

Inducción de tumores mamarios mediante trasplante ortotópico de células 4T1 en ratones BALB/c de diferente línea endogámica parental: estudio piloto

Induction of mammary tumors by orthotopic transplantation of 4T1 cells in BALB/c mice of different parental inbred line: pilot study

Zeirham Loera-Heras¹, Maricruz Anaya-Ruiz², Julieta Gutiérrez-Saldívar³, Humberto Astiazaran-García^{1,4,*}.

1. Posgrado en Ciencias de la Salud, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México.
2. Centro de Investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Metepec, Puebla, México.
3. Julieta Gutiérrez Saldívar, Hermosillo, Sonora, México.
4. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, Sonora. México.

***Autor de correspondencia:** Humberto Astiazaran-García

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.,

Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas No. 46 Col La Victoria, C.P. 83304, Hermosillo, Sonora. México.

e-mail: hastiazaran@ciad.mx, humberto.astiazaran@unison.mx

DOI <http://dx.doi.org/10.28960/revmeduas.2007-8013.v13.n3.003>

Recibido 22 de enero 2023, aceptado 15 de agosto 2023

RESUMEN

Objetivo. Desarrollar tumores mamarios mediante el trasplante ortotópico de células 4T1 en ratones BALB/c de diferente línea endogámica parental. **Material y métodos.** Se realizó un estudio experimental, células 4T1 (5×10^4) fueron trasplantadas en la cuarta almohadilla de grasa mamaria de ratones hembra BALB/c de la línea endogámica A (LE-A n=4) y línea endogámica B (LE-B n=3). El día del trasplante se denominó día inicial (D0), en los días posteriores al trasplante D7, D14, D21 y D28 fue evaluado el crecimiento tumoral utilizando un calibrador electrónico. Estadística con prueba t de student. **Resultados.** En el D28 ambas líneas endogámicas desarrollan tumores sólidos con un volumen de $1007.9 \pm 335.6 \text{ mm}^3$ (LE-A) y en LE-B $994.0 \pm 330.7 \text{ mm}^3$ (LE-B) siendo significativamente iguales $P > 0.05$. El grado histológico en ambas líneas endogámicas fue de 3 y se observó un aumento del tamaño del bazo con $291.6 \pm 44.3 \text{ mm}^2$ (LE-A) y con $282 \pm 18.8 \text{ mm}^2$ (LE-B) siendo significativamente iguales $P > 0.05$. **Conclusiones.** Ambas líneas endogámicas (A y B) de la cepa BALB/c desarrollaron tumores sólidos de tamaño, apariencia y características histopatológicas similares.

Palabras clave: Cáncer de mama; modelos murinos; trasplante ortotópico; células 4T1; tumores mamarios.

ABSTRACT

Objective. Develop mammary tumors by orthotopic transplantation of 4T1 cells in mice of the same BALB/c strain but a different parental inbred line. **Materials and methods.** An experimental study was carried out. 4T1 cells (5×10^4) were transplanted in the fourth mammary fat pad of female BALB/c mice from inbred line A (IL-A n=4) and inbred line B (IL-B n=3). The day of transplantation is called the first day (D0), on days' post-transplantation D7, D14, D21 and D28 tumor growth was assessed using an electronic caliper. Statistical design with t student test. **Results.** On D28 both inbred develop solid tumors with a volume $1007.9 \pm 335.6 \text{ mm}^3$ and $994.0 \pm 330.7 \text{ mm}^3$ no significant differences were observed $P > 0.05$. The histological grade in both inbred lines was 3 and an increase in spleen size $291.6 \pm 44.3 \text{ mm}^2$ (IL-A) and $282 \pm 18.8 \text{ mm}^2$ (IL-B) no significant differences were observed $P > 0.05$. **Conclusions.** Both inbred lines (A and B) of the BALB/c strain developed solid tumors of similar size, appearance, and histopathology.

Key words: Breast cancer; mouse models; Orthotopic transplantation; 4T1 cell; mammary tumors.

INTRODUCCION

En el año en 2020 el cáncer de mama femenino (CaMa) ha superado al cáncer de pulmón como el cáncer más comúnmente diagnosticado en todo el mundo, con un estimado de 2,3 millones de casos nuevos (11,7 % de todos los casos de

cáncer). Desafortunadamente, la incidencia estimada de casos aumentará en todo el mundo en un 47% estimado hasta el año 2040¹. En México, en 2020, el cáncer de mama fue la enfermedad más frecuente (15.3 %) y la primera causa de muerte en mujeres, con un estimado

de 29 mil 929 nuevos casos y siete mil 931 muertes con una tasa de incidencia de 40.5 y de mortalidad de 10.6 por 100 mil².

Durante décadas, la investigación oncológica experimental y el desarrollo preclínico de fármacos han utilizado modelos *in vitro* e *in vivo*. De los modelos *in vivo* los modelos animales cierran la brecha entre los estudios preclínicos y clínicos. En este sentido, los modelos murinos juegan un papel clave en la investigación traslacional del cáncer de mama al imitar el crecimiento y la progresión de tumores mamarios tal como ocurre en los humanos³.

Un modelo murino es un ratón de laboratorio que se utiliza para estudiar algún aspecto de la fisiología o enfermedad humana⁴, y es utilizado en la práctica preclínica porque comparten características de mamíferos con los humanos. Actualmente hay disponible una amplia variedad de modelos murinos utilizados en el estudio del cáncer de mama, incluidos modelos de xenoinjertos inmunosuprimidos que utilizan tumores derivados de pacientes o líneas celulares humanas establecidas, modelos de carcinógenos inducidos químicamente y modelos de aloinjertos inmunocompetentes trasplantados con líneas celulares de cáncer de mama de ratón singénico⁵. En los modelos singénicos, se inyectan células cancerosas de un donante de tumor murino a un huésped murino inmunocompetente, es decir en el mismo tipo de órgano en

el que se originó el cáncer. En este microambiente, las células injertadas se exponen a condiciones que simulan las que sustentaron el tumor en su sitio de origen⁶.

Los ratones BALB/c es una de las cepas endogámicas más utilizadas en estudios de cáncer con el fin de para investigar el crecimiento del tumor y la respuesta al tratamiento. Se denominan BALB/c porque derivan de la cepa albina Bagg proporcionada por Halsey J. Bagg del Memorial Hospital (NY, EE. UU.) en 1913, y c por la condición homocigota recesiva del gen C que impide la expresión del color⁷. En estos ratones, el modelo más utilizado para inducir tumores mamarios es el trasplante ortotópico de células 4T1 de cáncer de mama triple negativo (CMTN)⁸. El CMTN se caracteriza por la falta de expresión del receptor de progesterona [RP], de los receptores de estrógeno [RE] y del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 [HER2]. Además, es un subtipo de CaMa agresivo, metastásico y recurrente en la población femenina con ~15–20%⁹.

La línea celular 4T1 se aisló originalmente como subpoblación 410.4 derivada de un tumor mamario que surgió espontáneamente en ratones BALB/cfC3H¹⁰. Esta línea celular es altamente tumorigénica y es uno de los pocos modelos de CaMa con la capacidad de hacer metástasis de manera eficiente en los sitios anatómicamente

afectados en el ser humano, incluidos los pulmones, los huesos, el bazo, el hígado y el cerebro con características patológicas como las observadas en pacientes con cáncer de mama en etapa tardía¹¹.

Este modelo de inducción de CaMa en ratón proporciona información para comprender la base molecular del cáncer. Sin embargo, a pesar de los valiosos datos proporcionados con respecto a la biología del tumor, debido al trasfondo genético, los modelos de ratón actuales no logran modelar con precisión el desarrollo de tumores mamarios. Al igual que en los humanos en los ratones, el polimorfismo es la característica esencial que hace de cada sea un ser único, con diferente susceptibilidad, presentación y progresión de la enfermedad¹². El establecimiento controlado de cruces entre hermanos puede garantizar que las variaciones en los cromosomas sexuales y el genoma mitocondrial estén igualmente representadas en todos los grupos¹³.

Por lo anteriormente mencionado se han informado diferencias específicas en la susceptibilidad a la carcinogénesis en la cepa endogámica de ratón¹⁴. Los primeros hallazgos sobre la tumorigenicidad del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) en modelos murinos se discutieron en la conferencia realizada por el Laboratorio Jackson donde la Dra. Tatyana Golovkina demostró que cepas endogámicas del mismo

origen, pero con diferencias en una de las regiones de sus genes MMTV tenían diferente incidencia tumoral y metastásica¹⁵.

Las diferencias genéticas entre cepas de ratones han dejado claro que no todos los antecedentes son isogénicos, lo que los convierte en cepas que imitan pobremente alguna enfermedad humana¹⁶. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue generar y desarrollar tumores mamarios mediante trasplante ortotópico de células 4T1 en ratones de la misma cepa BALB/c, pero diferente línea endogámica parental.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de células 4T1

La línea celular de carcinoma mamario murino 4T1 fue donada por las Dras. Maricruz Anaya Ruiz y Guadalupe Delgado López del Laboratorio de Biología Celular del Centro de Investigaciones Biomédicas de Oriente (CIBIOR) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Las células de carcinoma mamario murino 4T1 originalmente fueron adquiridas de la American Type Culture Collection (CRL-2539 TM) y se mantuvieron en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM-GIBCO™) que contenía suero bovino fetal al 10 % (SBF-GIBCO™) con solución antibiótica/antimicótica al 1% (100 UI/ml de penicilina y estreptomycin— GIBCO™) en condiciones de atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO² en un frasco de cultivo de 25 mL.

Animales

Cuatro ratones hembra BALB/c endogámicos de dieciséis semanas de edad de la colonia del Centro de Investigaciones Biomédicas del Oriente (CIBIOR) fueron denominados línea endogámica A (LE-A), en la que previamente ya se ha comprobado el desarrollo de tumores mamarios y tres ratones hembra BALB/c endogámicos de treinta y seis semanas de edad de la colonia del bioterio del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA-Universidad de Sonora) fueron denominados línea endogámica B (LE-B). Las unidades experimentales fueron alojadas en el Centro de investigación animal del DIPA en la Universidad de Sonora. Inicialmente, los ratones se mantuvieron con una dieta estándar para ratones de laboratorio (Formulación 5010; Research Diets, New Brunswick, NJ, EE. UU.). LE-A fue aclimatada durante 1 semana antes de su uso y ambos grupos se mantuvieron durante todo el estudio en un ambiente controlado: 24 ± 2 °C, 50 ± 10 % de humedad relativa y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Todos los animales recibieron agua y alimentos *ad libitum*.

Declaración de Ética

Este estudio fue realizado siguiendo los principios de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio¹⁷ y la Norma Oficial Mexicana NOM-062¹⁸. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Sonora, México (CEI-UNISON 5/2022).

Modelo ortotópico de cáncer de mama

Para el desarrollo del modelo murino de ratonas BALB/c con cáncer de mama por trasplante de células tumorales 4T1, fue seguida la metodología propuesta por Pulaski y Ostrand-Rosenberg⁸. Fueron inyectadas 5×10^4 células 4T1 por vía subcutánea en un volumen total de 100 μ L de medio DMEM libre de suero bovino fetal, en la cuarta glándula mamaria inguinal derecha de las ratonas. El día del trasplante se denominó inicial/día cero (D0). El volumen del tumor se midió cada dos días con un calibrador después de 7, 14, 21 y 28 días del trasplante de las células. El volumen tumoral fue calculado según la fórmula: $0,52 \times \text{diámetro mayor} \times (\text{diámetro menor})^2$. Las ratonas fueron anestesiadas el día 28 después de la inyección de células tumorales con 0,15 ml/kg de peso con xilazina/ketamina vía intraperitoneal y fueron sacrificadas mediante punción cardíaca después de una incisión abdominal y torácica. Los tumores y los bazos fueron extirpados para el posterior análisis histológico.

Análisis histológico

Los tumores fueron fijados en paraformaldehído al 10% y procesados en parafina para ser seccionados. Fueron teñidas secciones de tumor de 7 μ m con hematoxilina y eosina para el examen histológico de tumores primarios. Las secciones teñidas fueron examinadas y fotografiadas usando un microscopio Olympus CX31 y una cámara Pixera 150Es, para visualizar las

imágenes fue utilizado el programa viewfinder 3.0. El grado histológico fue evaluado por un patólogo de acuerdo con los lineamientos del Consenso Mexicano para el Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer de Mama¹⁹ que utiliza la escala Scarff-Bloom-Richardson (SBR)²⁰ esquema para la interpretación morfológica de cortes histológicos. La clasificación de Scarff-Bloom-Richardson se basa en la evaluación microscópica de los patrones morfológicos y citológicos de las células tumorales (grado nuclear), incluida la formación de túbulos y la tasa mitótica. La suma de estos parámetros es lo que califica a cada tumor según el grado I (3-5 puntos, bien diferenciado), grado II (6-7 puntos, moderadamente diferenciado) y grado III (8-9 puntos, poco diferenciado).

Análisis estadístico

Todos los análisis y gráficos se realizaron con el software GraphPad Prism 8.0.1 (Prism Software, Irvine, CA, EE. UU.). Después de las pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, los datos se sometieron a la prueba de Mann-Whitney. Los datos en gráficos se presentan como valores medios y su correspondiente desviación estándar. La diferencia entre grupos se consideró significativa cuando $P < 0,05$.

RESULTADOS

Influencia de la cepa BALB/c de diferentes líneas endogámicas parentales en el desarrollo

del crecimiento tumoral *in vivo*.

A los 28 días post inyección de células 4T1, ambos grupos de ratones de la cepa BALB/c de diferentes líneas endogámicas parentales desarrollaron tumores primarios en la región torácica, que generalmente alcanzaban un tamaño de 1 cm^3 (Figura 1a y 1b). El volumen tumoral de LE-A el día 28 fue $969,1 \pm 323 \text{ mm}^3$ (Figura 1a) ligeramente superior al de la LE-B con $955,8 \pm 36,6 \text{ mm}^3$ (Figura 1b), pero sin diferencias estadísticamente significativas (Figura 1c). El carcinoma mamario murino 4T1 induce una esplenomegalia.

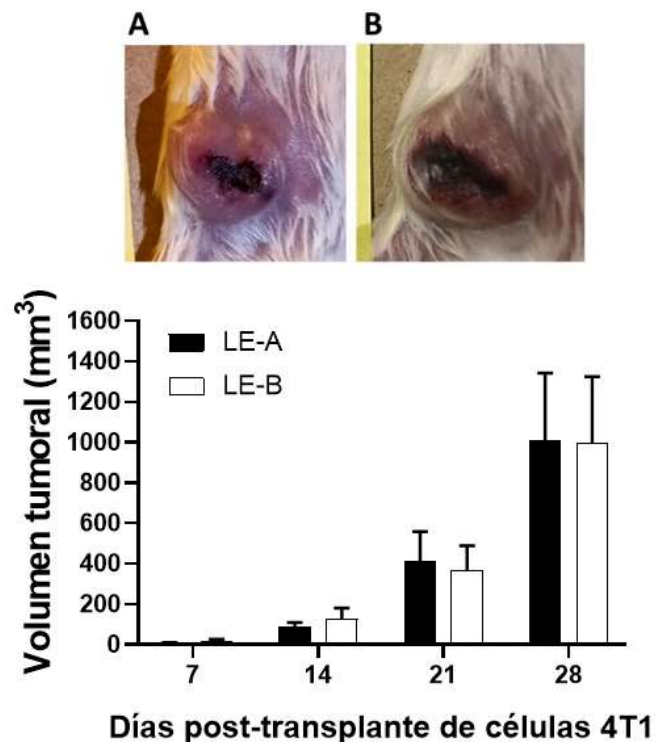


Figura 1. El crecimiento de tumor sólido en ratones BALB/c de diferentes líneas parentales endogámicas inyectadas con células 4T1 generó una necrosis evidente. A) Ratón BALB/c del grupo de LE-A. B) Ratón BALB/c del grupo de LE-B. C) Análisis del crecimiento tumoral en cepas endogámicas BALB/c de LE-A y LE-B trasplantadas con células 4T1. El volumen tumoral se midió con calibradores electrónicos y fue calculado con la fórmula: $0,52 \times \text{diámetro largo} \times (\text{diámetro corto})^2$. Cada barra representa la media \pm DS. *Denota diferencias significativas entre grupos LE-A (n=4) vs LE-B (n=3), siendo $P < 0,05$.

Observamos bazos más grandes en los ratones trasplantados con células 4T1 (Figura 2a y 2b). El tamaño del bazo de LE-A el día 28 fue de $291,6 \pm 44,3 \text{ mm}^2$ en comparación con LE-B $282 \pm 18,8 \text{ mm}^2$ (Figura 2c).

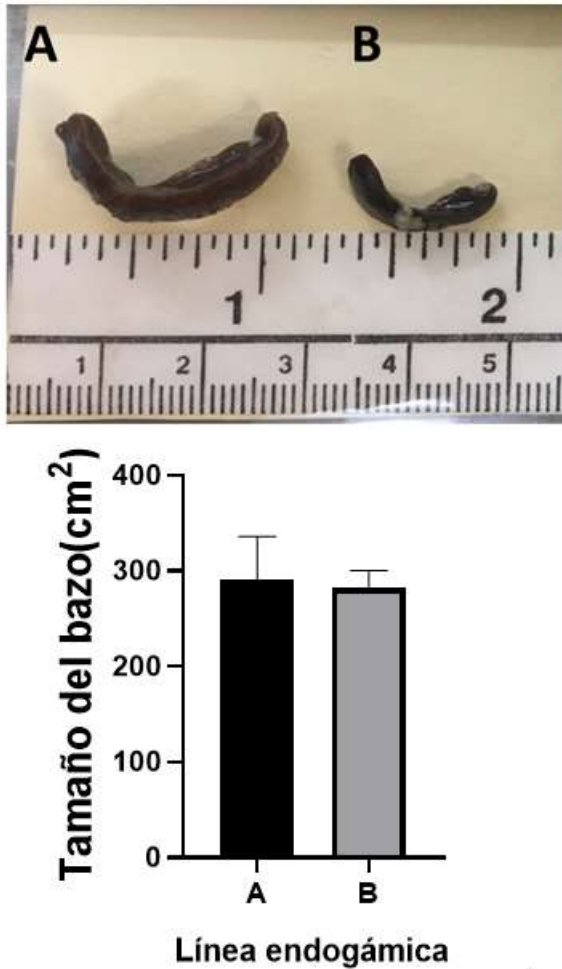


Figura 2. Esplenomegalia en ratones con tumores inducidos con células 4T1. A) Fotografía representativa del tamaño del bazo de un ratón trasplantado con células 4T1. B) Fotografía representativa del tamaño del bazo de un ratón normal sin trasplante de células 4T1. C) Análisis del tamaño del bazo en el modelo murino. Cada barra representa la media \pm DS. *Denota diferencias significativas entre grupos LE-A (n=4) vs LE-B (n=3), siendo $P < 0.05$.

Caracterización histopatológica del desarrollo de tumores mamarios en dos cepas endogámicas BALB/c

En la Figura 3a y 3b observamos una sección

de un tumor primario teñida con Hematoxilina-Eosina (H-E) que ilustra un área central de necrosis y células neoplásicas. En la periferia del tumor se puede observar una zona proliferativa de células poco diferenciadas, discohesivas, con marcado pleomorfismo nuclear, nucléolos eosinofílicos prominentes y numerosas mitosis anormales. En la zona central del tumor se observa necrosis de tipo coagulativo con restos celulares y apoptosis. Según la escala SBR, los tumores de ambas cepas endogámicas son de grado III (Cuadro 1).

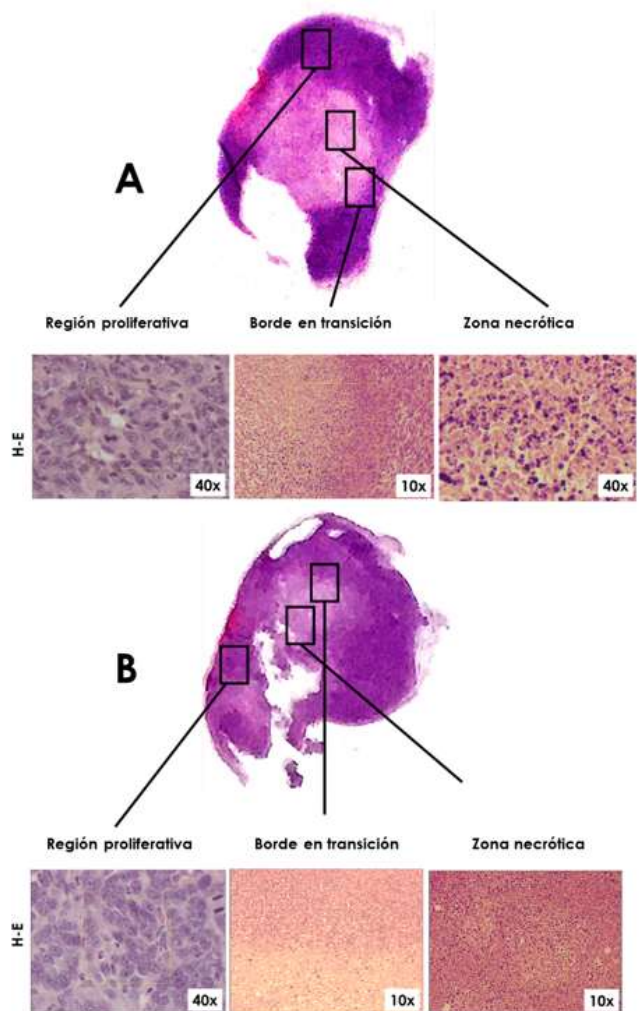


Figura 3. Sección de tumor axial teñida con H-E de un tumor primario. A) Línea endogámica A; B) Línea endogámica B.

Cuadro 1. Parámetros diagnósticos del informe histopatológico de tumores mamarios para determinar el grado histológico.

Tejido	Grado nuclear ¹	Número de mitosis ² (Calificación)	Formación de túbulos (Calificación)	% Necrosis	Grado histológico SBR ³
LE-A1	3	35(3)	10-75% (2)	80	Grado III
LE-A2	3	47(3)	10-75% (2)	80	Grado III
LE-B1	3	57(3)	<10% (3)	70	Grado III
LE-B2	3	48(3)	<10% (3)	70	Grado III

¹ Calificación otorgada por la patóloga.

² El número de mitosis viene dado por visualización por cada 10 campos de gran aumento en 40x.

³ SBR: Scarff-Bloom-Richardson.

DISCUSION

En México el cáncer de mama es la principal causa de mortalidad en mujeres de 30 años o más²¹. Los modelos de tumorigénesis mamaria en ratones inducidos con células tumorales pueden proporcionar información importante sobre la base molecular del cáncer de mama humano²².

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la influencia del fondo de la cepa endogámica BALB/c en la inducción de tumores mamarios con células 4T1. En el modelo utilizado en este estudio, observamos que 28 días después de la inyección ortotópica de células 4T1 en ratones BALB/c inmunocompetentes, ambos grupos de diferentes cepas endogámicas desarrollaron tumores mamarios, tal como se informó en otros estudios^{11,23}.

Los modelos ortotópicos dan como resultado tumores más grandes, tienen una alta capacidad

metastásica en los pulmones y los ganglios linfáticos y un mayor patrón de crecimiento invasivo con un número más considerable de vasos sanguíneos y adipocitos formándose dentro de los tumores²⁴. Es así como Zhang et al, destaca la idoneidad de la utilización de los modelos ortotópicos de cáncer de mama en la almohadilla de grasa mamaria, ya que involucran el microambiente tumoral en comparación con los modelos subcutáneos²⁵.

Se ha reportado que cruces entre cepas endogámicas como un mismo antecedente pueden causar modificaciones en la expresión de genes relacionados con la tumorigénesis mamaria, afectando las interacciones entre el huésped y el desarrollo tumoral. Se reconoce comúnmente que algunas cepas endogámicas son más susceptibles mientras que otras son más resistentes a la tumorigénesis mamaria y cruzar estas

cepas endogámicas aumenta la latencia tumoral^{13,26}. Teniendo en cuenta estos hallazgos sobre los antecedentes genéticos de la misma especie en la respuesta a la inducción de tumores mamarios, se sugiere que en los modelos murinos pueden responder de manera diferente al desarrollo de cánceres de mama²⁷.

Previamente ha sido reportado esplenomegalia en ratones con tumores inducidos con células 4T1¹¹ y nuestros resultados concuerdan con lo informado por Hunter et al, quienes observaron que el tamaño del bazo había aumentado tras el trasplante de células²⁸. El aumento de la esplenomegalia se ha asociado principalmente debido a la hiperplasia granulocítica de células como los neutrófilos y los leucocitos¹¹, y con aumentos en varias citoquinas inflamatorias derivadas de tumores, como G-CSF, GM-CSF e IFN- γ y debido al proceso de eritropoyesis (Glicoforina A+) y megacariopoyesis (Factor VIII+)²⁸.

El factor estimulante de colonias de granulocitos-monocitos o la subfamilia de glicoproteínas GM-CSF juega un papel crucial en la activación de las células inflamatorias, la movilización de estas células de la médula ósea a la sangre periférica y la activación del sistema inmunológico da como un resultado una reacción leucemoide. Esta reacción se caracteriza por hiperplasia de la médula ósea, una granulocitosis de evolución rápida que ocurre sin cambios significativos, linfopenia y granulocitos masivos. La reacción leucemoide aparece en el 15% de los pacientes

con cáncer y se ha propuesto como marcador pronóstico para pacientes con CaMa, lo que confirma la idoneidad del modelo 4T1 como modelo preclínico de CaMa²³.

Al igual que en los tumores de mama humanos, el tumor primario muestra características de cáncer de mama de tipo basal. Puede verse ilustrando el borde circunscrito de células neoplásicas en la periferia y áreas geográficas de necrosis, marcada atipia citológica y numerosas mitosis (Figura 3a y 3b)¹¹. En México para realizar la interpretación morfológica de los cortes histológicos se utiliza la guía del Consenso Mexicano sobre Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer de Mama, que utiliza el esquema Scarff-Bloom-Richardson (SBR)¹⁹. Estos sistemas evalúan las características de las células del tejido mamario y determinan el grado de agresividad del tumor. Los tumores de menor grado (I-II) tienen un buen pronóstico y pueden ser tratados de forma menos agresiva, con una mejor tasa de supervivencia, y lo contrario para las neoplasias de mayor grado (III)²⁹.

CONCLUSIONES

Evaluamos la influencia del fondo genético de la subcepa BALB/c en el desarrollo de tumores mamarios inducidos por la línea celular tumoral 4T1. Los resultados de este estudio indican que los ratones BALB/c de ambos orígenes endogámicos pueden generar tumores mamarios.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de

Ciencia y Tecnología (CONACyT). A la M. en C. Jessica Ávila Prado por su ayuda en el análisis estadístico. Queremos agradecer especialmente a la M. en C. Evoli Noemí López Moran del Laboratorio de Biología Celular del CIBIOR por su apoyo en la instrucción del modelo de inducción tumoral por trasplante de células ortotópicas 4T1.

Referencias

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;0(0):1–41.
2. Sanchez YLM, Medrano Guzman R. Epidemiología del cáncer de mama [Internet]. [cited 2023 Jan 17]. Available from: <https://www.gob.mx/imss/articulos/epidemiologia-del-cancer-de-mama-318014>
3. Korinek V. *Animal Modeling in Cancer*. Genes (Basel). 2020;11(9):1–4.
4. National Human Genome Research Institute. MOUSE MODEL [Internet]. [cited 2022 Apr 23]. Available from: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Mouse-Model>
5. Liu C, Wu P, Zhang A, Mao X. Advances in Rodent Models for Breast Cancer Formation, Progression, and Therapeutic Testing. *Front Oncol*. 2021;11(March):1–11.
6. Park MK, Lee CH, Lee H. Mouse models of breast cancer in preclinical research. *Lab Anim Res*. 2018;34(4):160–5.
7. Potter M. History of the BALB / c Family. In: *The BALB/c Mouse*. Berlin, Heidelberg.: Springer; 1985. p. 1–5.
8. Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. *Curr Protoc Immunol*. 2000 Oct;39(1):20.2.1-20.2.16.
9. Manjunath M, Choudhary B. Triple-negative breast cancer: A run-through of features, classification and current therapies (Review). *Oncol Lett*. 2021;22(1):1–21.
10. Miller BE, Roi LD, Howard LM, Miller FR. Quantitative Selectivity of Contact-mediated Intercellular Communication in a Metastatic Mouse Mammary Tumor Line. *Cancer Res*. 1983;43(9):4102–7.
11. Tao K, Fang M, Alroy J, Sahagian GG. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC cancer*. 2008;8(1), 1-19.
12. Hunter KW. Mouse models of cancer : does the strain matter? *Nat Rev Cancer*. 2012;12(2):144-149.
13. Reilly KM. The effects of genetic background of mouse models of cancer: friend or foe? *Cold Spring Harb Protoc*. 2016;2016(3):pdb-top076273.
14. Nandi S, Bern HA. Relation Between Mammary-Gland Responses to Lactogenic Hormone Combinations and Tumor Susceptibility in Various Strains of mice. *J Natl Cancer Instit*. 1960;24(4):907–31.
15. Murphy KL, Grimm SL, Rosen JM. Modeling Mammary Cancer in Mice Conference,. In: *Meeting report*. Bar Harbor, Maine; 1999. p. 5–8.

16. Rivera J, Tessarollo L. Genetic background and the dilemma of translating mouse studies to humans. *Immunity*. 2008;28(1):1–4.
17. Garber JC, Wayne R, Bielitzki JT, Clayton LA, Donovan JC, Hendriksen CF, et al. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. eighth. Washington DC, USA: National Academy of Sciences; 2011.
18. NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. 1999.
19. Cárdenas-Sánchez J, Erazo Valle-Solís AA, Arce-Salinas C, Bargalló-Rocha JE, Bautista-Piña V, Cervantes-Sánchez G, et al. Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. Octava revisión. Colima 2019. *Gac Mex Oncol*. 2019;18(3):141–231.
20. Bloom HJG, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. 1957;
21. INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer [Internet]. Available from: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2023/EAP_Cancer.pdf
22. Zeng L, Li W, Chen C. Breast cancer animal models and applications. *Zool Res*. 2020;41(5):477–94.
23. Arroyo-Crespo JJ, Armiñán A, Charbonnier D, Deladriere C, Palomino-Schätzlein M, Lamas-Domingo R, et al. Characterization of triple-negative breast cancer preclinical models provides functional evidence of metastatic progression. *Int J Cancer*. 2019 Oct;145(8):2267–81.
24. Xenografts P, Okano M, Oshi M, Butash A, Okano I, Saito K, et al. Orthotopic Implantation Achieves Better Engraftment and Faster Growth Than Subcutaneous Implantation in Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2020;27–36.
25. Zhang Y, Zhang GL, Sun X, Cao KX, Ma C, Nan N, et al. Establishment of a murine breast tumor model by subcutaneous or orthotopic implantation. *Oncol Lett*. 2018;15(5):6233–40.
26. Davie SA, Maglione JE, Manner CK, Young D, Cardiff RD, et al. Effects of FVB / NJ and C57Bl / 6J strain backgrounds on mammary tumor phenotype in inducible nitric oxide synthase deficient mice. *Transgenic Res*. 2007;193–201.
27. Aupperlee MD, Drolet AA, Durairaj S, Wang W, Schwartz RC, Haslam SZ. Strain-Specific Differences in the Mechanisms of Development. *Endocrinol*. 2009;150(3):1485–94.
28. duPre' SA, Hunter KW. Murine mammary carcinoma 4T1 induces a leukemoid reaction with splenomegaly: Association with tumor-derived growth factors. *Exp Mol Pathol*. 2007;82(1):12–24.
29. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, et al. Prognostic Factors in Breast Cancer College of American Pathologists Consensus. *Arch. Pathol. Lab. Med*. 1999;124(7),966-978.