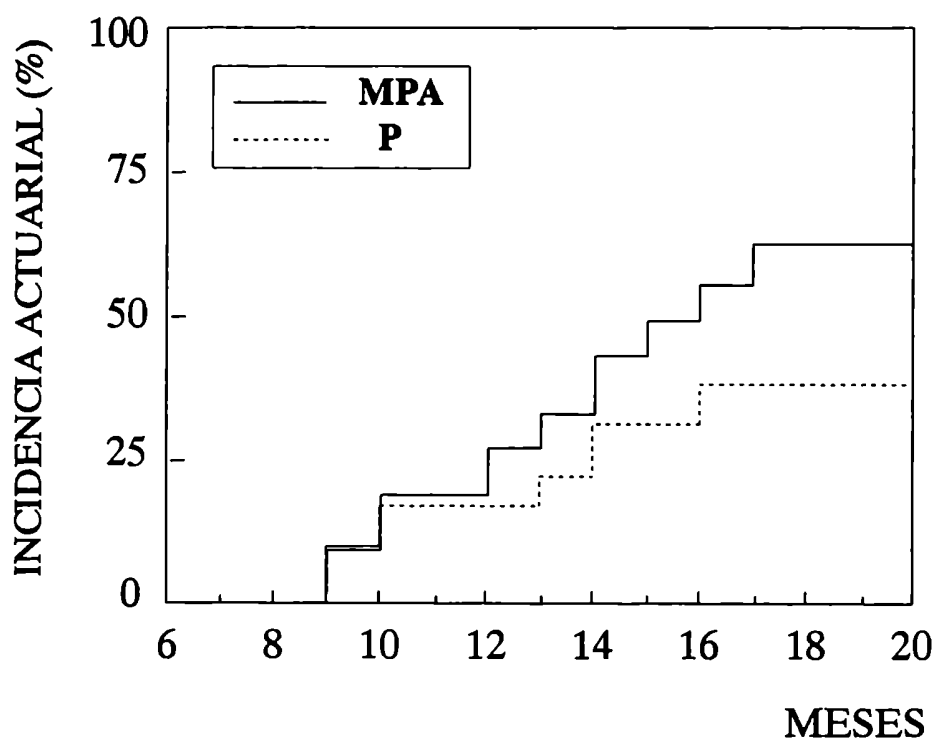
Tumores	Lobulillares	Ductales
HD	0	20
HI	10	1

Figura 35



Incidence tumoral en hembras BALB/c tratadas con MPA depot (40 mg cada 2 meses) o implantadas con pellets de MPA (40 mg al comienzo y 20 mg 6 meses más tarde).

Figura 36



Incidencia tumoral en hembras BALB/c implantadas con pellets de MPA o de P.

o sialoadenectomía. Las latencias de aparición de los tumores fueron similares en los ratones tratados con P o MPA: $46,2 \pm 13,1$ y $51,3 \pm 9,9$ semanas, respectivamente. En cambio, los tumores que aparecieron en los dos grupos difirieron significativamente tanto en sus características histológicas como en el comportamiento de sus pasajes. Sólo 1 de los 5 tumores analizados histológicamente era de tipo ductal y sólo 2 de los 7 pasajes realizados resultaron HD. El único tumor que resultó HD en los pasajes y que fue estudiado histológicamente era ductal, el resto de los tumores estudiados fueron de morfología lobulillar y de comportamiento HI (Tabla 16). En el grupo tratado con MPA, de 17 tumores analizados 15 eran ductales y de 16 tumores transplantados, 13 fueron HD, 1 HI y 2 no pudieron ser clasificados por que crecían muy lentamente aún en presencia de MPA. El único pasaje tumoral de comportamiento HI provino de un tumor lobulillar y todos los HD provinieron de adenocarcinomas ductales (Tabla 17). Estos resultados se resumen en la Tabla 18.

En este experimento se observó nuevamente que los tumores ductales resultaron HD en los pasajes y los tumores lobulillares tuvieron un comportamiento autónomo ($p = 1,6 \times 10^{-4}$) (Tabla 19).

Los dos últimos experimentos nos llevaron a concluir que, independientemente del tratamiento al que hayan sido sometidos los distintos grupos experimentales, en los adenocarcinomas de mama inducidos por progestágenos la morfología lobulillar se asoció a un patrón de crecimiento autónomo, mientras que la morfología ductal estaba asociada a un comportamiento hormonodependiente ($p < 10^{-5}$) (Tabla 20).

Tabla 16

Grupo progesterona

Tumores	histología tumor original	comportamiento pasajes	RE*	RP*
39A	lobulillar	HI	NR	NR
39B	lobulillar	HI	NR	NR
44	lobulillar	HI	NR	NR
47	ductal	HD	0	0
48A	NR	HI	0	0
48B	lobulillar	HI	0	0
48C	NR	HD	10	0

* fmol/mg prot
NR: no realizado

Tabla 17

Grupo MPA pellet

Tumores	histología	comportamiento pasajes	RE*	RP*
25A1	ductal	HD	126	94
25A2	NR	HD	65	52
25B	lobulillar	HI	8	20
26B	ductal	HD	3	107
26A	ductal	HD	NR	NR
30A	ductal	HD	0-38	53-66
30B	ductal	HD	0	0
30C	NR	HD	8	0
32A	ductal	HD	60	115
32B	ductal	HD	25	0
33A	ductal	HD	NR	NR
33B1	ductal	HD	NR	0
33B2	NR	NC	NR	NR
35	lobulillar	NC	12	0
36A	ductal	HD	4	109
36B	ductal	HD	NR	56

* fmol/mg prot

NR: no realizado

NC: no clasificable

Tabla 18

Tumores inducidos por MPA y P Histología y hormonodependencia de los pasajes

Pellets	ductales	lobulillares	HD	HI
MPA	89% (15/17)	12% (2/17)	93% (13/14)	7% (1/14)
P	20% (1/5)	80% (4/5)	29% (2/7)	71% (5/7)

Tabla 19

Tumores inducidos por MPA y P

Relación entre histología y hormonodependencia

Tumores	Lobulillares	Ductales
HD	0	12
HI	5	0

Tabla 20

Evaluación final

Relación histología-hormonodependencia

Tumores	Lobulillares	Ductales
HD	0	32
HI	15	1

DISCUSIÓN

En nuestro laboratorio se han desarrollado líneas tumorales *in vivo* a partir de los pasajes singeneicos de los adenocarcinomas de mama inducidos por MPA en ratones hembras BALB/c vírgenes. Estas líneas fueron clasificadas en "dependientes de MPA" (MPA-D) o "autónomas" (MPA-I) según su requerimiento de MPA para crecer en los animales transplantados (*Lanari y col.*, 1989). En los experimentos descritos en la primera parte de este trabajo se ha estudiado la regulación hormonal del crecimiento de estos tumores. Los resultados obtenidos muestran que las células de tumores MPA-D mantienen su capacidad de respuesta a través de sucesivos pasajes aunque permanezcan largo tiempo en animales sin tratamiento hormonal. La progesterona tuvo una actividad estimuladora similar a la del MPA sobre estos tumores, mientras que la ovariectomía y el tratamiento con estrógenos inhibieron su desarrollo. Además se comprobó que factores provenientes de las glándulas salivales no jugaban un rol fundamental en el desarrollo de las líneas tumorales estudiadas. Otro efecto observado en las líneas MPA-D, fue que el tratamiento con MPA disminuía los receptores de progesterona y aumentaba los receptores para estrógenos.

La segunda parte de este trabajo está constituida por experimentos de inducción tumoral. Los resultados muestran que el tratamiento con MPA aumentó la incidencia de tumores de mama en la cepa C3H, portadora del MMTV. En la cepa BALB/c se demostró que la capacidad tumorigénica del MPA se veía significativamente reducida si los animales habían sido ovariectomizados o sialoadenectomizados previamente. Además, se encontró que el tratamiento con progesterona también llevaba a la aparición de adenocarcinomas de mama en esta cepa. Sin embargo, tanto la morfología como la hormonodependencia de los tumores inducidos por ambos progestágenos fueron diferentes. Los estudios histológicos y el seguimiento de los pasajes singeneicos revelaron una estrecha asociación entre la morfología y la hormonodependencia de estos tumores.

CAPACIDAD REGULATORIA DEL MPA SOBRE EL CRECIMIENTO TUMORAL

En nuestro modelo de tumores de mama de ratón inducidos por MPA observamos

que la mayoría de los tumores MPA-D conservaban la sensibilidad a las hormonas estimuladoras durante su crecimiento en los animales transplantados y a través de los sucesivos pasajes. Aunque el grado de conservación de ese comportamiento varió en cada línea, en general la hormonodependencia se mantuvo más que en modelos experimentales de cáncer de mama que involucran al MMTV. Como se mencionó en la introducción, las hormonas están involucradas en la regulación de la expresión del virus (*Cato y col.*, 1988). Sin embargo, en la mayoría de estos modelos experimentales, el crecimiento tumoral que sigue a la lesión preneoplásica se hace independiente de las hormonas. Por ejemplo, en ratones C3H portadores de tumores de mama, las alteraciones en el estado hormonal de los animales por remoción de glándulas endócrinas o por inoculación de hormonas no modificaba las curvas de crecimiento tumoral (*Squartini*, 1979). Sin embargo, en otras cepas portadoras del MMTV, como la GR, se observó que tumores de mama dependientes de la preñez desaparecían después del parto (*Van Nie y Deux*, 1971). Como se mencionó anteriormente, en esta cepa, el tratamiento continuo con estrona y progesterona indujo tumores de mama en ratones ovariectomizados (*Sluysen y Van Nie*, 1974). La mayoría de los tumores se mantuvieron dependientes de estas hormonas en el primer pasaje, sin embargo, la capacidad de respuesta fue disminuyendo durante los pasajes subsiguientes: a partir del quinto trasplante los tumores crecían rápidamente aún en animales castrados sin tratamiento hormonal (*Sluysen y Van Nie*, 1974). En cambio, en nuestro modelo, en ninguna de las líneas MPA-D se observó una progresión a la autonomía tan rápida. Además, en la cepa GR la adquisición del comportamiento autónomo se asociaba a la pérdida de receptores hormonales (*Sluysen y Van Nie*, 1974), lo cual no ocurrió en nuestro modelo.

Los tumores inducidos por MPA, en cambio, son más parecidos a los carcinomas de mama de ratón inducidos por carcinógenos químicos tanto en su comportamiento como en su morfología: como éstos fueron precedidos por lesiones preneoplásicas ductales (*Medina y Warner*, 1977), y la mayoría mantuvo la hormonodependencia a través de los sucesivos pasajes. Por ejemplo, se observan estas similitudes en el tumor de mama MXT, que proviene de un modelo desarrollado por *Watson y col.* (1977) en ratones hembras C57bl/DBA2 F1 tratados con el carcinógeno uretano y portadores de un injerto de hipófisis en la cápsula renal. Se trata de un adenocarcinoma ductal ovario-dependiente que, lo mismo que nuestro

C4-HD, permaneció HD durante más de 20 pasajes (*Watson y col.*, 1979). Como en nuestro modelo y a diferencia de los tumores HD de la cepa GR, los niveles de RE y RP se conservaron a través de los pasajes (*Watson y col.*, 1977; *Kiss y col.*, 1986b, *Sluyser y Van Nie*, 1974). Además, en los tumores MXT la administración de progesterona también estimuló el crecimiento tumoral (*Kiss y col.*, 1986a). En la cepa BALB/c, también se ha descrito que tumores inducidos por uretano permanecieron ovario-dependiente hasta el pasaje número 15 (*Matzuzawa y col.*, 1978).

Los tumores MPA-D respondieron tanto a la administración como a la remoción de las hormonas estimuladoras, aún cuando habían alcanzado tamaños palpables. También respondieron a la estimulación hormonal tumores MPA-D que habían permanecido latentes por más de 8 meses. Es conocida la capacidad de las células tumorales de permanecer en estado "dormido" por largo tiempo. Particularmente en pacientes con carcinomas de riñón, mama, ovario y melanomas malignos se ha observado que muchos años después (10 a 50) de la remoción, aparentemente total, del tumor se producía la reaparición local o el surgimiento de metástasis (*Woodruf*, 1982). Se dice que estos tumores permanecen en estado "latente". Tumor latente es aquel en el cual las células persisten en un huésped clínicamente normal por un período prolongado, con un crecimiento restringido. El incremento pequeño o nulo del número de células puede deberse a la detención de la división o a un balance entre la división y la muerte celular. Existen tres mecanismos que explicarían la falta de proliferación: (a) avascularidad y secuestro de las células tumorales, (b) dependencia constitutiva de las células tumorales de hormonas o factores de crecimiento y (c) restricción inmunológica (*Wheelock y Robinson*, 1983). Anteriormente se había demostrado que el efecto del MPA sobre el crecimiento de los tumores era el mismo en ratones inmunocompetentes que en ratones nude (*Lanari y col.*, 1989). Por lo tanto es improbable que en nuestro modelo el estado de latencia de los tumores se deba a una restricción inmunológica inhibible por la administración de MPA. Los altos niveles de RP observados en todos los tumores MPA-D y los resultados preliminares que indican que el MPA es capaz de estimular la proliferación de las células tumorales *in vitro* (*Luthy y col.*, 1990) sugieren que la hormona actúa directamente sobre las células tumorales. Pero, de todos modos, no podemos decidir si la opción a) o la b) es la correcta hasta que no se disponga de evidencias que demuestren que

el MPA estimula el crecimiento de los tumores latentes actuando directamente sobre las células tumorales que permanecen en estado quiescente. En otros modelos experimentales también se ha demostrado que las hormonas pueden estimular el crecimiento de tumores que han permanecido latentes por largo tiempo. Por ejemplo, tumores de mama HD inducidos por estrógenos, pueden permanecer "dormidos" durante más de 7 meses, conservando su hormonodependencia (Noble y Hoover, 1975). Sin embargo, como se detalla más abajo, la experiencia *in vivo* e *in vitro* muestra que el estado quiescente que se obtiene por ausencia de las hormonas tróficas es temporario ya que las células adquieren finalmente un crecimiento autónomo (Noble, 1977; Darbre y King, 1984).

La conservación de la hormonodependencia en nuestro modelo también se observa en aquellos tumores que fueron capaces de crecer en animales ovariectomizados a los que se les había retirado el pellet de MPA o P. En sus correspondientes pasajes la mayoría no perdió la capacidad de respuesta hormonal y todos los tumores conservaron los receptores para esteroides. Es posible que estos tumores RE+ PR+, que crecían en animales ovariectomizados sin tratamiento hormonal, creciesen a expensas de esteroides adrenales, lo cual ha sido demostrado en modelos experimentales de tumores hormonodependientes de rata (Spinola y col., 1986) y ratón (Bélanger y col., 1985).

Además del efecto proliferativo sobre los tumores MPA-D, el tratamiento con MPA también modificaba la expresión de los receptores hormonales. Al menos en la línea C7-HD se observó que los tumores provenientes de ratones tratados con MPA expresaban niveles inferiores de RP. Para comprobar que la disminución del número de receptores no se debía a una interferencia con el MPA circulante, se incubó la fracción citosólica durante 5 horas con MPA frío (10^{-6} M) que luego se extrajo con carbón al 1% antes del ensayo de intercambio. La dilución isotópica de la marca radioactiva observada en este ensayo correspondió sólo al 15% de la reducción de cuentas observada en los tumores de animales tratados con MPA. Este resultado confirmó que el MPA regulaba negativamente los PR. La capacidad del MPA de disminuir la expresión de los PR fue observado anteriormente en otros carcinomas hormono-respondedores (Satyaswaroop y col., 1988; Zaccheo y Di Salle, 1986). En el cáncer de mama humano se le atribuye al MPA la capacidad de disminuir los niveles de

RE (*Robustelli Della Cuna y Preti*, 1986) siendo ésta una de las explicaciones de su actividad antitumorígenica. Sin embargo, en nuestro modelo, esta regulación negativa no fue observada e incluso en algunos casos los tumores de animales tratados con MPA tenían niveles más altos de RE que los controles (Tabla 6).

Se ha demostrado que en el ratón, el MPA tiene actividades androgénicas. Por ejemplo, como la testosterona, incrementa los niveles de EGF biológicamente activo en las glándulas salivales (*Bullock y col.*, 1975). Por lo tanto era posible que el MPA estimulara el crecimiento tumoral a través de su actividad androgénica. Sin embargo, el crecimiento de tumores MPA-D en machos fue mucho más lento que en hembras no ovariectomizadas (Tabla 5). Esto demuestra que los andrógenos no estimulan significativamente el crecimiento de tumores MPA-D. Además, la P tuvo un efecto estimulador muy similar al del MPA (Fig. 15). Ambos resultados indican que el MPA estimularía el crecimiento de los tumores MPA-D a través de su actividad progestagénica. Esto nos permite decir que los tumores MPA-D son en realidad dependientes de la estimulación progestagénica.

EFEECTO DE LA OVARIECTOMÍA

La ovariectomía retardó el crecimiento de los tumores MPA-D tanto en presencia como en ausencia de MPA (Figs. 11 y 12). Otros autores han demostrado la importancia de los ovarios en el desarrollo de tumores de mama en rata (*Russo y col.*, 1982; *Schneider y col.*, 1989) y ratón (*De Launoit y col.*, 1987; *Matsuzawa y Yamamoto*, 1975; *Welsch y Nagasawa*, 1977); en esos casos se explicaba el efecto inhibitorio de la ovariectomía por la disminución en el aporte de hormonas sexuales que actuarían en forma directa y/o estimulando la secreción de prolactina. En nuestro modelo esta explicación sería posible únicamente para los ratones no tratados con MPA, dado que este progestágeno inhibe la secreción de hormonas hipofisarias como gonadotrofinas y prolactina (*Nagasawa y col.*, 1985; *Robustelli Della Cuna y Preti*, 1986), suspende el ciclo estral (*Lanari y col.*, 1986a) y como consecuencia también inhibe la secreción de estrógenos ováricos.

En la clínica se observó que durante la terapia con dosis altas de MPA se produce una dramática caída de los niveles séricos de la proteína transportadora de esteroides sexuales SHBG, lo cual podría resultar en un incremento de la proporción de estrógenos circulantes libres para interactuar con los RE (Pollow y col., 1988). Además, en nuestro modelo hemos observado que el tratamiento con MPA puede elevar el nivel de expresión de los RE en los tumores (Tabla 6), aumentando la sensibilidad a los estrógenos. Teniendo en cuenta que *in vitro* las líneas celulares dependientes de estrógenos requieren de bajas concentraciones de E_2 para obtener una máxima respuesta proliferativa (10^{-9} a 10^{-11} M) (Soto y Sonnenschein, 1987; Thomson y col., 1988), no podemos descartar que en nuestro modelo el aporte de los ovarios al crecimiento tumoral se deba a la liberación de muy pequeñas cantidades de estrógenos.

Los ovarios secretan además factores que podrían desempeñar un rol importante en la regulación del crecimiento tumoral. Dos de estos factores son estructuralmente muy semejantes al TGF- β : activinas e inhibinas (Risbridger y col., 1990). Aunque aún no hemos dilucidado si en nuestro modelo el TGF- β tiene un rol importante, este factor inhibe *in vitro* el crecimiento de las células estrógeno-dependientes MCF-7 (Dickson y Lippman, 1987). Por otra parte, los adenocarcinomas de mama inducidos por MPA expresan receptores de TGF- β y el MPA inhibe la transcripción de este factor en tumores MPA-D (Elizalde y col., 1991). Las actividades relativas de las activinas, inhibinas y el TGF- β dependen del tejido blanco. Las activinas tienen efectos opuestos al TGF- β sobre las células de la granulosa (Ignatz y Messague, 1986), pero tienen efectos similares, opuestos a los de las inhibinas, sobre la secreción de FSH (Risbridger y col., 1990) y en el crecimiento de líneas celulares gonadales (Gonzalez Manchon y Vale, 1989). Estos factores podrían actuar directamente sobre las células tumorales o a través de la modulación de la secreción de hormonas hipofisarias como prolactina u hormona de crecimiento (Bilezikjian y col., 1990). La suposición de que estos factores podrían ser relevantes en el crecimiento tumoral aún durante el tratamiento con MPA se fundamenta en la observación de que en ratas preñadas o pseudopreñadas, con niveles de progesterona circulante altos, la concentración de inhibinas en sangre periférica proveniente de los ovarios era también relativamente alta (Taya y col., 1989).

Otro factor ovárico que podría estar involucrado es el factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I) el cual es sintetizado y secretado por las células de la granulosa del ovario bajo el control de hormonas regulatorias como LH, FSH y estradiol (*Oliver y col.*, 1989). Este factor es secretado por células de cáncer de mama humano (*Huff y col.*, 1986) y aunque no se conoce completamente su mecanismo de acción, probablemente actúe como mitógeno a través de la unión a su receptor (*Dickson y Lippman*, 1987). Los tumores inducidos por MPA también expresan tanto el factor IGF-I como sus receptores (*Elizalde y col.*, 1990); por lo tanto el mismo factor proveniente de los ovarios podría regular parcialmente el crecimiento tumoral.

CRECIMIENTO DE TUMORES MPA-D EN AUSENCIA DE HORMONAS ESTIMULADORAS

Los tumores que conservaron la dependencia hormonal a pesar de haber crecido en hembras ovariectomizadas sin MPA ni P, podrían haberlo hecho a expensas de esteroides adrenales. Se ha demostrado que las glándulas adrenales de ratones machos castrados pueden secretar pequeñas cantidades de progesterona u otros esteroides (*Bélanger y col.*, 1985) que, en nuestro modelo, podrían estimular el crecimiento de células HD en las hembras ovariectomizadas.

Labrie y col. (1986) han demostrado que *in vitro* un tumor andrógeno-dependiente podía contener poblaciones de una marcada heterogeneidad en cuanto a su capacidad de crecimiento espontáneo en ausencia de andrógenos y a su capacidad de responder al estímulo hormonal. A partir de estos resultados postularon que el bloqueo completo de la secreción de hormonas proliferativas en los pacientes portadores de tumores HD era indispensable pues de lo contrario se permitía el crecimiento de las poblaciones hipersensibles. Debido a que en nuestro modelo no nos es posible aún medir la capacidad de respuesta hormonal *in vitro*, evaluamos la sensibilidad hormonal midiendo el nivel y la constante de afinidad de los RP de los tumores creciendo *in vivo*. Un aumento en estos parámetros hubiera indicado que los tumores habían adquirido una hipersensibilidad que les permitía crecer en

medios hormonalmente pobres. Sin embargo, no se observaron modificaciones en los RP de tumores que retomaron su crecimiento después de haberles retirado la hormona estimuladora (progesterona). Por lo tanto estos tumores no crecieron gracias a un aumento de la expresión de RP ni a la prevalescencia de receptores con mayor afinidad por la hormona.

Otro factor que podría estimular el crecimiento tumoral en ausencia de esteroides sexuales es el EGF. A pesar de que en nuestro modelo la sialoadenectomía no tuvo un claro efecto inhibitorio del crecimiento tumoral, es posible que el EGF secretado por las glándulas salivales cobrara mayor importancia en los animales ovariectomizados. Kurachi y col. (1985) han informado que las concentraciones de EGF en las glándulas submaxilares de ratones hembras vírgenes aumenta a las 30 semanas de vida. Este incremento se debería a disfunciones ováricas provocadas por el envejecimiento. Por lo tanto, la ovariectomía podría ejercer un efecto similar, y en ese caso el EGF podría ser el estimulador del crecimiento tumoral.

En la línea celular andrógeno-dependiente SC115 se ha demostrado que la transición a la autonomía se produce por una serie ordenada de cambios fenotípicos que son reversibles si la falta de hormonas estimuladoras no se prolonga por encima de un determinado lapso (*Darbre y King, 1984, 1988*). En nuestro modelo podría postularse un mecanismo similar según el cual, las células tumorales que fueron capaces de crecer en ausencia de las hormonas estimuladoras y conservaron la respuesta al tratamiento hormonal en el pasaje subsiguiente, se encontrarían en las etapas "tempranas" y reversibles de la adquisición del fenotipo autónomo.

INHIBICIÓN POR TRATAMIENTOS ESTROGÉNICOS

En nuestro modelo los estrógenos se comportaron como potentes inhibidores del crecimiento de tumores RE+ RP+. Históricamente, siempre se consideró a los estrógenos como hormonas que estimulan la proliferación celular en sus órganos blanco (*Mauvais-Jarvis, 1983*). Sin embargo, también se ha observado que bajo determinadas circunstancias, estas

hormonas pueden inhibir el crecimiento celular. La administración de E_2 a ratones de la cepa DS portadores del carcinoma de mama andrógeno-dependiente Shionogi 115 (SC115) redujo el desarrollo tumoral (Nonho y col., 1982). En la línea celular estrógeno-dependiente MCF-7, el E_2 , a una concentración de 10^{-8} M, inhibió la proliferación *in vitro*. Este efecto no se debería a una actividad citotóxica específica sino a un aumento en la duración del ciclo celular (Weichselbaum y col., 1978). También se observaron efectos inhibitorios sobre la variante C7 MCF-7-173 usando concentraciones más bajas: 3×10^{-8} M a 3×10^{-10} M (Soto y Sonnenschein, 1985). En la clínica una de las terapias hormonales tradicionales en el cáncer de mama RE+ era la administración de dosis farmacológicas de estrógenos. Durante estos tratamientos se observó que, paradójicamente, mujeres premenopáusicas que respondían favorablemente a la ovariectomía (supuestamente por la disminución de los niveles de estrógenos circulantes) también mostraban regresión tumoral cuando se les administraba dosis altas de estrógenos (Vorherr, 1980). En base a estas observaciones se propuso que las bajas concentraciones de estrógenos ováricos serían estimuladoras mientras que las altas concentraciones farmacológicas inhibirían el crecimiento tumoral.

También en nuestro modelo tanto la ovariectomía como los estrógenos inhibieron el desarrollo tumoral, aunque la primera tuvo un efecto antiproliferativo mucho más débil y restringido que la segunda. Además, la capacidad inhibitoria de los estrógenos no requeriría de concentraciones muy altas ya que el efecto persistió aún cuando se habían alcanzado niveles séricos fisiológicos (inferiores a los alcanzados por una hembra normal durante la fase estral del ciclo) (Tabla 8).

No conocemos los mecanismos por los cuales los estrógenos producen regresión tumoral en nuestro modelo. Las observaciones realizadas *in vitro* sobre células tumorales de mama humanas indican que en general la terapia hormonal no sería citotóxica (Weichselbaum y col., 1978); aparentemente ésta no produce una muerte celular inmediata sino un cambio en el equilibrio entre la renovación y la muerte celular que da como resultado una lenta disminución del tamaño tumoral (Nordenskjold, 1978). Tampoco se le atribuyen efectos citotóxicos a los estrógenos en la terapia hormonal del carcinoma de próstata en la cual la acción antitumoral se debería a la inhibición de la secreción de andrógenos

(*Ekman y col., 1979*) lo cual impediría la proliferación de la células hormonodependientes.

El análisis histológico de los tumores C7-HI que habían regresionado por el tratamiento con BE mostró grupos de células grandes poligonales con citoplasma claro (Fig. 28). Esta imagen indica que la regresión tumoral, en este caso, no se debería a un fenómeno de **apoptosis**. Este fenómeno se caracteriza porque las células aparecen aisladas o unidas en pequeños grupos que, en los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina, aparecen como masas redondas u ovales de citoplasma fuertemente eosinófilo, con fragmentos de cromatina densa (*Cotran y col., 1989*). La **apoptosis** es el mecanismo responsable de la destrucción celular programada que se observa durante la embriogénesis, en la involución hormonodependiente normal de algunos órganos como el endometrio (*Cotran y col., 1989*) y también, durante la regresión de tumores hormonodependientes (*Gullino, 1980*).

Las modificaciones histológicas que fueron observadas en nuestro modelo durante la regresión tumoral son muy similares a los observados en el tratamiento estrogénico de tumores prostáticos (*Franks, 1960*). En general se propone que los estrógenos actúan sobre los tumores de próstata en forma indirecta, inhibiendo la secreción de andrógenos que estimulan el crecimiento tumoral (*Ekman y col., 1979*). Sin embargo, en nuestro modelo el efecto antiproliferativo parecería ejercerse directamente sobre las células tumorales ya que tanto las líneas MPA-D como las autónomas que respondieron al tratamiento eran RE+, mientras que las RE- no lo hicieron. Además, resultados preliminares indican que el E₂ inhibe también *in vitro* la proliferación de células tumorales C4-HD (*Luthy y col., 1990*). Estas observaciones, que indican una actividad directa de los estrógenos sobre las células tumorales, también descartarían la posibilidad de que la inhibición estrogénica esté mediada por otros tipos celulares. En ensayos *in vitro* realizados en la línea MCF-7, el E₂, a pesar de su actividad proliferativa, aumentó la sensibilidad de estas células a las células citotóxicas naturales NK (*Screpanti y col., 1988*). Sin embargo, es poco probable que en nuestro modelo la inhibición se deba a la actividad de células NK ya que en los estudios histológicos de tumores en regresión no se observaron infiltraciones mononucleares (Fig. 28).

Otra posibilidad es que en nuestro modelo los estrógenos estimulen la actividad de

factores inhibidores autócrinos o parácrinos. En los tumores inducidos por MPA se han aislado péptidos similares al TGF- β (*Elizalde y col.*, 1990), su síntesis es regulada por MPA en las líneas MPA-D, y todas las líneas estudiadas presentan receptores (*Elizalde y col.*, 1991). Este factor inhibe el crecimiento de líneas celulares epiteliales, entre ellas algunas procedentes de cáncer de mama y, por ejemplo en la línea MCF-7, su secreción puede ser regulada por estrógenos y antiestrógenos (*Dickson y Lippman*, 1987). El TGF- β parece ser importante en la regulación del crecimiento de estas células, ya que en una variante antiestrógenos-resistente de la línea MCF-7, la LY 2, se halló que los antiestrógenos habían perdido la capacidad de inducir la síntesis del factor (*Knabbe y col.*, 1988).

La actividad antiproliferativa de los estrógenos a través de sus receptores podría ser explicada por la hipótesis de regulación negativa de la proliferación celular (*Soto y Sonnenschein*, 1987). Según esta hipótesis las células no requerirían de una señal positiva para comenzar a dividirse sino que la capacidad proliferativa sería constitutiva y únicamente permanecerían en estado quiescente en presencia de inhibidores séricos que les impedirían entrar en el ciclo celular. La capacidad estimuladora de las hormonas (estrógenos, andrógenos y, en nuestro caso, progestágenos) sobre células HD se debería a la interacción de estas hormonas con los inhibidores, impidiéndoles actuar sobre las células blanco. Por otra parte, dichas hormonas, al alcanzar concentraciones del orden de las constantes de asociación de sus receptores también actuarían como inhibidores directos (efecto shut-off). Experimentalmente, esto da como resultado una curva dosis-respuesta de tipo campana: una estimulación del crecimiento celular que aumenta con la concentración de la hormona hasta que en determinado punto la relación se invierte y el crecimiento celular comienza a disminuir mientras la concentración hormonal sigue aumentando. Según este punto de vista, la inhibición del crecimiento tumoral provocada por los estrógenos se debería a una acción directa sobre las células tumorales a través de sus RE. En nuestro modelo, la ausencia de un efecto estimulador podría deberse a una falta de interacción de los estrógenos con inhibidores séricos (estrociones) o a que las concentraciones resultantes de los tratamientos utilizados *in vivo* son demasiado altas como para que la estimulación sea observable .

Los resultados muestran que algunos tumores no fueron inhibibles por los estrógenos

o después de haber regresionado retomaron su crecimiento. Esto no fue sorprendente dado que en los tumores que surgen en órganos sensibles a las hormonas esteroideas la progresión hacia la falta de respuesta al control hormonal parece ser inevitable (*Foulds*, 1969). Sin embargo, en nuestro caso, la mayoría de los pasajes de los tumores resistentes a los estrógenos no habían perdido la sensibilidad a los progestágenos. Por lo tanto estos tumores estrógeno-resistentes no alcanzaron un estado de hormonoindependencia total. Los estrógenos y los progestágenos parecen regular el crecimiento tumoral por distintas vías, de modo que las células pueden hacerse insensibles sólo a una de las dos hormonas. A pesar de que el tratamiento estrogénico regula negativamente la expresión de RE, los resultados muestran que la resistencia no puede ser explicada por la falta de receptores disponibles. Los pasajes de tumores resistentes que crecieron en ausencia de estrógenos hasta alcanzar tamaños palpables, expresaban RE (Tabla 9) y no fueron inhibidos cuando se les implantó un pellet de E_2 (Fig. 26f).

PROGRESIÓN DE LOS TUMORES MPA-D HACIA LA AUTONOMÍA HORMONAL

La **progresión** puede definirse como la ocurrencia de cambios estables, hereditables e irreversibles en las características estructurales o de comportamiento en el desarrollo de un tumor (*Foulds*, 1956). Tales cambios pueden dar como resultado un aumento en la velocidad de crecimiento, modificaciones de los signos visibles de diferenciación, un aumento de la independencia de influencias hormonales, etc. (*Squartini*, 1979). En nuestro modelo hemos observado que los tumores MPA-D tendían hacia un crecimiento menos controlado dado que: 1) durante los sucesivos pasajes algunas de las líneas fueron adquiriendo una mayor velocidad de crecimiento, tanto en presencia como en ausencia de la hormona (Fig. 4); 2) en los animales ovariectomizados, la remoción de la hormona estimuladora (MPA o P) produjo una regresión tumoral significativa; sin embargo, todos los tumores retomaron su crecimiento a diferentes intervalos reteniendo sus RE y RP (Tabla 6) ; 3) en algunos casos los tumores capaces de retomar el crecimiento resultaron autónomos en los pasajes subsiguientes (sobre todo los provenientes de pasajes avanzados, ver Fig 20); 4) algunos de los

tumores desarrollaron resistencia al tratamiento inhibitorio estrogénico, y conservaron esta resistencia en los pasajes subsiguientes.

Después de un cuidadoso análisis de cientos de tumores mamarios de ratón, Foulds (1956) propuso ciertas reglas que regularían la progresión. Dos de estas reglas se observaron claramente en nuestro modelo:

- 1) **Progresión independiente de caracteres:** la progresión ocurre independientemente en distintos caracteres de un mismo tumor;
- b) para cada carácter **la progresión puede ser continua o discontinua**, es decir a través de cambios graduales o abruptos.

En nuestro modelo la **velocidad y la autonomía del crecimiento tumoral** parecen ser dos caracteres diferentes que pueden progresar de manera independiente. Las observaciones que lo sugieren son : 1) la permanencia de la sensibilidad hormonal en los sucesivos pasajes a pesar del aumento de la capacidad proliferativa (Fig. 4), y 2) los tumores de pasajes tempranos que eventualmente adquieren un comportamiento autónomo, en presencia de MPA tienen una velocidad de crecimiento similar al de los tumores MPA-D de la misma generación (Figs. 19 a y b). Por lo tanto puede decirse que existen por lo menos dos procesos que llevarían a la adquisición de un crecimiento autónomo:

- 1) Un aumento progresivo de la velocidad de crecimiento tanto en presencia como en ausencia de la hormona. Este proceso puede llevar a que los tumores MPA-D alcancen una velocidad de crecimiento máxima la cual no puede ser superada ni siquiera en presencia de MPA (crecimiento autónomo).
- 2) Cambios más abruptos que permiten que el tumor crezca en ambientes depletados de hormonas sin que esto involucre un crecimiento más veloz en presencia de las mismas.

El aumento progresivo de la capacidad proliferativa de los tumores podría deberse a un genuino proceso de progresión en el cual la acumulación de pequeños cambios genéti-

cos a través de las generaciones permitiría que una población celular adquiriese una capacidad proliferativa cada vez mayor. Otra posibilidad es que los tumores primitivos estuviesen conformados por distintas subpoblaciones con diferentes velocidades de proliferación y a través de los pasajes las más rápidas fuesen seleccionadas.

Nuestros experimentos muestran que el aumento de la capacidad proliferativa se cumplió gradualmente en condiciones hormonales estables (por ejemplo, Fig. 4), mientras que la capacidad de crecer en ausencia de MPA o P sin que hubiera cambiado la velocidad de crecimiento en presencia de éstas, se produjo de manera más abrupta y, en general, en condiciones de crecimiento desfavorables (Figs 19b y 20). Cuando se sometió a los animales portadores de tumores MPA-D a tratamientos en los cuales se manipulaban las condiciones hormonales, la progresión hacia la autonomía hormonal fue más frecuente. Sin embargo, la adquisición de un fenotipo hormono independiente no fue una condición ineludible para la supervivencia de las células tumorales en medios depletados de hormonas proliferativas. El comportamiento de los subpasajes de tumores que retomaron crecimiento luego de la remoción del MPA o P en ratones ovariectomizados fue heterogéneo. Cuando este tratamiento se llevó a cabo en animales portadores de pasajes tempranos, el fenotipo MPA-D fue el predominante en los subpasajes, mientras que al repetirse el experimento usando pasajes más avanzados, el comportamiento autónomo fue el más frecuente (Fig. 20).

Como vimos antes, el hecho que una subpoblación celular adquiriera un comportamiento MPA-I no necesariamente implica que la velocidad de crecimiento en presencia de la hormona sea mayor que en su contraparte MPA-D, por lo tanto a través de los pasajes realizados a partir de animales tratados con MPA pudieron aparecer subpoblaciones autónomas que no fueron positivamente seleccionadas hasta que no se produjo una disminución de los niveles de hormona circulante. Como se discutió más arriba, al menos en la línea C7-HD, hubo una clara progresión hacia la autonomía hormonal a través de los sucesivos pasajes, aún en presencia de MPA. Por lo tanto, cuando se les retiró la hormona a los animales ovariectomizados, la selección debida a la ausencia de hormonas estimuladoras sobre tumores que estaban en estadios de progresión más avanzados pudo dar como resultado una mayor frecuencia de tumores autónomos.

En los tumores que adquirieron un crecimiento autónomo los niveles de los RE y RP no sufrieron modificaciones importantes (Tabla 6). Por lo tanto estas neoplasias difieren de las inducidas por progesterona y estrógenos en la cepa GR, en las cuales sólo las células que no expresaban receptores eran capaces de proliferar en ausencia de las hormonas estimuladoras (*Sluysers y Van Nie, 1974*). Tal como lo hace notar King (1990) en el caso de las células estimulables por estrógenos, la pérdida de un sistema hormona-receptor funcional no es una "ventaja adaptativa" en un medio con poca disponibilidad de hormonas estimuladoras, por lo tanto la capacidad de crecer en estos medios puede ser adquirido sin pérdida del receptor funcional (*Darbre y King, 1987*). En cambio, en presencia de una hormona inhibidora, las poblaciones celulares con un receptor mutado tendrían mayor capacidad proliferativa. Esta idea es avalada por la serie de experimentos en los cuales células de linfomas inhibibles por glucocorticoides eran desensibilizadas por mutagénesis experimental. Más del 90% de los clones insensibles mostraban defectos en el receptor de glucocorticoides (desde su aparente pérdida hasta la aparición de receptores con propiedades de unión nuclear aberrantes) (*King, 1990*). En nuestro modelo, los tumores que se hicieron resistentes a la inhibición estrogénica no habían perdido la capacidad de expresar RE (Tabla 9). Sin embargo es lógico suponer que en las células creciendo en un medio con una hormona fuertemente inhibitoria, la misma ya no ejerce la actividad biológica que tiene sobre los tumores sensibles. En estos tumores pudieron haber ocurrido modificaciones que alterasen la funcionalidad del complejo hormona-receptor en pasos posteriores a su formación. No sabemos si todos los tumores resistentes a estrógenos han sufrido las mismas modificaciones pero en todos los casos estos cambios fueron estables y persistieron en los subpasajes correspondientes. Por lo tanto, a diferencia de los tumores MPA-D capaces de crecer en ausencia de progestágenos, la falta de respuesta al tratamiento en los tumores resistentes a estrógenos no pareciera deberse a cambios fenotípicos reversibles.

Estos resultados indican que la aplicación de un inhibidor potente pone a los tumores en una situación muy distinta de la remoción del agente estimulador. La primera es mucho más comprometida y sólo aquellas células que puedan encontrar una vía de escape serán capaces de sobrevivir en presencia del inhibidor. En la segunda, las células HD podrían permanecer quiescentes por largo tiempo hasta adquirir las modificaciones necesarias para po-

der crecer, o hasta que se seleccione una subpoblación celular preexistente con capacidad de proliferar en un medio pobre en hormonas estimuladoras.

PROGRESIÓN A LA AUTONOMÍA Y ONCOGENES

En algunos modelos de cáncer de mama se ha investigado la posibilidad que la progresión hacia la hormonoindpendencia esté asociada con la activación de oncogenes. Aunque no tenemos evidencias a favor ni en contra de que éste sea el mecanismo actuante en la progresión de los tumores MPA-D, a continuación se indican brevemente casos en los cuales se ha observado que la activación de oncogenes podría estar involucrada en la adquisición del fenotipo autónomo.

La transfección de células MCF-7 de cáncer de mama humano con el oncogén H-ras permite que se active el fenotipo transformado en ausencia de E₂. Kasid y col. (1985) han informado que las células transfectadas no responden a la estimulación estrogénica *in vitro* y fueron totalmente tumorigénicas en ratones hembras nude ovariectomizadas sin tratamiento estrogénico. También Sukumar y col. (1988) han informado que el oncogén H-ras activado les confiere a las células MCF-7 una capacidad proliferativa que les permite superar parcialmente el requerimiento de estrógenos *in vitro*. Sin embargo, según estos autores, los ratones nude ovariectomizados no presentaban tumores si no recibían tratamiento estrogénico.

En ratones transgénicos portadores del oncogén *c-myc* unido al promotor de la proteína WAP de la leche, que es regulado por hormonas como prolactina, insulina e hidrocortisona, se observó una alta incidencia de tumores de mama luego del primer período de lactancia. Por lo tanto la aparición de tumores parecía estar controlada por hormonas. Sin embargo, en los tumores, se sintetizaban constitutivamente proteínas cuya transcripción normalmente estaba regulada por las hormonas mencionadas. Por lo tanto la presencia del oncogén unido al promotor independizaba a las proteínas del control hormonal (Groner y col., 1988).

Otro caso en el cual se observó una relación entre la progresión hacia la hormono-independencia y los oncogenes fue en la cepa GR. En estos ratones la expresión de un provirus MMTV endógeno induce la aparición de adenocarcinomas de mama. Estos tumores son hormonodependientes en una primera etapa pero posteriormente adquieren un crecimiento autónomo. Se demostró que los tumores hormonodependientes eran oligoclonales y estaban compuestos de poblaciones celulares con inserciones provirales cerca de los oncogenes celulares *int-1*, *int-2* e *int-4*. Cuando estos tumores fueron transplantados, las células positivas para *int-1* e *int-2* desaparecieron y los tumores correspondían a clones de las células positivas para *int-4*. El cambio abrupto de la composición del tumor cuando se hace hormono independiente sugiere que sólo en las células positivas para *int-4* se ha producido alguna modificación que les ha permitido adquirir la capacidad de crecer autónomamente (Nusse y col., 1988).

RESUMIENDO:

El crecimiento de la mayoría de los adenocarcinomas de mama inducidos por MPA es regulado positivamente por progestágenos y factores ováricos, y negativamente por estrógenos exógenos. La capacidad de responder al control hormonal es un carácter estable en la mayoría de las líneas. Sin embargo, en algunos casos los tumores adquieren un crecimiento autónomo, independiente de los factores de regulación tanto positivos como negativos. Además, se observó que la falta de respuesta a hormonas estimuladoras e inhibidoras no estaba asociada: los tumores podían hacerse insensibles a las primeras pero no a las segundas y viceversa.

ESTUDIOS DE LA CAPACIDAD TUMORIGÉNICA DEL MPA

EFEECTO DEL MPA EN LA CEPA C3H

El MPA induce adenocarcinomas de mama en la cepa BALB/c diferentes de los inducidos por activación del MMTV en las cepas de alta incidencia. En estas últimas, los tumores se asocian a lesiones preneoplásicas lobulillares, mientras que en nuestro modelo las lesiones preneoplásicas asociadas son de tipo ductal (*Molinolo y col.*, 1987). La cepa C3H es portadora del virus oncogénico, lo transmite durante el amamantamiento y el crecimiento de los tumores no es afectado por hormonas endógenas o exógenas (*Squartini*, 1979). Las diferencias morfológicas y de regulación hormonal entre los tumores inducidos por uno u otro agente indicarían que el MMTV y del MPA actúan a través de mecanismos diferentes. Sin embargo, esta hormona fue capaz de aumentar la incidencia tumoral en la cepa C3H aunque los tumores que aparecieron en el grupo con MPA fueron semejantes a los del grupo no tratado y muy diferentes de los inducidos en los ratones BALB/c. Además de presentar una morfología lobulillar, los tumores de los ratones C3H eran HI y expresaban niveles muy bajos o nulos de receptores de esteroides. Nagasawa y col. (1988) también observaron que el MPA aumentaba la incidencia de tumores de mama en otra cepa de alta incidencia (SHN). Sin embargo, a pesar de este efecto tumorigénico, la misma hormona inhibió la formación de lesiones preneoplásicas HAN en la misma cepa (*Nagasawa y col.*, 1985).

El MPA podría aumentar la tumorigénesis espontánea en la cepa C3H a través de distintos mecanismos: **1) activando el MMTV endógeno a través de su actividad glucocorticoidea, androgénica o progestagénica.** Los glucocorticoides, los andrógenos y la progesterona son capaces de inducir la transcripción del virus MMTV *in vitro* (*Cato y col.*, 1988). El MPA, además de su actividad progestagénica, puede actuar como andrógeno o glucocorticoide (*Bullock y col.*, 1975, *Pollow y col.*, 1988). Por lo tanto, esta hormona podría aumentar la tumorigénesis espontánea en cepas portadoras del virus a través de la activación del promotor viral; **2) estimulando la proliferación de células ya transformadas por el MMTV endógeno:** aunque en general se le asigna a la progesterona un rol en la

diferenciación más que en la proliferación, Russo y col. (1989) observaron que el tratamiento de ratas con dosis altas de MPA inhibía la diferenciación de las mamas y aumentaba el poder carcinogénico del DMBA; 3) **estimulando la secreción de EGF de las glándulas submaxilares del ratón:** Kurachi y col. (1985) demostraron que la sialoadenectomía disminuía la incidencia de cáncer de mama en ratones C3H/HeN y que dicho efecto se revertía, al menos parcialmente, con la administración de EGF. Dado que el MPA es un potente estimulador de la producción de EGF en glándulas salivales de ratón (*Bullock y col., 1975*) éste es otro posible mecanismo de promoción tumoral.

EFFECTO DE LA OVARIECTOMÍA SOBRE LA CAPACIDAD TUMORIGÉNICA DEL MPA EN HEMBRAS VÍRGENES BALB/c

La capacidad tumorigénica del MPA fue significativamente disminuída cuando los animales tratados habían sido previamente ovariectomizados. La relación de los ovarios con la tumorigénesis mamaria murina espontánea o inducida por carcinógenos químicos es un hecho bien documentado. Tanto en ratas como en ratones la ovariectomía a edad temprana disminuyó significativamente la incidencia de tumores de mama espontáneos (*Welsch y Nagasawa, 1977*). En ratas se observó que la ovariectomía 30 días antes del tratamiento con carcinógenos químicos impedía la aparición de tumores (*Dao, 1962*). Por lo tanto parecería que hormonas o factores provenientes del ovario serían fundamentales para la activación del virus MMTV endógeno en las cepas de alta incidencia y también intervenirían en la transformación por carcinógenos químicos del epitelio mamario. En nuestro modelo, hormonas o factores ováricos intervienen tanto en el crecimiento de los tumores transplantados como en la inducción de los tumores. Como se mencionó previamente, no sabemos cuáles son los factores ováricos secretados en presencia de concentraciones altas de MPA. Los mismos factores que se postularon como posibles reguladores del crecimiento tumoral: activinas, inhibinas, IGF-I y bajas concentraciones de estrógenos, podrían también aumentar la tumorigenicidad del MPA. Los posibles mecanismos de acción de estos factores son los siguientes: 1) que actúen sobre la mama normal aumentando la susceptibilidad o el número de células blanco; ó 2) que estimulen la proliferación de células ya transformadas tal como

se observó en los pasajes singeneicos de los tumores inducidos por MPA.

Otra posibilidad es que la ovariectomía provoque la inhibición de la capacidad tumorigénica del MPA por modificaciones de las glándulas mamarias debido a la ausencia temporal de esteroides sexuales. Las hembras fueron operadas a los 2 meses de edad, un mes antes de comenzar el tratamiento con MPA; sería posible que la falta de esteroides sexuales durante ese período hubiera alterado la morfología o desarrollo de las glándulas mamarias de manera tal que modificara la actividad del MPA sobre las mismas.

Aunque todavía no es posible descartar ninguna de estas hipótesis el hecho de que la latencia de aparición, la histología y el comportamiento y contenido de RE y RP de los pasajes de los tumores inducidos por MPA en hembras intactas u ovariectomizadas sean muy similares indicaría que las hormonas o factores secretados por los ovarios no modificarían sustancialmente los mecanismos carcinogénicos ni las células blanco del MPA.

EFFECTO DE LA SIALOADENECTOMÍA SOBRE LA CARCINOGENICIDAD DEL MPA EN HEMBRAS VÍRGENES BALB/c

La sialoadenectomía practicada un mes antes del comienzo del tratamiento con MPA disminuyó significativamente la incidencia tumoral respecto de los controles no operados (31,6% vs 98,5%). Este resultado es similar al que obtuvieron Kurachi y col. (1985) en la cepa C3H/HeN en la cual la sialoadenectomía disminuyó la incidencia de tumores espontáneos de mama de un 62,5% a un 12,8%. Según este autor esto se debería a una disminución en el aporte de EGF de las glándulas salivales. Ésta sería una posible explicación también en nuestro modelo dado que el MPA aumenta significativamente la concentración de este factor en las glándulas salivales (*Bullock y col., 1975*). De manera similar a lo planteado para la ovariectomía, la contribución de las glándulas salivales en la tumorigénesis por MPA puede deberse: 1) a una facilitación de la acción tumorigénica del MPA actuando previa o conjuntamente con la hormona sobre el epitelio mamario, y/o 2) a un estímulo proliferativo de células transformadas. La primera posibilidad es factible dado que el EGF estimula

la proliferación e inhibe la diferenciación funcional de las células del epitelio mamario normal del ratón (*Dembinski y Shiu, 1987*), tal como fue planteado para la ovariectomía, modificaciones en el desarrollo de la mama podrían alterar la acción de la hormona sobre el mismo tejido. En cuanto a la segunda posibilidad, si los factores provenientes de las glándulas salivales solamente estimularan el crecimiento de células previamente transformadas, entonces debe suponerse que los tumores inducidos por MPA pierden rápidamente la dependencia a dichos factores dado que, a diferencia de la ovariectomía, no hubo un claro efecto antiproliferativo de la sialoadenectomía en los transplantes de tumores inducidos por MPA hormonodependientes o autónomos.

Kurachi y col. (1985) proponen que en las hembras C3H/HeN las disfunciones ováricas debidas al envejecimiento provocarían un aumento en los niveles de EGF producidos por las glándulas salivales. Por lo tanto suponen que la disfunción ovárica aumenta la incidencia tumoral a través de un aumento en la secreción de EGF. En nuestro modelo, el hecho que la ovariectomía y la sialoadenectomía tengan un efecto tan parecido en la tumorigénesis mamaria de ratones BALB/c, hace que también nos preguntemos si no existirá alguna interrelación entre la acción de estos dos órganos y la inducción de tumores de mama en el ratón.

A pesar de que el EGF parece ser el candidato ideal para ejercer un rol preponderante en la carcinogénesis mamaria inducida por MPA, no podemos descartar que en el proceso estén involucrados otros factores sintetizados por las glándulas submaxilares, como por ejemplo el factor de crecimiento de los nervios (NGF) (*Cohen, 1960*).

Los tumores que surgieron en animales sialoadenectomizados también fueron muy similares a los de los animales no operados en cuanto a la latencia de aparición, a sus características histológicas y a la sensibilidad hormonal de los pasajes. Por lo tanto es probable que la ausencia de factores de las glándulas salivales, tal como ocurre con los ovarios, no modifiquen sustancialmente los mecanismos de acción ni las células blanco del MPA.

EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE PROGESTERONA

En los pasajes singeneicos habíamos observado que la P tuvo el mismo efecto proliferativo que el MPA sobre el crecimiento de los tumores MPA-D. Aunque esto indicaba que la actividad del MPA sobre los tumores en crecimiento se debería a su actividad progestagénica, no sabíamos si la P tendría también la capacidad de inducir adenocarcinomas de mama en la cepa BALB/c. Para comprobarlo, los ratones fueron implantados con pellets de P y utilizamos como control hembras implantadas con pellets de MPA (60 mg de cada progestágeno a lo largo de todo el experimento). En ambos grupos hubo una incidencia significativa de tumores de mama. Este experimento demostró no sólo que la P también induce tumores sino que tanto esta hormona como el progestágeno sintético eran carcinogénicos aún cuando las cantidades administradas habían sido reducidas más de tres veces respecto de los experimentos en los que se usó MPA depot.

En el grupo tratado con P la incidencia tumoral fue significativamente menor que en el grupo implantado con pellets de MPA. Dado que este progestágeno tiene mayor afinidad por los RP (*Pollow y col.*, 1988) en un primer momento supusimos que los mecanismos carcinogénicos del MPA y la P serían similares y las diferencias cuantitativas se deberían a la mayor potencia de la hormona sintética. Sin embargo, los tumores de los animales tratados con P fueron distintos de los que aparecieron en los tratados con MPA. En la mayoría de los casos, los adenocarcinomas inducidos por MPA fueron ductales, con altos niveles de RE y RP, y de comportamiento HD en los pasajes subsiguientes. En cambio, la mayoría de los tumores inducidos en los animales tratados con P fueron carcinomas lobulillares con niveles bajos de RE y RP, y de comportamiento autónomo en los pasajes subsiguientes.

Anteriormente se mencionó que los tumores inducidos por MPA, al igual que la mayoría de los inducidos por carcinógenos químicos, fueron precedidos por lesiones preneoplásicas ductales, mientras que los tumores de mama inducidos por el MMTV en general eran precedidas por lesiones hiperplásicas lobulillares (HAN). Además, mientras que los tumores inducidos por MPA, lo mismo que los inducidos por uretano en C57xDBAf F1 y en BALB/c conservaron los receptores hormonales y la hormonodependencia a lo largo de nu-

merosos pasajes (*Watson y col.*, 1979), el crecimiento de la mayoría de los tumores inducidos por activación del MMTV no era regulable por hormonas (*Squartini*, 1979). Estas observaciones indican que mientras que los tumores inducidos por MPA resultaron semejantes a los inducidos por carcinógenos químicos, los inducidos por P mostraron más similitudes con los que involucran al MMTV.

Las diferencias encontradas entre los tumores inducidos por MPA y P podrían deberse a que:

1) **Las células blanco de la P y el MPA fuesen las mismas**, pero los niveles de hormona activa en los animales tratados con P podrían ser menores. Esto llevaría a una selección de células de crecimiento autónomo. Las células con distinta dependencia hormonal tendrían, además, distinta localización en la glándula mamaria: las células ductales transformadas darían lugar a tumores HD, mientras que las células lobulillares originarían tumores HI.

2) **La P y el MPA actuasen sobre células blanco distintas**, dando lugar a tumores de morfología y patrones de crecimiento diferentes.

El montaje total de las glándulas mamarias de los animales sacrificados cuando los niveles de hormona circulante eran todavía altos, mostró alteraciones morfológicas distintas según los animales hubiesen sido tratados con MPA o con P. Mientras que en los primeros predominaron las alteraciones a nivel de los conductos, en los tratados con P se observaron sobre todo hiperplasias lobulillares. Estas observaciones sugieren que los dos progestágenos actúan principalmente sobre células blanco diferentes. No obstante, el MPA en altas concentraciones también sería capaz de inducir tumores de mama de origen lobulillar como lo muestran los resultados obtenidos en el grupo tratado con 160 mg de MPA depot (Tabla 14).

Con respecto a la asociación que observamos entre el tipo celular transformado y la hormonodependencia de los tumores, es interesante mencionar que en la cepa C3H en la cual el crecimiento tumoral es absolutamente HI sólo células lobulillares son transfor-

madas por el MMTV (*Smith y col.*, 1980) mientras que en la GR el MMTV es capaz de transformar células lobulillares y ductales (*Van Nie*, 1981).

También en otros modelos murinos se ha demostrado que el MPA y la P podían tener efectos distintos sobre las glándulas mamarias. En la cepa de ratones SHN, la P estimulaba el desarrollo y la progresión de las lesiones hiperplásicas lobulillares (HAN), mientras que el MPA inhibía su formación, aunque este progestágeno aumentaba la tumorigénesis mamaria (*Nagasawa y col.*, 1988). En el modelo de rata, se ha demostrado que la P inducía diferenciación lóbulo-alveolar en el tejido mamario (*Russo y col.*, 1982), mientras que el MPA no favorecía la diferenciación y aún la inhibía cuando el progestágeno era administrado en dosis más altas (*Russo y col.*, 1989).

La fuerte actividad glucocorticoidea del MPA (*Pollow y col.*, 1988) podría brindar una explicación a las diferencias observadas en la acción de los dos progestágenos. La administración de glucocorticoides (GC) y P a ratas ovariectomizadas, hipofisectomizadas y adrenalectomizadas tuvo distintos efectos sobre el desarrollo de la glándula mamaria. La inoculación de estrógenos, acetato de desoxicorticosterona (glucocorticoide) y hormona de crecimiento provocaba la proliferación ductal, mientras que el agregado de progesterona, prolactina y prednisolona producía el desarrollo lóbulo-alveolar que típicamente se observa en estos animales durante las fases tardías de la preñez (*Dembianski y Shiu*, 1987). Por otra parte la P inhibe la lactogénesis, mientras que los GC la estimulan (*Haslam*, 1987). Estas actividades antagónicas podrían estar brindándole al MPA, actuando como agonista de los GC, otros mecanismos de acción o células blanco alternativas.

Además se ha demostrado que el MPA puede tener una fuerte actividad androgénica (*Bullock y col.*, 1975). Durante el desarrollo embrionario de los ratones machos, las células mesenquimáticas adyacentes al epitelio mamario expresan receptores de andrógenos (*Kratochwil*, 1976). Estas células mesenquimáticas participan en la destrucción del epitelio mamario que, más tarde, inducen los andrógenos (*Heuberger y col.*, 1982). Si las glándulas mamarias de las hembras BALB/c adultas expresaran receptores para andrógenos, entonces, a través de éstos, el MPA podría provocar alteraciones morfológicas y/o funcionales que

modificaran su actividad progestagénica.

Finalmente, sería posible que el MPA o sus metabolitos actuaran como carcinógenos químicos específicamente sobre células ductales. García Heras y col. han demostrado que en fibroblastos (1982a) y linfocitos (1982b) cultivados en presencia de bajas concentraciones de MPA, se produce un aumento en el intercambio de cromátides hermanas. La mayoría de los carcinógenos químicos aumentan el intercambio entre cromátides hermanas o producen aberraciones cromosómicas (*Carrano y col., 1978*). En cuanto a la especificidad, es bien reconocida la especificidad tisular de muchos carcinógenos químicos. En algunos casos los tumores surgen únicamente en los tejidos en los cuales el carcinógeno es activado metabólicamente (por ejemplo la dimetilhidracina en intestino) (*Baló, 1979*). Otros carcinógenos, como las nitrosoureas, actúan específicamente sobre determinados tejidos aunque no requieran activación metabólica y se distribuyan homogéneamente en el organismo. En ese caso es posible que la respuesta se encuentre en los distintos mecanismos de reparación del ADN (*Brooks, 1980*). Sea cual fuere la causa de la especificidad, el MPA podría tener capacidad mutagénica sólo sobre células ductales. La actividad transformante del MPA sobre este tipo celular no involucraría la pérdida de la capacidad de responder a estímulos hormonales. Mientras tanto, la P podría estar actuando principalmente a través de los RP estimulando el desarrollo lobulillar. Durante esta proliferación masiva podrían surgir células con la capacidad de crecer autónomamente, dando origen a tumores hormonoindependientes.

CONCLUSIONES

Y

PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES

1. Los adenocarcinomas ductales inducidos por MPA son altamente regulables por hormonas: son estimulables por MPA o P e inhibibles por estrógenos aún en dosis bajas y en presencia de las hormonas estimuladoras, MPA o P.
2. En este modelo, la progresión a la autonomía de hormonas estimuladoras e inhibitorias ocurre independientemente y sin cambios observables en el contenido de receptores.
3. El crecimiento en ausencia de tratamiento hormonal no se debe, necesariamente, a una progresión a la hormonoindendencia. Estos tumores tienen características similares (RE; RP y HD) a los que crecen en presencia de MPA o P.
4. Factores y/u hormonas ováricas aumentan la capacidad carcinogénica del MPA y estimulan el crecimiento de transplantes tumorales.
5. Factores provenientes de las glándulas salivales aumentan la capacidad carcinogénica del MPA.
6. La P tiene un efecto similar al del MPA en la estimulación del crecimiento de los transplantes tumorales y también tiene capacidad carcinogénica, pero los tumores inducidos son autónomos y tienen una histogénesis distinta.

7. El MPA también aumenta la incidencia de cáncer de mama en una cepa portadora de MMTV. Los tumores que surgen en los animales tratados son similares a los espontáneos.

8. Independientemente de la vía de inducción, el fenotipo HD se asocia a la morfología ductal y el HI a la lobulillar.

PERSPECTIVAS

En el modelo experimental que hemos desarrollado en la cepa BALB/c, el acetato de medroxiprogesterona y la progesterona inducen hiperplasias epiteliales que originan carcinomas de mama, en su gran mayoría ductales (cuando los animales fueron tratados con MPA), con un pequeño porcentaje de carcinomas lobulillares (más frecuentes en los ratones tratados con P). En conjunto, ambos tipos histológicos representan el espectro del 90% de los carcinomas de mama humanos. Los carcinomas ductales y lobulillares difieren en su origen tisular, en su histología, biología y en su comportamiento ante distintos estímulos hormonales. Estas diferencias nos permitirán estudiar cuáles son los mecanismos de regulación que se alteran en diferente sectores de la glándula mamaria desde los primeros estadios de la carcinogénesis. Además, mediante la manipulación *in vivo* e *in vitro*, se podrá investigar la influencia que tienen en estos procesos los distintos factores (hormonas y otros) que, como se ha demostrado, participan en la regulación del crecimiento de las células neoplásicas. El conocimiento de las sucesivas alteraciones en los mecanismos de control y su correlato morfológico nos pueden dar información directa no sólo sobre cuáles son las células blanco de la acción de estos progestágenos, sino también sobre cuál es el momento en que las lesiones, en un principio de carácter benigno, experimentan transformación neoplásica. En otras palabras, hasta qué momento las alteraciones son reversibles.

Un momento crucial en la evolución de los tumores cuyo crecimiento es regulado por hormonas, es la adquisición del fenotipo hormonoindependiente. Tanto en nuestro modelo como en todos los cánceres hormonodependientes humanos, los tumores adquieren la capacidad para crecer aún en ausencia de las hormonas tróficas y/o pierden la capacidad de responder a las hormonas (o antihormonas) inhibitoras. Las consecuencias de la pérdida de estos mecanismos de control son comparables a las implicancias de la propia transformación neoplásica. Los sucesivos cambios que en la evolución de una célula tumoral la alejan de los mecanismos normales de control de crecimiento, le confieren ventajas sobre el resto y ayudan a la amplificación de ese clon en particular que se convertirá en el dominante. Estos cambios guardan una estrecha correlación con la adquisición de un fenotipo más maligno.

no, crecimiento desmedido, invasión de estructuras vecinas y eventual diseminación, que en conjunto constituyen la problemática más importante en el cáncer humano.

Una de las mayores esperanzas para lograr la cura del cáncer reside en la posibilidad de revertir el proceso de alejamiento de los mecanismos de control normales, de manera de reencauzar a las células neoplásicas a su vía de diferenciación y regulación normal. Para lograrlo es fundamental determinar los mecanismos subyacentes en el apartamiento del control homeostático. Hallarlos es uno de los grandes desafíos que se le presentan hoy a las ciencias médicas.

RESUMEN

ESTUDIOS DE LA REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO TUMORAL

En nuestro laboratorio se demostró que el tratamiento con MPA induce adenocarcinomas de mama en hembras vírgenes BALB/c. A partir de estos tumores se originaron distintas líneas tumorales *in vivo*, la mayoría de las cuales dependían del MPA para su crecimiento en los animales transplantados.

Respecto a la capacidad regulatoria del MPA sobre el crecimiento tumoral, los resultados obtenidos muestran que:

- a. En las líneas dependientes de MPA (MPA-D), esta hormona fue capaz de estimular el crecimiento tumoral, aún mucho tiempo después de que los tumores habían sido transplantados.
- b. La remoción de la hormona provocó la regresión de tumores ya palpables que, sin embargo, retomaron su crecimiento algunas semanas más tarde. En los pasajes subsiguientes la mayoría de estos tumores retuvieron sus receptores hormonales y su comportamiento MPA-D.
- c. La ovariectomía retardó, aún en presencia del MPA, el crecimiento de los tumores MPA-D, pero no afectó el crecimiento de los tumores autónomos.
- d. En las líneas MPA-D la P tuvo una actividad estimuladora similar a la del MPA.
- e. En los animales sialoadenectomizados el MPA no perdió la capacidad de estimular el crecimiento tumoral.
- f. El MPA disminuyó los niveles de RP y aumentó los niveles de RE en las líneas MPA-D.

A continuación se estudió la capacidad inhibitoria de los estrógenos sobre tumores MPA-D y autónomos RE+:

- a. Todas las dosis utilizadas de BE y de E₂ inhibieron el crecimiento y produjeron la

regresión de los adenocarcinomas inducidos por MPA, de los tumores primarios y de sus metástasis, aún en presencia de MPA o P.

- b. Las dosis más altas de BE no inhibieron el crecimiento de adenocarcinomas de mama espontáneos RE-.
- c. Entre un 20 y un 50 % de los tumores MPA-D se hicieron resistentes al tratamiento estrogénico. En los pasajes subsiguientes estos tumores permanecieron resistentes a estrógenos y la mayoría conservó el patrón MPA-D.

ESTUDIOS DE INDUCCIÓN TUMORAL

En este trabajo también se llevaron a cabo experimentos en los cuales se investigó si la ovariectomía o la sialoadenectomía afectaban la capacidad tumorigénica del MPA y si la P también era capaz de inducir tumores de mama. Los resultados mostraron que:

- a. El tratamiento con MPA aumenta la incidencia de tumores de mama en una cepa portadora de MMTV como C3H.
- b. Tanto la ovariectomía como la sialoadenectomía redujeron significativamente la capacidad tumorigénica del MPA.
- c. El tratamiento con P indujo tumores de mama en hembras vírgenes BALB/c. Los tumores inducidos por P fueron diferentes a los inducidos por MPA, mientras que éstos fueron mayoritariamente de histología ductal y HD, los inducidos por progesterona fueron de morfología lobulillar y HI.
- d. Tanto en los tumores inducidos por MPA como por P se encontró que la morfología ductal se asociaba a un crecimiento HD, mientras que la morfología lobulillar estaba asociada a un patrón de crecimiento autónomo.

A partir de estos resultados se puede concluir que los progestágenos sintéticos y naturales inducen, en la cepa BALB/c, adenocarcinomas de mama ductales y lobulillares que difieren entre sí en su sensibilidad hormonal. Mientras que la mayoría de los tumores ducta-

les son muy sensibles a la presencia de hormonas y factores estimulatorios e inhibitorios, los tumores lobulillares presentan un crecimiento autónomo. Dado que en las mujeres aparecen tumores mamarios con ambas morfologías, este modelo brinda la posibilidad de estudiar los eventos que determinan y regulan el crecimiento de los dos tipos de neoplasias.



D^{ra} Claudia Lanari
Directora



Edith Kordon

**REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

Antunes CMF, Strolley PD, Rosenshein NB. Endometrial cancer and estrogen use. Report of a large case-control study. *N. Engl. J. Med.* 300:9, 1979.

Ballaré C, Bravo AI, Laucella S, Sorín I, Cerdeiro R, Loza J, Sousa Martinez F, Gauman N, Mordoh J. DNA synthesis in estrogen receptor-positive human breast cancer takes place preferentially in estrogen receptor-negative cells. *Cancer* 64:842, 1989.

Baló J. Role of hidrazine in carcinogenesis. *Advances in Cancer Res.* 30:151, 1979.

Bashford RF. The incidence of cancer of the mamma in female mice of known age. *Proc. Roy. Soc. Biol.* 81:310, 1909; citado por Squartini F. Tumours of the mammary gland; en Turusov VS (Jefe de editores), *Pathology of tumours in laboratory animals*, Lyon, pp. 43-90, 1979.

Baulieu EE. A rationale for combined antiestrogen plus progestin administration in breast cancer; en Campio L, Robustelli Della Cuna G y Taylor RW (Eds.), *Role of Medroxyprogesterone in Endocrine-Related Tumors*, Vol 2, Raven Press, New York, pp. 15-23, 1983.

Bélangier A, Le Goff JM, Prolx L, Caron S, Labrie F. Presence of C-19 Steroids in mammary Shionogi carcinoma (SC115) in castrated mice. *Cancer Res* 45:6293, 1985.

Berenblum J, Shubik P. The role of croton oil applications associated with a single painting of a carcinogen in tumour induction of the mouse's skin. *Br. J. Cancer* 1:379, 1947; citado por Pitot HC, *Fundamentals of Oncology*, Marcel Dekker Inc, New York, 1978.

Bilezikjian L, Corrigan A, Vale W. Activin-A modulates growth hormone secretion from cultures of rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 126:2369, 1990.

Biskin MS, Biskin GR. The development of tumors in rat's ovaries after transplantation into the spleen. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 55:176, 1944.

Bittner JJ. Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science* 84:162, 1936.

Bittner JJ, Cole HL. Induction of mammary cancer in agent-free mice bearing pituitary isografts correlated with inherited hormonal mechanism. *J. Natl. Cancer Inst.* 27: 1283, 1961.

Bonfil RD, Sorasio MC, Gritti MF, Bustoabad OD, Meiss R, Kordon E, Lanari C, Pasqualini CD. Caracterización del adenocarcinoma mamario murino C7HI, un nuevo modelo para el estudio de las metástasis. *Medicina (Bs Aires)* 49: 479, 1989.

Boot LM, Muhlbock O, Ropcke G. Prolactin and the induction mammary tumors in mice. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2:601, 1962.

Boutwell RK. Some biological aspects of skin carcinogenesis. *Progr. Exp. Tumor Res.* 4:207,

1964; citado por Pitot HC, *Fundamentals of Oncology*, Marcel Dekker Inc, New York, 1978.

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

Brooks B. Chemical Carcinogenesis: Introduction. *British Medical Bulletin* 36:1, 1980.

Buell P. Changing incidence of breast cancer in Japanese-American women. *J. Natl. Cancer Inst.* 51: 1479, 1973.

Bullock LP, Barthe TH, Mawzowicz I, North A, Bardin CW. The effect of progestin on submaxillary gland epidermal growth factor: Demonstration of androgenic, synandrogenic and anti-androgenic actions. *Endocrinology* 97:189, 1975.

Burns EL, Schenken JR. Quantitative studies on relationship between estrogen and mammary gland carcinoma in strain C3H mice. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 43:608, 1940.

Calandra RS, Charreau EH, Giaroli MR, Baldi A, Calvo JC, Pujato D, Arrighi L. Receptores para esteroides y prolactina en carcinomas mamarios humanos. *Medicina (Bs Aires)* 40:718, 1980.

Campio L., Robustelli Della Cuna G y Taylor RW (Eds.), *Role of Medroxyprogesterone in Endocrine-Related Tumors*, Vol 2, Raven Press, New York, 1983.

Carrano AV, Thompson LH, Lindi P, Minkler JL. Sister chromatide exchange as an indicator of mutagenesis. *Nature* 271:551, 1978

Cato ACB, Henderson D, Ponta H. The hormone response element of the mouse mammary tumour virus DNA mediates the progestin and androgen induction of transcription in the proviral long terminal repeat region. *EMBO J.* 6:363, 1987.

Cato ACB, Miksicek R, Schutz G, Arnemann J, Beato M. The hormone regulatory element of mouse mammary tumor virus mediates progesterone induction. *EMBO J.* 5:2237, 1986

Cato ACB, Skroch P, Butkeraitis P, Ponta H. The multi-hormonal regulation of transcription at the mouse mammary tumour virus promoter; en Bresciani F, King RJB, Lippman ME, Raynaud JP (Eds.), 114-117, 1988

Clemens JA, Shaar CJ. Inhibition by ergocornine of initiation and growth of 7,12-dimethylbenzanthracene-induced mammary tumors in rats. Effects in tumor size. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 139:659, 1972.

Cohen S. Purification of a nerve growth promoting protein from the mouse salivary gland and neurocytotoxic antiserum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 46:302, 1960.

Colton T. *Statistics in medicine*, Little Brown & Co, Boston, pp. 219-222, 1974

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

Cortés Funes H, Madrigal PL, Perez Mangas G, Mendiola C. Medroxyprogesterone acetate at two different high doses for the treatment of advanced breast cancer; en Campio L, Robustelli Della Cuna G y Taylor RW (Eds.), *Role of Medroxyprogesterone in Endocrine-Related Tumors*, Vol 2, Raven Press, New York, 1983.

Cotran RZ, Kumar V, Robbins SL, *Neoplasia en Robbins Pathologic Basis of Disease 4th. Edition*; WB Saunders Com., Philadelphia, 1989.

Cunha GR, Cooke PS, Mee S, Higgins SJ, Donjacour AA, Bigsby RM, Young P. Mesenchymal-epithelial interactions in androgen-induced prostatic growth and development; en Iacobelli S, King RJB, Lindner HR, Lippman ME (Eds.), *Hormones and Cancer*, Raven Press, New York, pp. 460-471, 1980.

Danguy A, Legros N, Devleeschouwer N, Heuson-Stennon JA, Heuson JC. Effects of Medroxyprogesterone acetate (MPA) on growth of DMBA-induced rat mammary tumors: Histopathological and endocrine studies; en Iacobelli S y Di Marco A (Eds.), *Role of Medroxyprogesterone in Endocrine-Related Tumors*, Raven Press, New York, pp. 21-28, 1980.

Dao TL. The role of ovarian hormones in initiating the induction of mammary cancer in rats by polynuclear hydrocarbons. *Cancer Res.* 22:973, 1962.

Dao TL, Sunderland H. Mammary carcinogenesis by 3-methylcholanthrene I. Hormonal aspects in tumor induction and growth. *J. Natl. Cancer. Inst.* 23:567, 1959.

Darbre P, King RJB. Progression to steroid insensitivity can occur irrespective of the presence of functional steroid receptors. *Cell* 51:521, 1987.

Darbre P, King RJB. Progression to steroid autonomy in S115 mouse mammary tumor cells: role of DNA methylation. *J. Cell Biol.* 99:1410, 1984

Darbre P, King RJB. Progression to steroid insensitivity: steroid interactions and role of receptors; en Bresciani F, King RJB, Lippman ME y Raynaud JP (Eds.), *Progress in Cancer Research and Therapy*, Vol. 35: *Hormones and Cancer 3*, Raven Press, New York, pp. 148-153, 1988.

Darbre P, Page M, King RJB. Androgen regulation by the long terminal repeat of mouse mammary tumor virus. *Mol. Cell Biol.* 6:2847, 1986.

De Launoit Y, Kiss R, Danguy A, Paridaens R. Effect of ovariectomy, hypophysectomy and/or GnRH analog (HRF) administration on the cell proliferation of the MXT mouse hormone-dependent mammary tumor. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 23:1443, 1987.

Dembinski TC, Shiu RPC. Growth factors in mammary gland development and function; en Neville MC y Daniel C (Eds.), *The mammary gland*, Plenum Press, New York, pp. 355-381, 1987.

Dickson RB, Lippman ME. Estrogenic regulation of growth and polypeptide growth factor secretion in human breast carcinoma. *Endocr. Rev.* 8:29, 1987.

Dickson C, Peters G. Proteins encoded by mouse mammary tumor virus en en Vogt PK y Koprowski H (Eds.), *Mouse mammary tumor virus*, Current Topics in Microbiology and Immunology , Vol 106, Springer-Verlag, Berlín, pp. 1-34, 1983.

Dipple A, Lowley PD, Brooks P. Theory of tumor initiation by chemical carcinogens. Dependence of activity on structure of ultimate carcinogens. *Eur. J. Cancer* 4:493, 1968.

Dockerty MB, Lovelady SB, Foust GT Jr. Carcinoma of the corpus uteri in young women, *Am. J. Obst. Gynecol.* 61: 966, 1951 .

Doll R, Pet R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.* 66:1191, 1981.

Dorland's Illustrated Medical Dictionary, 27th edition, WB Saunders Co., Philadelphia, 1988.

Dunn J. Breast cancer among American Japanese in the San Francisco Bay area. *Natl. Cancer Inst. Monograph.* 47: 157, 1977.

Durbin PW, Willams MH, Jeung N, Arnold JS. Development of spontaneous mammary tumors over the life-span of the female Charles River (Sprague Dawley) rat: The influence of ovariectomy,thyroidectomy, and adrenalectomy-ovariectomy. *Cancer Res.* 26:400, 1966.

Ekman P, Dahlberg E, Gustafsson JA, Hogberg B, Pousette A, Snochowski M. Present and future clinical value of steroid receptor assays in human prostatic carcinoma; en Iacobelli S, King RJB, Lindner HR, Lippman ME (Eds.), *Hormones and Cancer*, Raven Press, New York, pp. 361-370, 1980.

Ekman P, Snochowski M, Zatterberg A, Hogberg B, Gustafsson JA. Steroid receptor content in human prostatic carcinoma and response to endocrine therapy. *Cancer* 44:1173, 1979.

El Etreby MF, Graf KJ, Gunzel P, Neuman F. Evaluation of effects of sexual steroids on the hypothalamic-pituitary system of animals and man; en Mechanism of toxic action on some target organs. *Arch. Toxicol., Suppl* 2:11, 1979.

Elizalde P, Guerra F, Lanari C, Kordon E, Pasqualini CD, Charreau EH. Growth factors in murine mammary adenocarcinomas induced by progestins; en Li J y Nandi S (Eds.), *Hormonal Carcinogenesis*, Raven Press, New York, 1991 (en prensa).

Elizalde P, Lanari C, Bussman L, Kordon E, Guerra F, Savin M, Charreau EH. Insulin-like growth factor-I production and receptors in mammary adenocarcinomas induced by medroxyprogesterone acetate in BALB/c mice. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 9:193, 1990.

Elizalde P, Lanari C, Kordon E, Tezón J, Charreau E. Transforming growth factor-beta activities in *in vivo* lines of hormone-dependent and independent mammary adenocarcinomas induced by medroxyprogesterone acetate in BALB/c mice. *Breast Can. Res. Treat.* 16:29, 1990.

English HF, Kloszewski ED, Valentine EG, Santen RJ. Proliferative Response of the Dunning R3327H Experimental Model of Prostatic Adenocarcinoma to Conditions of Androgen Depletion and Repletion. *Cancer Res.* 46:839, 1986.

Ewing J. *Neoplastic Disease: A Treatise on Tumors* (4th. Ed.). Saunders, Philadelphia, 1940; citado por Pitot HC, *Fundamentals of Oncology*, Marcel Dekker Inc, New York, p.16, 1978.

Foulds L. The histologic analysis of mammary tumors of mice. I. Scope of investigations and general principles of analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* 17:701, 1956.

Foulds L. *Neoplastic development* Vol. 1, Academic Press, Londres, 1969; citado por Darbre P, King RJB, *J. Cell. Biol.* 99:1410, 1984.

Frank DW, Kirton KT, Murchison TE, Quinlan WJ, Coleman TJ, Gilbertson TJ, Feenstra ES, Kimball FA. Mammary tumors and serum hormones in the bitch treated with medroxyprogesterone acetate and progesterone for four years. *Fertil. Steril.* 31: 340, 1979.

Franks LM. Estrogen-treated prostatic cancer. The variation in responsiveness. *Cancer* 13:490, 1960.

Ganzina F. High dose medroxyprogesterone acetate (MPA) treatment in advanced breast cancer. A review. *Tumori* 65:563, 1979.

García Heras J, Coco R. Induction of sister chromatid exchanges in rabbit lymphocytes by medroxyprogesterone acetate. *Medicina (Bs. Aires)* 42:250, 1988

García Heras J, Herrera J, Lovell M, Coco I, Coco R. Induction of sister chromatid exchanges in mouse kidney fibroblast by medroxyprogesterone acetate. *Medicina (Bs. Aires)* 42:255, 1988.

Gardner WU. Hormonal imbalances in tumorigenesis. *Cancer Res.* 8, 397, 1948.

Gass GH, Brown J, Okey AB. Carcinogenic effect of oral diethylstilbestrol on C3H male mice with and without the mammary tumor virus. *J. Natl. Cancer Inst.* 53:1369, 1974.

Gonzalez-Manchon C, Vale W. Activin-A, Inhibin and Transforming Growth Factor-beta modulate growth of two gonadal cell lines. *Endocrinology*, 125:1666, 1989.

Green S, Chambon P. Oestradiol induction of a glucocorticoid responsive gene by a chimaeric receptor. *Nature* 325:75, 1987.

Groner B, Jaggi R, Andres AC, Schonenberg CA, Hynes NE. Oncogene interference with the action of hormones; en Bresciani F, King RJB, Lippman ME, Raynaud JP (Eds.), *Progress in Cancer Research and Therapy, Vol. 35: Hormones and cancer 3*, Raven Press, New York, pp. 88-96, 1988.

Gross L. *Oncogenic viruses*, Pergamon Press, Oxford, pp. 238-280, 1970.

Gross GE, Clark GM, Chamness GC, Mc Guire WL. Multiple progesterone receptor assays in human breast cancer. *Cancer Res.* 44:836, 1984.

Gullino P. The regression process in hormone-dependent mammary carcinomas; en Iacobelli S, King RJB, Lindner HR, Lippman ME (Eds.), *Hormones and Cancer*, Raven Press New York, pp. 271-279, 1980.

Haenszel W, Kurihara M. Studies of Japanese migrants. I. Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States. *J. Natl. Cancer Inst.* 40:43, 1968.

Harris NV, Weiss NS, Francis AM, Posissar L. Breast cancer in relation to patterns of oral contraceptives. *Am. J. Epidemiol* 116:643, 1982.

Harrison JD, Morris DL, Ellis IO, Jones JA, Jackson I. Preliminary results of randomized controlled trial of adjuvant tamoxifen in the treatment of gastric carcinoma en en Bresciani F, King RJB, Lippman ME, Raynaud JP (Eds.), *Progress in Cancer Research and Therapy, Vol. 35: Hormones and Cancer 3*, Raven Press, New York, pp. 540-543, 1988.

Haslam SZ. Role of sex steroid hormones in normal mammary gland function; en Neville MC y Daniel C (Eds.), *The mammary gland*, Plenum Press, New York, pp. 499-533, 1987.

Helmrich SP, Shapiro S, Rosenberg L, Kaufman DW, Slone D, Bain C y col. Risk factors for breast cancer. *Am. J. Epidemiol.* 117:35, 1983.

Henderson BE, Bernstein L. The international variation in breast cancer rates: an epidemiological assesment. *Breast Can. Res. Treat.* 18:S11, 1991.

Herbst AL, Ulfelder H, Poskanzer DC. Adenocarcinoma of the vagina: Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appereancy in young women. *N. Engl. J. Med.* 284:878, 1971.

Heston WE, Deringer MK. Ocurrance of Tumor in agent-free strain free C3Hf male mice implanted with estrogen-cholesterol pellets. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 82:731, 1953.

Heuberger B, Fitzka I, Wasner G, Kratochwil K. Induction of androgen receptor formation by epithelium-mesenchyme interaction in embryonic mouse mammary gland. *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA 79:2957, 1982.

Holdaway IM, Bowditch JV. Variation in receptor status between primary and metastatic breast cancer. *Cancer* 52:479, 1983.

Huff KK, Kaufman D, Gabbay KH, Spencer EM, Lippman ME, Dickson RB. Human breast cancer cells secrete an insulin-like growth factor-I-related polypeptide. *Cancer Res.* 46:4613, 1986.

Huggins G, Briziarelli G, Sutton H. Rapid induction of mammary carcinoma in the rat and the influence of hormones on the tumors. *J. Exptl. Med.* 109:25, 1959.

Hull DF III, Clark GM, Osborne CK, Chamness GL, Knight III C, McGuire W. Multiple estrogen receptor assays in human breast cancer. *Cancer Res.* 43:413, 1983.

Ignotz RA, Massague J. Transforming growth factor beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 261:4337, 1986.

Inui T, Tsubura A, Morii S. Incidence of precancerous foci of mammary glands and growth rate of transplantable mammary cancers in sialoadenectomized mice. *JNCI* 81:1660, 1989.

Jabara AG. Effects of progesterone on 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene induced mammary tumours in Sprague Dawley rats. *Brit. J. Cancer* 21:418, 1967.

Jabara AG, Toyne PH, Harcourt AG. Effects of time and duration of progesterone administration on mammary tumours induced by 7,12-dimethylbenzanthracene in Sprague Dawley rats. *Brit. J. Cancer* 27:63, 1973.

Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation for incomplete observations. *J. Am. Statis. Ass.* 53:457, 1958.

Kasid A, Lippman ME, Papageorge AG, Lowry DR, Gelmann EP. Transfection of v-ras^H DNA into MCF-7 human breast cancer cells bypasses dependence on estrogen for tumorigenicity. *Science* 228:725, 1985.

Kim U, Depowoski MJ. Progression from hormone dependence to autonomy in mammary tumors as an *in vivo* manifestation of sequential clonal selection. *Cancer Res.* 35:2068, 1975.

King RJB. Receptors, growth factors and steroid insensitivity of tumours. *J. Endocrinology* 124:179, 1990.

Kiss R, Paridaens RJ, Heuson JC, Danguy AJ. Effect of progesterone on cell proliferation in the MXT mouse hormone-sensitive mammary neoplasm. *JNCI* 77:173, 1986a.

Kiss R, Paridaens RJ, Leclercq G, Danguy AJ. Sensitivity of the hormone-dependent MXT

mammary carcinoma to estradiol during tumoral growth. An autoradiographic study. *Europ. J. Can. Clin. Oncol.* 22:849, 1986b.

Knabbe C, Zugmaier G, Dickson RB, Lippman ME. Transforming growth factor beta and other growth inhibitory polypeptides in human breast cancer; en Bresciani F, King RJB, Lippman ME, Raynaud JP (Eds.), *Progress in Cancer Research and Therapy*, Vol. 35: Hormones and Cancer 3, Raven Press, New York, pp. 234-237, 1988.

Koenders AJM, Geurts-Moespot A, Zolingen SJ, Benraad ThJ. Progesterone and estradiol receptors in DMBA-induced mammary tumors before and after subsequent estradiol administration; en McGuire W, Raynaud JP, Baulieu EE (Eds.), *Progesterone receptors in normal and neoplastic tissue*, Raven Press, New York, pp. 71-84, 1977.

Kolbye AC Jr. Cancer in Humans: Exposures and Responses in a Real World, *Oncology* 33:90, 1976.

Koreman SG. The endocrinology of breast cancer. *Cancer* 46:874, 1980.

Korenman SG, Dukes BA. Specific estrogen binding by the cytoplasm of human breast carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 30:639, 1970.

Kratochwil K. Tissue interactions in androgen response of embryonic mammary rudiment of mouse: Identification of target tissue for testosterone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:4041, 1976.

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

Kurman RJ, Norris HJ, Endometrial Carcinoma; en Kurman RJ (Ed.), *Blaustein's Pathology of the female genital tract*, 3rd. Edition, Springer-Verlag, New York, pp. 338-372, 1987

Labrie F., Veilleux R. A wide range of sensitivities to androgens develops in cloned Shionogi mouse mammary tumor cells. *The prostate* 8:293, 1986.

Lacassagne A. Aparition de cancers de la mammelle chez le souris male, soumise a des injections de folliculine. *Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris)* 195, pp. 630-632, 1932; citado por Gross L. *Mouse mammary carcinoma en Oncogenic viruses*, 2nd Edition, Pergamon Press, London, pp. 238-280, 1970.

Lanari C, Kordon E, Molinolo AA, Pasqualini CD, Charreau EH. Mammary adenocarcinomas induced by medroxyprogesterone acetate: hormone dependence and EGF receptors of BALB/c *in vivo* sublines. *Int. J. Cancer* 43:845, 1989.

Lanari C, Molinolo AA, Dosne Pasqualini C. Inhibitory effect of medroxyprogesterone acetate on foreign body tumorigenesis in mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 77:157, 1986a.

Lanari C, Molinolo AA, Dosne Pasqualini C. Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALB/c female mice. *Cancer Lett.* 33:215, 1986 b.

Lathrop AEC, Loeb L. Further investigations on the origins of tumors in mice III. On the part played by internal secretions in the spontaneous development of tumors. *J Cancer Res* 1:1, 1916; citado por Welsch CW, Nagasawa H. Prolactin and murine mammary tumorigenesis: a review. *Cancer Res.* 37:951, 1977.

Le Marchand L. Ethnic variation in breast cancer survival: A review. *Breast Cancer Res. and Treat.* 18:S23, 1991.

Lin FK, Banerjee MR, Crump LR. Cell cycle-related hormone carcinogen interaction during chemical carcinogen induction of nodule-like mammary lesions in organ culture. *Cancer Res.* 36:1607, 1976.

LiVolsi VA. Neoplasia; en LiVolsi VA, Brooks JSJ, Merino MJ, Saul SH, Tomaszewski JE (Eds.), *Pathology*, 2nd edition, The National Medical Series for Independent Study, John Wiley & Sons, New York, pp. 33-44, 1989.

Loeb L, Kirtz MM. The effect of transplant of anterior lobes of the hypophysis on the growth of the mammary gland and on the development of mammary gland carcinoma in various strains of mice. *Am. J. Cancer* 36:56, 1939.

Luthy IA, Lanari C, Vanzulli S, Molinolo AA, Kordon E, Elizalde P, Pasqualini CD, Charreau EH. Sensibilidad de cultivos primarios de tumores mamarios murinos inducidos por MPA a esta hormona y a estrógenos. *Medicina (Bs Aires)*, 50:421, 1990.

Lyons MJ, Moore DH. Purification of the mouse mammary tumor virus. *Nature* 194:1141, 1962.

Marchant J. Chemical induction of breast tumors in mice of the C57BL strain. The influence of pseudopregnancy, pregnancy and lactation on induction by methylcholanthrene. *Brit. J. Cancer* 15:568, 1961.

Marchant J. The influence of pseudopregnancy on breast tumor induction by methylcholanthrene in IF or F1 hybrid (C57BL x IF) mice. *Brit. J. Cancer* 17:495, 1963.

Matsuzawa A, Yamamoto T. Response of a pregnancy-dependent mouse mammary tumor to hormones. *J. Natl. Cancer Inst.* 55: 447, 1975.

Matsuzawa A, Yamamoto T, Mizumo I. Cytoplasmic progesterone receptor in mouse mammary tumors en McGuire W (Ed.), *Hormones, Receptors and Breast Cancer*, Raven Press, New York, pp. 263-280, 1978.

Mauvais-Jarvis P., Progesterone and Progestins: A General Overview; en C. Wayne Bardin, E. Milgrom and P. Mauvais-Jarvis (Eds.), *Progesterone and progestins*, Raven Press, New

York, pp. 1-13, 1983.

Medina D. Preneoplastic lesions in mouse mammary tumorigenesis. *Methods in Cancer Res.* 7:3, 1973.

Medina D. Mammary noduligenesis and tumorigenesis in chemical carcinogen treated mice I. Incidence of nodules and tumors in chemical carcinogen treated BALB/c and C57BL mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 53:213, 1974.

Medina D. Preneoplastic lesions in murine mammary cancer. *Cancer Res* 36:2589, 1976.

Medina D, Warner MR. Mammary tumorigenesis in carcinogen-treated mice. IV. Induction of mammary ductal hyperplasias. *JNCI* 57: 331, 1977.

Michalides R, van Ooyen A, Nusse R. Mouse mammary tumor virus expression and mammary tumor development en Vogt PK y Koprowski H (Eds.), *Mouse mammary tumor virus, Current Topics in Microbiology and Immunology*, Vol. 106, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 57-78, 1983.

Miller EC, Miller JA. Mechanisms of chemical carcinogenesis: Nature of proximate carcinogens and interactions of macro-molecules. *Pharm. Rev.* 18:805, 1966.

Miller AB, Bulbrook RD. UICC multidisciplinary project on breast cancer: the epidemiology, aetiology and prevention of breast cancer. *Int. J. Cancer* 37:173, 1986.

Minesita T, Yamaguchi K. An androgen-dependent tumor derived from a hormone-independent spontaneous tumor of a female mouse. *Steroids* 4:815, 1964

Mobbs BG. The uptake of triated oestradiol by dimethylbenzanthracene-induced mammary tumours of the rat. *J. Endocrinol.* 36:409, 1966.

Molinolo AA, Lanari C, Charreau EH, Sanjuan N, Pasqualini CD. Mouse mammary tumors induced by medroxyprogesterone acetate: immunohistochemistry and hormonal receptors. *J. Natl. Cancer Inst.* 79:1341, 1987.

Moon HD, Simpson ME, Li CH, Evacs HM. Neoplasms in rats treated with pituitary growth hormone. Absence of neoplasms in hypophysectomized rats. *Cancer Res.* 11:535, 1951.

Moore RA. Benign hypertrophy and carcinoma of prostate. *Surgery* 16:152, 1944.

Mouridsen HT, Rose C. Attempting to understand differences between the results of the main trails of adjuvant tamoxifen in primary breast cancer en Bresciani F, King RJB, Lippman ME, Raynaud JP (Eds.), *Progress in Cancer Research and Therapy*, Vol. 35: *Hormones and Cancer* 3, Raven Press, New York, pp. 417-421, 1988.

Muhlbock O, Boot LM. Induction of mammary tumorigenesis in mice without the mammary

tumor agent by isografts of hypophysis. *Cancer Res.* 19:402, 1959.

Murad F, Guilman A. Estrogens and progestins; en Goodman L & Gilman A (Eds.), *The pharmacological bases of therapeutics*, 5th ed., Macmillan, New York, pp. 1439-1445, 1975.

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

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

Nagel GA, Wander HE, Holtkamp W. On the biology of carcinomas of the breast; en Robustelli Della Cuna G, Nagel GA, Lanini P (Eds.), *German-Italian Oncological Symposium*, Venice, September 1984. Kehler Verlag KG, Freiburg, pp. 7-20, 1985.

Namer M, Lalanne C, Beaulieu EE. Increase of progesterone receptor by tamoxifen as a hormonal challenge test in breast cancer. *Cancer Res.* 40:1750, 1980.

Nandi S, McGrath C. Mammary neoplasias in mice. *Advances in Cancer Res.* 17:353, 1973.

Noble RL. Hormonal control of growth and progression in tumors of Nb rats and theory of action. *Cancer Res.* 37:82, 1977.

Noble RL, Hoover L. A classification of transplantable tumors in the Nb rats controlled by estrogen from dormancy to autonomy. *Cancer Res.* 35:2935, 1975.

Nohno T, Omukai Y, Watanabe S, Saito T, Senoo T. Effects of estrogens and antiestrogens on androgen-dependent growth of Shionogi Carcinoma 115: Role of estrogen receptor. *Cancer Lett.* 15:237, 1982.

Nordenskjold B. Steroid Hormone Receptors and Endocrine Management of Mammary Carcinoma. *Acta Med. Scand.* 204:1, 1978.

Nusse R, Rijsewijk F, Wagenaar E, Roelink H, Van de Vijver M. Oncogenes in murine and human breast cancer; en Bresciani F, King RJB, Lippman ME, Raynaud JP (Eds.), *Progress in Cancer Research and Therapy*, Vol 35: Hormones and cancer 3, Raven Press, New York, pp. 97-101, 1988, .

Okey AB, Gass GH. Continuous versus cyclic estrogen administration: mammary carcinoma in C3H mice. *J. Natl.Cancer Inst.* 40:225, 1968.

Oliver J, Aitman T, Powell J, Wilson C, Clayton R. Insulin-like growth factor I gene expression in the rat ovary is confined to the granulosa cells of developing follicles. *Endocrinology*, 124:2671, 1989.

Pasqualini CD. Factores endócrinos en la tumorigénesis. *Medicina*, Buenos Aires 5:371, 1949.

Pellegrini A, Massida B, Mascia V, Ionta MT. Medroxyprogesterone acetate and tamoxifen: two different drugs in alternate or sequential modality treatment; en Campio L, Robustelli Della Cuna G y Taylor RW (Eds.), *Role of Medroxyprogesterone in Endocrine-Related Tumors*, Vol 2, Raven Press, New York, pp. 45-67, 1983.

Peto R, Pike MC, Armitage P, Breslow NE, Cox DR, Howard SV y col. Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observations of each patient II. Analysis and examples. *Br. J. Cancer* 35:1, 1978.

Pike MC, Henderson BE, Casagrande JT, Rosario I, Gray GE. Oral contraceptive use and early abortion as risk factors for breast cancer in young women. *Br. J. Cancer* 43:76, 1981.

Pike MC, Henderson BE, Krailo MD, Duke A, Roy S. Breast cancer in young women and use of oral contraceptives: Possible modifying effect of formulation and age at use. *Lancet* 2:926, 1983.

Pitot HC, *Fundamentals of Oncology*, Marcel Dekker Inc, New York, 1978.

Prahdala S, Carroad E, Cukierski M, Hendrickx AG. Embriotoxicity of medroxiprogesterone acetate (MPA) and maternal serum MPA concentration in *Cynomolgus monkey (Macaca fascicularis)*. *Teratology* 32:421, 1985.

Pollow K, Grill HJ, Heubner A, Manz B, Kreienberg R, Schmidt-Gollwitzer M. Medroxiprogesterone acetate therapy in endometrial carcinoma: mechanism of action, pharmacokinetics and clinical investigations en Bresciani F, King RJB, Lippman ME, Raynaud JP (Eds.), *Progress in Cancer Research and Therapy*, Vol 35: Hormones and cancer 3, Raven Press, New York, pp. 436-444, 1988.

Richardson FL. Effect of ovariectomy at different ages on the development of mammary tumors in (C3HXRIII) F₁ mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 39:347, 1967.

Risbridger GP, Robertson DM, Kretser DM. Current perspectives of inhibin biology. *Acta Endocrinologica (Copenh.)* 122:673, 1990.

Ritchie AC. The clasification, morphology and behavior; en Florey H (Ed.), *General Pathology*, Saunders, Philadelphia, 1962, p. 551; citado por Pitot HC, *Fundamentals of Oncology*, Marcel Dekker Inc, New York, p. 23, 1978.

Robustelli Della Cuna G, Preti P. Advanced breast cancer: Hormone-dependency and mechanisms of action of medroxiprogesterone acetate, en Robustelli Della Cuna G, Tepmongkol P, Somboonchareon (Eds.), *The role of high dose medroxiprogesterone acetate in the management of endocrine-related tumors*, Bangkok, pp. 21-27, 1986.

Roe FJC, Carter RL, Mitchley CV, Peto R, Hecker E. On the persistence of tumour initiation and the acceleration of tumor progression in mouse skin tumorigenesis. *Int. J. Cancer* 9:264, 1972.

Russo IH, Gimotty P, Dupuis M, Russo J. Effect of medroxyprogesterone acetate on the response of the rat mammary gland to carcinogenesis. *Brit. J. Cancer* 59:210, 1989.

Russo J, Tay LK, Russo IH. Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis. *Breast Cancer Res. Treat.* 2:5, 1982.

Satyaswaroop PG, Sivarajah A, Zaino RJ, Mortel R. Hormonal control of growth of human endometrial carcinoma in the nude mouse model en Bresciani F, King RJB, Lippman ME, Raynaud JP (Eds.), *Progress in Cancer Research and Therapy, Vol 35: Hormones and cancer 3*, Raven Press, New York, pp. 430-435, 1988.

Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. NY Acad. Sci.* 51:660, 1949

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

Schneider M, Michna H, Nishino Y, El Etreby MF. Antitumor activity of the progesterone antagonists ZK 98.299 and RU 38.486 in the hormone-dependent MXT mammary tumor model of the mouse and the DMBA- and the MNU-induced mammary tumor models of the rat. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 25:691, 1989.

Schultz KD, Zippel HH, Ruck A, Holzel F. Selection and practicability of different hormonal treatment methods in endometrial cancer; en Bresciani F, King RJB, Lippman ME, Raynaud JP (Eds.), *Progress in Cancer Research and Therapy, Vol 35: Hormones and Cancer 3*, Raven Press, New York, pp. 445-455, 1988.

Schulz KD, Schmidt-Rhode P, Sturm G. High dose medroxyprogesterone acetate in breast cancer-present state of knowledge; en Robustelli Della Cuna G, Nagel GA, Lanius P (Eds.), *German-Italian Oncological Symposium, Venice, September 1984*. Kehler Verlag KG, Freiburg, pp. 21-40, 1985.

Screpanti I, Toniato E, Gulino A, Santoni A, Frati L. Estradiol increases the sensitivity of MCF-7 human breast cancer cells to natural killer cell activity; en Bresciani F, King RJB, Lippman ME, Raynaud JP (Eds.), *Progress in Cancer Research and Therapy, Vol 35: Hormones and Cancer 3*, Raven Press, New York, pp. 270-273, 1988.

Shimkin MB, Wyman RS. Effect of adrenalectomy on mammary tumorigenesis in strain C3H mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 6:187, 1945.

Sibley CH, Tomkins GM. Mechanisms of steroid resistance. *Cell* 2:221, 1974.

Siiteri PK, Nisker JA, Hammond GL. Hormonal basis of risk factors for breast and endometrial cancer; en Iacobelli S, King RJ, Lindner HR, Lippman ME (Eds.), *Hormones and Cancer*, Raven Press, New York, pp. 499-505, 1980.

Sluysen M, Van Nie R. Estrogen receptor content and hormone-response growth of mouse mammary tumors. *Cancer Res.* 34:3253, 1974.

Smith GH, Arthur LA, Medina D. Evidence of separate pathways for viral and chemical carcinogenesis in C3H/StWi mouse mammary glands. *Int. J. Cancer* 26:373, 1980.

Sobel NI, Vuoto HD, Matos EL. Epidemiología del cáncer de mama en la Argentina - 770 casos estudiados en el Instituto Oncológico "Angel Roffo". *Revista Argentina de Mastología* 3:9, 1984.

Soto AM, Sonnenschein C. The role of estrogens on the proliferation of human breast tumor cells (MCF-7). *J. Steroid. Biochem.* 23: 87, 1985.

Soto AM, Sonnenschein C. Cell Proliferation of estrogen-sensitive cells: The case for negative control. *Endocr. Rev.* 8:44, 1987.

Spinola PG, Marchetti B, Labrie F. Adrenal steroids stimulate growth and progesterone receptor levels in rat uterus and DMBA-induced mammary tumors. *Breast Cancer Res. Treat.* 8:241, 1986.

Squartini F. Tumours of the mammary gland; en Turusov VS (Jefe de editores), *Pathology of tumours in laboratory animals*, Lyon, pp. 43-90, 1979.

Staff of the Roscoe B Jackson Memorial Laboratory. Existence of non chromosomal influence in the incidence of mammary tumors in mice. *Science* 78:465, 1933.

Strong LC. Genetic Etiology of Cancer. *Cancer* 40:438, 1977.

Sukumar S, Carney W, Barbacid M. Independent Molecular Pathway in Initiation and Loss of Hormone Responsiveness of breast Carcinomas. *Science* 240:524, 1988.

Studer H, Peter HJ, Gerber H. Natural heterogeneity of thyroid cells: the basis for understanding thyroid function and nodular goiter growth. *Endocrine Rev.* 10:125, 1989.

Sun M. Panel says depo provera not proved safe. *Science*, 226:950, 1984.

Sutherland D. Hormones and Cancer; en Tannock IF, Hill RP (Eds.), *The Basic Science of Oncology*, Pergamon Press, Toronto, pp. 204-222, 1987.

Sutherland RL, Murphy LC, San Foo M, Green MD, Whybourne AM. High-affinity anti-oestrogen binding site distinct from the oestrogen receptor. *Nature* 288:273, 1980.

Talwalker PJ, Meites J, Mizuno H. Mammary tumor induction by estrogen or anterior pituitary hormones in ovariectomized rats given 7,12-dimethyl-1,2-benzthrene. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 116:531, 1964.

Taya K, Komura H, Watanabe G, Sasamoto S. Peripheral blood levels of immunoreactive inhibin during pseudopregnancy, pregnancy and lactation in the rat. J. Endocrinology, 121:545, 1989.

Thomas DB. Rapporteur's report - Epidemiology. Breast Cancer Res. Treat. 18:S31, 1991.

Thomson EW, Shima TB, Reich R, Martin GR, Dickson RB, Lippman ME, Albini A. Regulation of invasiveness of human breast cancer cell lines *in vitro*; en Bresciani F, King RJB, Lippman ME, Raynaud JP (Eds.), Progress in Cancer Research and Therapy, Vol 35: Hormones and Cancer 3, Raven Press, New York, pp. 258-262, 1988.

Toniolo PG, Pasternack BS, Shore RE, Sonnenschein E, Koenig KL, Rosenberg C, Strax P, Strax S. Endogenous hormones and breast cancer: A prospective cohort study. Breast Cancer Res. Treat. 18: S23, 1991.

Trichopoulos D, MacMahon B, Cole P. Menopause and breast cancer. JNCI 48:605, 1972.

Tseng L, Gurpide E. Induction of human endometrial estradiol dehydrogenase by progestins. Endocrinology 97:825, 1975.

Ustarán JK, Bianco M, Meiss RP, Rascován S. Epidemiología descriptiva del cáncer de mama (1.658 casos nuevos en la Argentina: 1938-1984). Prensa Médica 75:73, 1988.

Van Nie R. Mammary tumorigenesis in the GR mouse strain; en Hilgers J, Sluysers M (Eds.), Mammary tumors in the mouse, Elsevier/North Holland, Amsterdam, pp. 201-206, 1981.

Van Nie R, Deux A. Biological and morphological characteristics of mammary tumors in GR mice. J. Natl. Cancer Inst. 46:885, 1971.

Van Nie R, Thung PJ. Responsiveness of mouse mammary tumors to pregnancy. Eur. J. Cancer 1:41, 1965.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger y col. Genetic alterations during colorectal tumor development. N. Engl. J. Med. 319:525, 1988.

Vorherr H. Breast Cancer, Urban & Schwarzenberg Inc., Baltimore-Munich, 1980.

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

Walker MJ, Ronan SG, Han MC, Beattie CW, Das Gupta TK. Interrelationship between

- histopatologic characteristics of melanoma an estrogen receptor status. *Cancer* 68:184, 1991.
- Watson CH, Medina D, Clark JH. Estrogen receptor characterization in a transplantable mouse mammary tumor. *Cancer Res* 37:3344, 1977.
- Watson C, Medina D, Clark JH. Characterization and estrogen stimulation of cytoplasmic progesterone receptor in the ovarian-dependent MXT-3590 mammary tumor line. *Cancer Research* 39:4098, 1979.
- Weichselbaum RR, Hellman S, Piro AJ, Nove JJ, Little JB. Proliferation kinetics of a human breast cancer line *in vitro* following treatment with 17-beta-estradiol and 1-B-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res.* 38:2339, 1978.
- Welsch CW. Growth inhibition of rats mammary carcinoma induced by cis-platinum diamino-dichloride-II. *J. Natl. Cancer Inst.* 47:1071, 1971.
- Welsch CW, Clemens JA, Meites J. Effects of multiple pituitary homografts or progesterone in 7,12-dimethylbenzanthracene-induced mammary tumors in rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 41:465, 1968.
- Welsch CW, de Iturri GC, Brennan MJ. DNA synthesis of human, mouse and rat mammary carcinomas *in vitro*. *Cancer* 38:1272, 1976.
- Welsch CW, Louks G, Fox D, Brooks C. Enhancement by prolactin of carcinogen induced mammary carcinogenesis in the male rat. *Brit. J. Cancer* 32:427, 1975.
- Welsch CW, Nagasawa H. Prolactin and murine mammary tumorigenesis: a review. *Cancer Res.* 37:951, 1977.
- Wheelock EF, Robinson MK. Endogenous control of the neoplastic process. *Lab. Invest.* 48:120, 1983.
- WHO Collaborative Study of Neoplasia an Steroid Contraceptives. Breast Cancer, cervical cancer and depot medroxyprogesterone acetate. *Lancet* 2:1207, 1984.
- Woodruff M. Interaction of cancer and host. *Br. J. Cancer* 46:313, 1982.
- Yanai R, Nagasawa H. Inhibition of mammary tumorigenesis by ergot alkaloids and promotion of mammary tumorigenesis by pituitary isografts in adeno-ovariectomized mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 48:715, 1972.
- Zaccheo T, Di Salle F. Experimental antitumor activity of medroxyprogesterone acetate; en Robustelli Della Cuna G, Tepmongkol P, Somboonchareon S (Eds.), *The Role of High Dose Medroxyprogesterone Acetate in the Management of Endocrine-Related Tumors*, Bangkok, pp. 3-20, 1986.

GLOSARIO

ACTH:	adrenocorticotrofina.
BE:	benzoato de estradiol.
DH:	hiperplasias ductales.
DHT:	dihidrotestosterona.
DMBA:	7,12-dimetilbenzantraceno.
E₂:	17-β-estradiol.
EGF:	factor de crecimiento epidérmico.
FSH:	hormona folículo estimulante.
GC:	glucocorticoides.
HAN:	nódulos hiperplásicos lobulillares.
HD:	hormonodependiente.
HI:	hormonoindependiente.
IGF:	factor similar a la insulina.
LH:	hormona luteinizante.
LHRH:	hormona liberadora de la hormona luteinizante.
MCA:	3-metilcolantreno.
MMTV:	virus del tumor de mama de ratón.
MPA:	acetato de medroxiprogesterona.
MPA-D:	dependiente de MPA.
MPA-I:	independiente de MPA.
P:	progesterona.
RE:	receptor de estrógenos.
REGF:	receptor de EGF.

RP: receptor de progesterona.

SHBG: globulina ligadora de hormonas sexuales.

TGF: factor de crecimiento tumoral.

TSH: tirotrófina.