



Oriana Miranda Barros

MONOGRAFIA  
MODELOS ANIMAIS EM ONCOLOGIA

Mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas  
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

setembro de 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Oriana Miranda Barros

# Modelos Animais em Oncologia

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor João Nuno Moreira e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## DECLARAÇÃO DO AUTOR

---

Eu, Oriana Miranda Barros, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2010160703, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 16 de setembro de 2016.

## NOTA INTRODUTÓRIA

---

Este documento foi escrito ao abrigo do novo acordo ortográfico e encontra-se estruturado mediante as mais recentes orientações incluídas no documento **Normas Orientadoras de Estágio do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra a aplicar no ano letivo de 2015/2016**, de acordo com o estipulado no Art.º 44º, nº 2 da Diretiva 2013/55/UE, do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de novembro de 2013.

## AGRADECIMENTOS

---

Embora a monografia, pela sua natureza académica, seja um trabalho individual, não seria possível a sua concretização sem a colaboração de um capital humano que foi imprescindível em todo este processo.

Ao Professor Doutor João Nuno Moreira, meu orientador, agradeço a disponibilidade e generosidade demonstradas, assim como pelas críticas, correções e sugestões relevantes que foram feitas ao longo da realização deste trabalho.

Agradeço à minha mãe e amigos que foram fulcrais durante esta jornada e cujo apoio prestado durante estes meses não é possível de quantificar.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, quero agradecer a oportunidade que é dada aos estudantes de realizarem uma monografia de cariz científico, com o apoio dos melhores catedráticos da instituição.

A todos deixo aqui o meu agradecimento sincero.

## RESUMO

---

A presente monografia pretende explorar a dificuldade de transposição da informação obtida durante a fase pré-clínica para os ensaios clínicos.

Muitos estudos na fase pré-clínica apresentam resultados promissores. No entanto, por vezes, os ensaios clínicos não são bem-sucedidos. A que é que isto se deve? Porquê que a fase pré-clínica não consegue antever o fracasso que por vezes se verifica nos ensaios clínicos? O que é que pode ser feito futuramente para contrariar esta situação? Estas são algumas questões que precisam de ser discutidas para se poder evoluir no sentido da otimização dos modelos animais usados na investigação em oncologia, para que estes sejam capazes de mimetizar o melhor possível a doença humana. É fulcral a escolha adequada do modelo animal a utilizar na fase pré-clínica. Esta monografia incide nos modelos de murganho, uma vez que são os modelos animais mais utilizados em investigação.

Este assunto adquire especial relevo, uma vez que a indústria farmacêutica perde milhões de euros em ensaios clínicos falhados. Se os modelos animais fossem mais preditivos, esta situação seria evitada e a indústria farmacêutica poderia investir no estudo de fármacos mais promissores.

**Palavras-Chave:** *modelos animais, cancro, oncologia, fase pré-clínica, modelos de murganho xenotransplantados, modelos de murganho geneticamente modificados, modelos de murganho com xenoenxerto derivado do doente.*

# ABSTRACT

---

The present monograph wants to explore the translation difficulty in the information obtained during the preclinical phase for the clinical trials.

Many studies in their preclinical phases present promising results. Meanwhile, sometimes, clinical trials were not successful. What is the reason for this? Why does the preclinical phase not foresee the failure sometimes it can be seen in the clinical trials? What can be done, in the future, to contradict this situation? These are some questions that need to be discussed in order to be able to be developed in the sense of the animal models optimization, used in the oncology research. This way, they can be able to mimic the human disease the best possible. It is decisive the proper choice to the animal model to be used in the preclinical phase. This monograph falls upon in the mouse models, once these are the animal models the most used in research.

This subject gets special importance, as the pharmaceutical industry loses millions of Euros in failed clinical trials. If model animals were more predictive, this situation would be avoided and pharmaceutical industry could invest in more promising medication study.

**Keywords:** *animal models; cancer, oncology; preclinical phase, mouse xenograft models, genetically modified mouse models, mouse xenograft models derived from patient.*

# ÍNDICE

---

DECLARAÇÃO DO AUTOR .....	II
NOTA INTRODUTÓRIA .....	III
AGRADECIMENTOS .....	IV
RESUMO .....	V
ÍNDICE.....	VII
LISTA DE ACRÓNIMOS.....	VIII
INTRODUÇÃO.....	I
1. CANCRO .....	2
2. LEGISLAÇÃO E REQUERIMENTOS LEGAIS NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS NA INVESTIGAÇÃO.....	3
3. MODELOS TUMORAIS .....	3
3.1. Conceito de Modelo Animal.....	4
3.2. Tipo de Modelos de Animais .....	5
3.2.1. Caenorhabditis Elegans .....	6
3.2.2. Mosca da Fruta (Drosophila Melanogaster) .....	6
3.2.3. Peixe-Zebra (Danio Rerio).....	7
3.2.4. Modelos de Murganho .....	8
3.2.4.1 Modelos Singeneicos .....	8
3.2.4.2 Modelos de Murganho Xenotransplantados.....	9
3.2.4.3 Modelos de Murganho Geneticamente Modificados (GEMMS).....	10
3.2.4.4 Modelos de Murganho com Xenoenxerto Derivado do Doente (PDX).....	11
3.2.4.5 “Super-Avatars”.....	13
3.3. Escolha do Modelo de Animal Ideal .....	14
4. VALIDAÇÃO DO MODELO PRÉ-CLÍNICO .....	15
5. METASTIZAÇÃO .....	15
6. LIMITAÇÕES DOS MODELOS ANIMAIS NA INVESTIGAÇÃO DO CANCRO.....	17
7. CO-CLINICAL TRIAL PROJECT .....	19
8. MODELOS EMERGENTES .....	22
8.1. Sistemas de Edição do Genoma.....	22
8.2. Células Estaminais Espermatogoniais em Cultura na Produção de Murganhos knockout dos Genes alvo por Transplantação de Células Germinativas Estaminais...23	23
8.3. Modelos In Silico.....	24
CONCLUSÃO .....	25
BIBLIOGRAFIA .....	26

## LISTA DE ACRÓNIMOS

---

CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats</i>
CRISPR/Cas	<i>CRISPR Associated Cas Nuclease Protein</i>
crRNAs	RNA CRISPR
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DSBs	<i>Double-Strand Breaks</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GEMMs	<i>Genetically Engineered Mouse Models</i>
KRAS	<i>Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
LKBI	<i>Liver Kinase B1</i>
PDX	<i>Patient-Derived Xenografts</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
SI	Sistema Imunitário
SRD5A1	<i>3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 1</i>
SRD5A2	<i>3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 2</i>
SSCs	<i>Spermatogonial Stem Cells</i>
TALENs	<i>Transcription Activator-like Effector Nucleases</i>
tracrRNA	crRNA de ativação em <i>trans</i>
TALEs	<i>Transcription Activator-Like Effectors</i>
XAF1	<i>XIAP-associated factor 1 kb1</i>
XIAP	<i>X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
ZF	<i>Zinc Finger</i>
ZFNs	<i>Zinc Finger Nucleases</i>

# INTRODUÇÃO

---

Ao longo dos tempos, tem-se verificado um aumento do número de terapêuticas conduzidas em fase de ensaio clínico. Porém, a maior parte dos ensaios de fase III falham no alcance dos seus *endpoints* primários. Apenas, 5% dos agentes anticancerosos que passam pela fase pré-clínica são aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*). Surge assim, a necessidade de melhorar os modelos animais preditivos usados na avaliação terapêutica, particularmente na área da oncologia. Estes modelos foram desenvolvidos com o objetivo de mimetizar as aberrações genéticas encontradas nas células tumorais humanas, as características celulares, o processo de invasão e o estroma neoplásico envolvente. Para além disso, estes modelos também tentam mimetizar as respostas terapêuticas levadas a cabo pelos doentes e a evolução da resistência a um dado fármaco (Thakur, Pryer e Singh, 2014).

Nas últimas décadas, o estudo do cancro realizado em modelos de murganho tem ganho popularidade. Com o sucessivo avanço tecnológico, houve necessidade de criar modelos *in vivo* cujos resultados possam ser transpostos para a clínica. Os modelos de murganho são os sistemas *in vivo* mais usados. A integração de uma grande quantidade de informação nos Projetos de Genoma de murganho e humano, têm facilitado a manipulação genética do murganho para mimetizar a doença humana (Mouse e Therapy, 2015).

Através do conhecimento da biologia do cancro, identificação dos *drivers* moleculares de crescimento do cancro, e desenvolvimento de terapias dirigidas, aumentamos a capacidade de administrar um tratamento adequado ao cancro do doente. A medicina personalizada foca-se no tratamento do doente como indivíduo, e não, como membro representativo de um grupo de doentes com as mesmas características histológicas. Neste seguimento, é preciso avaliar qual o melhor sistema para validar a utilidade das terapêuticas personalizadas (Mouse e Therapy, 2015).

Atualmente, encontramos-nos no meio da mais extraordinária revolução tecnológica. Embora o uso de tecnologias como a sequenciação completa do genoma, sejam importantes, não nos permitem responder a questões essenciais como: quem vai desenvolver cancro, que tipo, quando e qual o melhor tratamento? Mas há esperança. As tecnologias que nos permitem determinar a expressão génica e marcadores epigenéticos, silenciamento ou acessibilidade do genoma, aumentam a capacidade de interpretar variações na sequência de genes (Lodhia *et al.*, 2015).

As amostras de diagnóstico do cancro são conservadas em blocos de tecido por fixação com formalina e embebidas em parafina, contendo fragmentos ou *cross-linked* DNA (ácido desoxirribonucleico), com poucos genomas completos. Se as amostras não forem conservadas adequadamente, constituem uma perda de evidência. Por conseguinte, foram introduzidas nas *guidelines* (Lodhia *et al.*, 2015), medidas para a correta conservação dos tecidos usados nos estudos focados no tratamento.

## I. CANCRO

---

O cancro é uma doença muito heterogénea caracterizada por lesões múltiplas genéticas e aberrações em cascatas de sinalização interligadas extensivamente. A complexidade subsequente da doença tem impedido a descoberta e desenvolvimento de estratégias para o tratamento de cancro (Mouse e Therapy, 2015).

O cancro apresenta uma origem clonal, uma vez que se inicia numa única célula anormal com uma sequência de DNA alterada (mutação). A proliferação descontrolada de células anormais é seguida de uma segunda mutação que culmina num estágio aberrante. Os vários ciclos de mutação e expansão seletiva destas células resultam na formação de uma massa tumoral. A partir do momento, que a massa tumoral passa através da barreira membrana basal dos tecidos, dispersa-se para outras partes do corpo (metástase) (Hejmadi, 2010).

Atualmente, são aceites seis marcadores do cancro: imortalidade (divisão celular contínua e replicação ilimitada), produção de sinais “Go” (fatores de crescimento de oncogenes), sobreposição de sinais “Stop” (sinais anti crescimento de genes supressores de tumores), resistência à morte celular (apoptose), angiogénese (formação de novos vasos sanguíneos) e metástase (proliferação para outros locais do organismo) (Hejmadi, 2010).

Um conceito importante a reter é o de oncogene. Os oncogenes são genes que codificam proteínas capazes de transformar células em cultura ou induzir cancro nos animais. Os oncogenes derivam de genes celulares normais denominados proto oncogenes. Os proto oncogenes são transformados em oncogenes por mutações, rearranjos cromossomais, inserção viral, entre outros. Em consequência, as células tumorais tornam-se independentes dos fatores de sinalização de crescimento externos em qualquer microambiente tecidual normal (Hejmadi, 2010).

Estima-se que no ano 2020, o custo do cancro será de 300 biliões de dólares (Richmond e Su, 2008).

## 2. LEGISLAÇÃO E REQUERIMENTOS LEGAIS NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS NA INVESTIGAÇÃO

---

A experimentação animal é fundamental para compreender os mecanismos associados à malignidade e na descoberta de métodos para prevenção, diagnóstico e tratamento do cancro. No entanto, esta prática enfrenta desafios científicos e éticos. Quando num processo investigacional se recorre à utilização de modelos animais, devem ser incorporados os 3R's de Russel e Burch: *replacement* (substituição dos animais por métodos alternativos), *reduction* (redução do número de animais para alcançar os objetivos científicos) e *refinement* (aperfeiçoamento dos métodos para minimizar o sofrimento dos animais) (Workman et al., 2010).

Para substituir os animais por métodos alternativos deve proceder-se à investigação de alternativas ao uso de animais e ao uso de *screenings in silico* ou *in vitro* antes do começo dos estudos animais. Para a redução do número de animais: os estudos devem ser cientificamente robustos, a variabilidade experimental reduzida, o excesso de reprodução minimizado e a amostragem em série em cada animal deve ser uma opção. No aperfeiçoamento dos métodos é preciso: otimizar a previsão de efeitos adversos, fornecer os animais num ambiente apropriado, realizar estudos piloto com linhas celulares tumorais, executar exames *post mortem*, monitorizar o tumor recorrendo a métodos de imagem e partilhar informações dos procedimentos experimentais (Workman et al., 2010).

As *guidelines ARRIVE* promovem a melhoria da comunicação dos animais usados na investigação à comunidade científica, guiam os autores acerca das informações relevantes a incorporar numa redação científica, promovem informação reprodutível e precisa, acomodam uma gama vasta de áreas de investigação e protocolos experimentais (Kilkenny et al., 2010).

## 3. MODELOS TUMORAIS

---

Os estudos pré-clínicos podem ser divididos em duas categorias: os que recorrem ao transplante de células tumorais ou aqueles em que os tumores aparecem ou são induzidos no hospedeiro (Workman et al., 2010).

Mais recentemente, foram desenvolvidos modelos mais sofisticados de cancro que conseguem mimetizar várias características genéticas e biológicas da doença, embora o meio envolvente genético do hospedeiro possa afetar a incidência do tumor. Neste momento, existe uma grande variedade de tecnologias que permitem a indução da expressão de oncogenes ou a inativação de genes supressores de tumores *in vivo* (Workman *et al.*, 2010).

Ainda não foi totalmente estabelecido o valor preditivo de nenhum modelo. A caracterização molecular de todos os tumores é necessária para sustentar a escolha do modelo. A caracterização molecular do tumor pode ser feita por sequenciação do DNA, avaliação da expressão do RNA (ácido ribonucleico), determinações proteômicas ou por imunohistoquímica. Estudos têm demonstrado que, em certas ocasiões, a expressão de genes ao nível do mRNA pode não fornecer informação credível sobre a abundância de proteínas nos tumores, sendo as análises genómicas e proteômicas capazes de facultar informação mais verosímil para o desenvolvimento de terapêuticas dirigidas. Novas tecnologias de análise molecular das células tumorais circulantes e do DNA tumoral circulante oferecem a possibilidade de perfis mutacionais repetidos ao longo do tempo, a partir de pequenas amostras de sangue. Assim sendo, os efeitos de heterogeneidade intratumoral podem ser minimizados (Doroshov e Kummar, 2014).

### 3.1. Conceito de Modelo Animal

A palavra animal deriva do latim “*animal*” que significa alma/espírito, descreve organismos vivos que são *animados*. Um modelo é um *objeto de imitação*. Assim, combinando as duas definições, um modelo animal é um *objeto de imitação animado*, usado para investigar uma dada circunstância fisiológica ou patológica (Michael S. Rand, 2008).

O Comité de Investigação Nacional dos Estados Unidos em Modelos Animais para Investigação em Envelhecimento definiu o termo “modelo animal” como “um animal que pode ser estudado do ponto de vista biológico ou comportamental, ou no qual pode ser investigado um processo patológico induzido ou espontâneo, e cujo fenómeno é semelhante ao mesmo fenómeno nos humanos ou noutras espécies animais num ou mais fatores” (Michael S. Rand, 2008).

Os modelos murinos são importantes para compreender os mecanismos moleculares envolvidos na oncogénese, no entanto, a falta de heterogeneidade tumoral é uma limitação na transição da evidência científica dos murganhos para a doença nos humanos. Para contrariar esta limitação, tem sido efetuado um esforço para incluir o uso de modelos de

murganho na medicina personalizada através de *Co-Clinical Trials* e “*Mouse Avatars*” (Mouse e Therapy, 2015).

Estes modelos necessitam de originar material adequado para realização de várias análises moleculares, incluindo a seleção das experiências para determinar o impacto dos *screenings* do genoma e das bibliotecas de fármacos (Lodhia *et al.*, 2015).

Os modelos murinos pré-clínicos de cancro, incluem murganhos xenotransplantados, geneticamente modificados e singeneicos, desenvolvidos como meio de estudo do desenvolvimento e progressão da doença. Estes modelos permitem um melhor entendimento da etiologia e disseminação do cancro para ultrapassar as barreiras da deteção precoce e resistência à quimioterapia padrão (Murphy, 2015).

A utilização de linhas celulares tumorais fornece informação biológica que auxilia a validação de alvos hipotéticos, incluindo aqueles que foram identificados por análise molecular. Os sistemas de cultura celular não são suficientes para proceder à validação dos modelos e têm falhado em prever corretamente respostas clínicas. A seleção durante a cultura tecidual, pode erradicar características do tumor do hospedeiro, que são importantes para a replicação e podem ativar vias de sinalização celular. As linhas celulares tumorais demonstram uma baixa fidelidade aos complexos genéticos e anormalidades epigenéticas existentes nos tumores humanos, bem como a falta da influência do sistema imunitário e do estroma do microambiente tumoral humano, culminando em respostas terapêuticas inconsistentes e baixa correlação com os *outcomes* clínicos (Lodhia *et al.*, 2015).

### 3.2. Tipo de Modelos de Animais

Os modelos animais podem ser divididos em categorias consoante o tipo de investigação em que estão envolvidos.

Os animais que são utilizados para estudar sistemas funcionais e biológicos em humanos podem ser divididos nas seguintes categorias: *exploratórios* (compreensão dos mecanismos biológicos fundamentais), *explanatórios* (compreensão dos problemas biológicos complexos) e *predictivos* (descoberta e quantificação do impacto dos tratamentos que se encontram em fase de investigação) (Michael S. Rand, 2008).

Os animais que são utilizados na investigação de uma doença, podem ser divididos em *induzidos* ou *experimentais* (animais saudáveis que são modificados experimentalmente através de intervenções cirúrgicas, alterações genéticas ou injeções químicas), *espontâneos* (variantes genéticas que mimetizam a doença nos humanos), *transgênicos* (modelos induzidos em que se verifica a inserção ou deleção/”*knockout*” de DNA do genoma do animal), *negativos* (não

reagem à doença ou estímulo químico e são utilizados para estudar mecanismos de resistência) e *órfãos* (o modelo animal desenvolve uma doença, mas não corresponde à doença que surge no humano) (Michael S. Rand, 2008).

### 3.2.1. *Caenorhabditis Elegans*

O *Caenorhabditis elegans* é um nematode de solo, pertencente ao grupo dos metazoários. Foi o primeiro metazoário a ter o seu genoma sequenciado. O *C. elegans* apresenta propriedades que permitem a sua utilização na investigação do cancro, uma vez que tem uma linhagem de células estaminais completamente caracterizada, facilitando a análise de fenótipos que interrompem a proliferação normal. O facto de permanecer transparente durante todos os estádios de desenvolvimento, permite a visualização direta das células. Para além disso, este organismo conserva cerca de 60 a 80% de genes humanos e muitos processos biológicos (apoptose, sinalização celular, polaridade celular, metabolismo, envelhecimento). Tanto a genética direta como a inversa, encontram-se bem estabelecidas, o que permite a análise das vias genéticas (Kyriakakis, Markaki e Tavernarakis, 2015).

O *C. elegans* é útil para avaliar rapidamente o impacto funcional de mutações genéticas específicas no desenvolvimento de um tumor e o seu resultado a nível do organismo, bem como para a realização de *screenings* de novos fármacos para o cancro. Também, pode desempenhar um papel, na elucidação dos mecanismos celulares e moleculares que se verificam durante a tumorigénese (Kyriakakis, Markaki e Tavernarakis, 2015).

### 3.2.2. *Mosca da Fruta (Drosophila Melanogaster)*

A mosca da fruta tem um ciclo de vida rápido e passa por quatro estádios (embrião, larva, pupa, adulto). A mosca da fruta foi o primeiro organismo complexo a ter o seu genoma sequenciado. Cerca de 75% dos genes associados a doenças em humanos têm funções semelhantes na mosca. Os estudos são rápidos em relação aos que recorrem a mamíferos, e o custo de manutenção das moscas da fruta é baixo. No entanto, estes modelos, não são capazes de modelar certos processos biológicos mais complexos e doenças humanas multifatoriais (Pandey e Nichols, 2011).

Coloca-se agora uma questão: “Como é que administramos os fármacos?”. No caso dos embriões, a administração é por permeabilização. Nas larvas, utiliza-se um meio sólido para

longas exposições ou uma solução diluída de pasta de leveduras para exposições curtas. Nos organismos adultos, existem vários tipos de administração (por inalação, ingestão de alimentos, injeção abdominal, entre outros) (Pandey e Nichols, 2011).

Muitos dos câncros que aparecem em humanos derivam de células epiteliais. Existem alguns modelos de *Drosophila melanogaster* que têm sido desenvolvidos para estudar este tipo de cancro. Estes modelos incluem não apenas fenótipos proliferativos, mas também fenótipos metastáticos e invasivos. O desafio consiste no desenvolvimento de *screenings* de alta resolução efetivos que permitam a identificação de agentes capazes de prevenir ou inibir a proliferação e metastização (Pandey e Nichols, 2011).

### 3.2.3. Peixe-Zebra (*Danio Rerio*)

O peixe-zebra como modelo vertebrado apresenta várias vantagens no conhecimento dos mecanismos moleculares da doença nos humanos, estes modelos são muito informativos em estudos que investigam processos de desenvolvimento devido à existência de embriões transparentes, que se tornam maduros fora da mãe. Para além disso, o desenvolvimento embrionário é rápido, apresenta alguns órgãos homólogos aos dos doentes, o sistema imunitário é completo, há facilidade de administração e o custo de manutenção dos animais é baixo. No entanto, também apresenta algumas limitações, uma vez que as tecnologias existentes para análises genéticas não são tão avançadas como as existentes para a mosca e verme. Requer mais infraestruturas e um custo de manutenção mais elevado em comparação à mosca e verme (Phillips e Westerfield, 2014).

O adenocarcinoma pancreático, é um tumor sólido do pâncreas exócrino com mau prognóstico, cuja incidência tem aumentado. A doença é provocada por mutações pontuais do oncogene KRAS (em inglês, *Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*) que evolui para um carcinoma metastático extremamente agressivo devido a mutações genéticas secundárias e expressões desreguladas de genes envolvidos em vias de sinalização específicas. Para compreender os efeitos do KRAS na progressão do cancro pancreático, criou-se um modelo de peixe-zebra com adenocarcinoma pancreático em que a expressão eGFP-KRAS foi feita, essencialmente, pelo tecido pancreático. Posteriormente, foram seguidas as atividades do TGF $\beta$ , Notch, Bmp e Shh durante o desenvolvimento tumoral. Deste estudo, concluíram que os TGF $\beta$ , Notch, Bmp e Shh estão envolvidos na carcinogénese. Assim, este modelo fornece uma ferramenta poderosa para observar *in vivo* a dinâmica da tumorigénese e fazer o *screening* de moléculas candidatas a fármacos (Phillips e Westerfield, 2014).

Existem outros modelos que também podem ser utilizados na investigação de cancro: cão, chimpanzés, galinha, porco, entre outros. No entanto, estes modelos são usados em menor escala. Definitivamente, os modelos mais utilizados são os modelos de murganho.

### 3.2.4. Modelos de Murganho

Para a seleção do modelo de murganho apropriado existem várias plataformas que podem fornecer informação útil. A *PubMed* oferece termos de procura denominados *MeSH terms* que permitem identificar modelos e estirpes. Existem outros recursos como os seguintes apresentados: *Mouse Biology Program*, *Trans-NIH Mouse Genomics and Genetics Resources Coordinating Group Knockout Mouse Project*, *Mouse Phenome Database*, *Mouse Genome Informatics* e *Mouse Tumor Biology*. Estas bases de dados são compêndios *online* de modelos de murganho utilizados em investigação (Wood e Hart, 2008).

Os modelos de murganho para investigação de cancro podem ser hierarquizados em diferentes estádios de desenvolvimento. A primeira geração envolve modelos que recorrem a xenotransplantes ou transplantes singeneicos. Estes transplantes podem ser efetuados por duas vias: via subcutânea ou via ortotópica. A segunda geração de modelos de murganho compreende os modelos de murganho geneticamente modificados (GEMMs, em inglês *genetically engineered mouse models*), que permitem a expressão de oncogenes ou a inativação de supressores tumorais. A terceira geração permite o controlo temporal e espacial da expressão de mutações oncogénicas (modelos transgénicos avançados). A quarta geração é marcada pelo aparecimento de modelos com xenoenxerto de tumor do doente (PDX, em inglês *patient-derived xenograft*), que possibilitam o desenvolvimento espontâneo do tumor. A quinta geração, passará pela otimização de modelos da terceira e quarta geração para mimetizar a progressão metástica, e, pela utilização de modelos tumorais de alto rendimento para validação de alvos moleculares (CRISPR/Cas9, TALEN) (Stein *et al.*, 2014).

#### 3.2.4.1 Modelos Singeneicos

Os modelos de tumor singeneicos são modelos cujo background genético é semelhante ao do animal hospedeiro. Tendo em conta, que estes modelos apresentam um sistema imunitário (SI) intacto, podem ser úteis nos estudos de imunoterapias e para testar fármacos cujo alvo é o microambiente tumoral. A não rejeição do transplante pelo sistema imunitário do hospedeiro, permite a monitorização de modificações nos tecidos. As principais

vantagens são: baixo custo e elevada reprodutibilidade, crescimento em hospedeiros imunocompetentes, abrangência de vários tipos de tumores, não são imunogênicos, apresentam um longo historial de uso e uma rápida disponibilidade de hospedeiros. As principais desvantagens são o facto de as células tumorais serem de murganho, e, por isso, podem não refletir a doença humana. Normalmente, são agressivos e apresentam um crescimento rápido (Murphy, 2015).

O SI tem um elevado potencial para a destruição específica de tumores sem toxicidade nos tecidos normais e previne a recorrência do cancro devido à memória a longo prazo. Os tumores são reconhecidos pelo SI e o seu desenvolvimento termina ou é controlado a longo prazo por um processo designado por imunovigilância. O problema reside na capacidade que as células tumorais têm de se modificarem, conseguindo escapar ao SI e, conseqüentemente, tornarem-se um alvo fraco. Para ultrapassar esta questão, desenvolveram-se inibidores “*checkpoint*”. Estes fármacos bloqueiam as moléculas que inativam as células imunitárias, promovendo a sua ativação (Murphy, 2015).

### **3.2.4.2 Modelos de Murganho Xenotransplantados**

Os modelos de murganho xenotransplantados são obtidos a partir do transplante subcutâneo ou ortotópico de linhas celulares tumorais humanas num murganho imunodeprimido. As principais vantagens associadas ao uso destes modelos são: utilização de células tumorais humanas, reprodutibilidade, longa história de uso, hospedeiros rapidamente disponíveis, número estatisticamente significativo de murganhos que podem ser usados nos estudos, disponibilidade de uma ampla variedade de linhas tumorais. Algumas desvantagens compreendem: maior custo relativamente aos modelos singeneicos, o estroma dos tumores é murino, linhas tumorais desenvolvidas com tecnologias recentes, os tumores crescem frequentemente em locais não naturais (inoculação subcutânea), ausência de resposta imunitária. Estes modelos não têm timo, apresentando uma resposta por parte das células T limitada. Por vezes, apresentam uma fraca resposta de células B e T (imunodeficiência combinada severa). Sabendo que nos seres humanos, o SI pode desenvolver uma resposta imunitária contra o tumor, estes modelos não reproduzem fielmente a progressão da doença e a resposta terapêutica observada nos indivíduos imunocompetentes. Este aspeto necessita de ser melhorado, pois constitui uma barreira à obtenção de resultados fidedignos e representativos do que acontece no doente (Murphy, 2015).

Os modelos xenotransplantados ortotopicamente são muito mais utilizados que os modelos xenotransplantados subcutaneamente. Isto deve-se à hipotética perda do microambiente tumoral e a diferenças do sistema imunitário inato e adaptativo que se verificam nos modelos xenotransplantados subcutaneamente, que, por vezes, culminam num padrão de progressão da doença diferente do que se verifica nos doentes. No entanto, são modelos que apresentam facilidade de administração (Lodhia *et al.*, 2015).

### **3.2.4.3 Modelos de Murganho Geneticamente Modificados (GEMMS)**

Para mimetizar as alterações encontradas nos tumores humanos, o perfil genético dos GEMMs é alterado (um ou mais genes são mutados, eliminados ou sobreexpressos). O cancro aparece espontaneamente no murganho imunocompetente (Richmond e Su, 2008) .

Os murganhos devem apresentar o mesmo perfil mutacional que os doentes. Estes modelos são úteis para avaliar os efeitos de uma mutação, deleção ou inserção de um ou mais genes durante a progressão tumoral no modelo de murganho. Também podem ser utilizados para estudar os mecanismos de resistência. No entanto, estes modelos não conseguem reproduzir a complexidade genética encontrada nos tumores humanos. A resposta à terapêutica pode ser avaliada através do efeito na taxa de crescimento do tumor (mais preditivo), efeito na redução do tumor e sobrevivência (Richmond e Su, 2008).

Os GEMMs constituem uma alternativa promissora aos modelos xenotransplantados para estudos biológicos e terapêuticos. Os GEMMs têm sido desenvolvidos para vários tipos de tumores, nomeadamente, cancro da próstata, mama, colon e pancreático. Consistem na introdução de mutações genéticas associadas a um dado tipo de cancro. Estes genes mutantes podem resultar de um ganho de função dos oncogenes ou de uma perda de função dos supressores tumorais expressos nos modelos de murganho. Estas mutações genéticas ocorrem no tecido que é relevante para o tipo de tumor que se pretende estudar. Assim, o início e progressão do tumor ocorrem no tipo de célula adequado e num microambiente relevante (as células tumorais estão rodeadas por células normais à semelhança do que se verifica nos humanos) (Gopinathan e Tuveson, 2008).

São caracterizados pela produção de tumores com um compartimento com estroma bem desenvolvido. O estroma consiste em proteínas de matriz extracelulares, como o colagénio (responsáveis pela rigidez dos tumores) e um número de diferentes tipos celulares são recrutados durante o desenvolvimento tumoral (fibroblastos, células do sistema imunitário). Deste modo, as interações entre o tumor e o microambiente podem ser avaliadas. Nos

estudos pré-clínicos, é importante estabelecer o efeito dos fármacos no microambiente tumoral e o papel do SI na resposta às terapêuticas implementadas. Os GEMMs podem ser utilizados no estudo dos efeitos das imunoterapias. A monitorização do tumor pode ser feita recorrendo a técnicas de imagem de ressonância magnética, tomografia computadorizada, sonografia e métodos que permitam investigar a perfusão nos tecidos ou metabolismo (Gopinathan e Tuveson, 2008).

As vantagens dos GEMMs são: utilização de modelos de murganho imunocompetentes, as mutações genéticas que se observam nos doentes podem ser reproduzidas no modelo animal no tecido alvo (obtenção de um tumor primário heterogéneo e policlonal), os estádios de progressão podem ser estudados, desenvolvimento de várias abordagens terapêuticas para vários estádios de desenvolvimento do tumor. As principais desvantagens compreendem a elevada complexidade do tumor humano que não pode ser completamente mimetizada no modelo animal (tem como alvos um número limitado de genes), os tumores dos murganhos não são de origem humana (permitem apenas prever o que vai acontecer no tumor do doente), o desenvolvimento tumoral é lento e variável (Richmond e Su, 2008).

#### **3.2.4.4 Modelos de Murganho com Xenoenxerto Derivado do Doente (PDX)**

Uma porção do tumor do doente é extraída por ressecação cirúrgica ou biópsia, e transplantada (subcutaneamente ou ortotopicamente) num murganho imunodeprimido. Posteriormente, ocorre propagação sem manipulação *in vitro*. Existem várias gerações de murganhos. A geração de murganhos imunodeprimidos que irá ser alvo de implantação do tumor é designada como  $F_0$  ou  $G_0$ . As gerações subsequentes são denominadas de  $F_1, F_2...F_n$  ou  $G_1, G_2...G_n$ . Quando se pretendem fazer estudos com fármacos, geralmente, recorre-se à terceira geração de murganhos ( $F_3$  ou  $G_3$ ). A aplicação deste conceito num estudo de eficácia e segurança designa-se “*xenopatient trial*” (Mouse e Therapy, 2015).

Os modelos PDX vieram preencher a lacuna que existia entre os estudos *in vitro* e os ensaios clínicos em doentes. Estes modelos apresentam-se histológica e geneticamente semelhantes ao seu doador. São ferramentas que permitem prever os *outcomes* clínicos e estão a ser usados para avaliar os fármacos, identificar biomarcadores, estudos biológicos e estudos de medicina personalizada (Lodhia *et al.*, 2015).

Os biomarcadores preditivos da resposta a fármacos podem ser usados para estratificar a população de doentes, permitindo uma terapêutica personalizada que elimina o uso de

agentes ineficientes ou tóxicos. Um exemplo, trata a ativação da via de sinalização Wnt como biomarcador da resistência à terapêutica com o fármaco AZD6244 para tratamento do cancro coloretal provocado pelo oncogene *KRAS* mutado (Mouse e Therapy, 2015).

A quimioterapia é amplamente usada para tratar uma grande variedade de cancros. Os fármacos com platina (cisplatina e carboplatina) ligam-se ao DNA, formando aductos que interferem com o processo de replicação e tradução. Tendo em conta, que alguns doentes são resistentes ao uso de platina, é importante aferir, o mais cedo possível, a sensibilidade às terapêuticas com platina e identificar terapêuticas alternativas. Deste modo, os “*Avatars*” surgem como ferramentas preditivas da sensibilidade dos doentes à platina, possibilitando a estratificação dos doentes consoante a sua sensibilidade à platina e a respetiva adaptação do tratamento ao doente. O recurso a “*Avatars*” em conjunto com a análise da sequenciação completa do exoma também, é utilizada, para avaliar o melhor tratamento a utilizar em doentes com tumores sólidos em estádios avançados. Os PDX/”*Avatars*” podem ser obtidos a partir de amostras de tumores extraídos através de uma autópsia. O objetivo é a obtenção de várias biópsias de vários locais metastizados de um doente aquando da falha do tratamento, e, posteriormente, comparação das diferenças entre amostras. No entanto, não é economicamente viável a transplantação de todas as amostras, havendo a necessidade de fazer uma comparação das amostras e aferir quais serão transplantadas no modelo animal. Existem vários estudos que reportam que os *outcomes* de um modelo PDX, quando comparados com a resposta do doente ao tratamento, sugerem que a questão da heterogeneidade tumoral não assume um papel tão importante no primeiro diagnóstico (Lodhia *et al.*, 2015).

Existem correntes de opinião, que acreditam que a comercialização destes modelos seria fundamental para acelerar a investigação do cancro, através da redução do tempo e recursos necessários para gerar os modelos xenotransplantados. Deste modo, estes modelos obtidos comercialmente, iriam beneficiar, não só os investigadores, mas seriam um recurso para a indústria farmacêutica para estudos na fase pré-clínica (Mouse e Therapy, 2015).

A conceção destes modelos, apresenta algumas limitações que têm de ser ultrapassadas. As principais limitações decorrentes do desenvolvimento destes modelos são as seguintes: o enxerto do tumor do doente pode ser rejeitado pelo modelo de murganho; a implantação do tumor não reflete integralmente o microambiente tumoral; a metastização pode não ser observada em modelos PDX xenotransplantados subcutaneamente; existência de vários fatores que provocam a propagação do tumor (podem não refletir o que acontece no doente); a ocorrência de resultados distintos nas estirpes de murganhos usados; a evolução

natural dos tumores nos humanos. O elevado custo relacionado com a manutenção destes modelos torna-se um fator condicionante da sua utilização (Mouse e Therapy, 2015).

Por outro lado, existem estratégias para otimizar os resultados obtidos nos estudos envolvendo estes modelos. A mimetização do microambiente tumoral humano no modelo xenotransplantado pode ser feita por injeção de componentes que não são comuns aos dois, fazendo com o que o crescimento tumoral seja o mais representativo possível do que se verifica no doente. A utilização de murganhos humanizados trata-se de outra estratégia. Os murganhos humanizados possuem um sistema imunitário intacto, o que permite uma melhor caracterização do microambiente tumoral e o estudo de agentes imunomoduladores usados na quimioterapia. O recurso a estudos de farmacocinética e farmacodinâmica dos fármacos permitem a extrapolação dos resultados obtidos nos estudos com modelos de murganho para a clínica (Mouse e Therapy, 2015).

As principais vantagens são: utilização de tecido tumoral humano (potencia o desenvolvimento de estratégias moleculares individualizadas), resultados rapidamente obtidos, estudo de várias terapêuticas a partir da mesma biópsia tumoral, possibilidade de implementação do xenoenxerto no órgão alvo e introdução de estroma do microambiente tumoral humano. Os modelos de murganho imunodeprimidos, diabéticos não obesos, que tenham sido humanizados por injeção de sangue periférico ou células da medula óssea, permitem a reconstituição quase completa da resposta imunitária ao tumor. As desvantagens são o facto de estes modelos serem caros, tecnicamente desafiantes e não conseguirem mimetizar na totalidade o SI (Richmond e Su, 2008).

Os “*Avatars*” referem-se a modelos experimentais, cujo objetivo é identificar a melhor opção terapêutica para um determinado doente com cancro. Os “*Avatars*” são tratados com regimes de quimioterapia diferentes (monoterapia ou associações) para aferir qual o regime mais efetivo no tratamento do cancro daquele doente. Este processo demora alguns meses, se ocorrer metastização no doente, o oncologista tendo em conta os resultados obtidos com os “*Avatars*”, faz a escolha mais correta para o doente (Lodhia *et al.*, 2015).

#### 3.2.4.5 “*Super-Avatars*”

Os “*Super-Avatars*” referem-se a modelos que derivam da co-transplantação de células estaminais hematopoiéticas (células indiferenciadas) e do tumor do doente, por via ortotópica, permitindo o estudo de imunoterapias. Este processo depende do isolamento das células estaminais hematopoiéticas e da estirpe do modelo animal. Caracterizam-se pela

capacidade das células estaminais repovoarem todas as linhagens hematopoiéticas *in vivo* e a sustentação destas células ocorre durante toda a vida (Lodhia *et al.*, 2015).

Há necessidade de desenvolver modelos que permitam a caracterização das interações entre o sistema imunitário e as células tumorais no microambiente tumoral, para compreender melhor a forma como o sistema imunitário reconhece as células tumorais e protege o organismo contra o crescimento do tumor e metastização. Este conhecimento é necessário para desenvolver imunoterapias que potenciem a capacidade do sistema imunitário localizar e atacar as células tumorais (Lodhia *et al.*, 2015).

### 3.3. Escolha do Modelo de Animal Ideal

Bernard Rollin dizia “*The most brilliant design, the most elegant procedures, the purest reagents, along with investigator talent, public money, and animal life are all wasted if the choice of animal is incorrect.*” É praticamente impossível estabelecer regras para a escolha do modelo mais apropriado, uma vez que existem muitos fatores que devem ser equacionados, mas podem ser estabelecidas algumas gerais. Assim sendo, devem ser ponderados os fatores relacionados com a investigação e com o bem-estar do animal (Michael S. Rand, 2008).

No que diz respeito à investigação, é preciso avaliar os seguintes pontos: adequabilidade (assegurar que o órgão em estudo tem uma função semelhante nas espécies alvo), transferibilidade da informação (entenda-se, por exemplo, que os resultados de um estudo num grupo de organismos possam ser extrapolados para outro grupo que partilha várias características semelhantes), generalização dos resultados para as espécies-alvo, implicações éticas, quantidade necessária para obtenção de validade científica, existência de conhecimento sobre o problema em questão, avaliação dos modelos naturais face a modelos produzidos experimentalmente (Michael S. Rand, 2008).

Quanto aos fatores relativos ao bem-estar do animal estar relacionados com o cuidado dos animais (custo, disponibilidade, instalações, fatores de *stress*), fatores físicos e químicos (componentes perigosos, influência do meio ambiente) e com os próprios animais (aspetos genéticos esperança de vida, idade, sexo, capacidade de reprodução, doenças, propriedades biológicas) (Michael S. Rand, 2008).

Na escolha do modelo animal a utilizar na fase pré-clínica, o primeiro fator a ter em conta corresponde à configuração molecular e celular do alvo para o qual o fármaco se encontra a ser desenvolvido (Thakur, Pryer e Singh, 2014).

Para a escolha apropriada do modelo de murganho para a fase pré-clínica é preciso avaliar os compartimentos do tumor, interações do estroma, evolução da doença e processo de metastização (este último, apenas quando aplicável) (Thakur, Pryer e Singh, 2014).

## 4. VALIDAÇÃO DO MODELO PRÉ-CLÍNICO

---

Os modelos animais podem ser validados tendo em conta um número diferente de critérios: a similaridade biológica e sintomatológica entre o modelo animal e a doença humana, o valor preditivo do modelo (demonstrar que as intervenções clínicas efetivas têm um efeito semelhante no modelo) e o alvo (o alvo do modelo animal deve ter a mesma função que no humano). É necessária a adaptação da modelo à situação em causa. Sams-Dodd propôs um sistema de pontuação de validação do modelo. Este modelo usa cinco critérios: espécies, complexidade (quanto mais complexo o sistema, maior é a probabilidade de incluir mecanismos relevantes), simulação da doença, previsibilidade, comparação dos sintomas da doença. Este sistema de pontuação surge como uma espécie de algoritmo decisional para ajudar na escolha do modelo (Denayer, Stöhr e Roy, 2014).

## 5. METASTIZAÇÃO

---

A maior parte dos modelos usados nos estudos pré-clínicos não envolvem tumores que tenham sido expostos a outra terapêutica, sendo que muitos dos ensaios clínicos de fase I e II incluem doentes que já foram sujeitos a um ou mais tratamentos e cujos tumores se tornaram refratários. No entanto, como os modelos PDX foram obtidos a partir do transplante de uma porção do tumor do doente, é preciso saber se os doentes já foram ou não sujeitos a terapêuticas para o cancro. Estes modelos falham na previsão dos resultados dos ensaios de fase I, II e III de doentes com doença metastizada em vários órgãos (Francia *et al.*, 2011).

Os modelos singeneicos consistem na inoculação de células murinas num modelo de murganho com o mesmo *background* genético. Uma vez que o modelo singeneico apresenta o SI intacto, é possível estudar a influência do microambiente tumoral e a resposta do SI ao

processo de tumorigênese e metastização. Por outro lado, como as linhas celulares foram obtidas a partir de murganhos, isto culmina numa maior falta de heterogeneidade tumoral no organismo hospedeiro relativamente ao observado nos doentes (Saxena e Christofori, 2013).

Os modelos xenotransplantados correspondem à inoculação de células humanas num hospedeiro murino imunodeprimido. A maior vantagem deste sistema é que permite a reconstituição da metástase humana num modelo de murganho. No entanto, para evitar a rejeição do material transplantado o SI tem de estar suprimido. Deste modo, não é possível aferir a contribuição do SI na progressão da metastização (Saxena e Christofori, 2013).

Foram criados novos modelos que podem desenvolver doença metástica visceral espontânea e avançada através de transplantes de linhas celulares tumorais humanas. A transplantação ortotópica de tumores aumenta a possibilidade de dispersão da doença metástica em comparação à transplantação subcutânea, e podem ser obtidas múltiplas metástases. Assim, há um prolongamento da sobrevivência e tempo suficiente para que ocorra a disseminação do tumor primário em metástases estabelecidas, recreando as fases sequenciais associadas à cascata de metastização. O processo metástico pode ser monitorizado se as células forem marcadas com marcadores moleculares como a luciferase (Francia *et al.*, 2011).

A cascata de sinalização compreende o crescimento dos tumores primários, invasão de tecidos e provável libertação de células tumorais para a corrente sanguínea. Estas células tumorais circulam na corrente sanguínea e colonizam órgãos distantes, com consequente crescimento nos locais secundários constituindo a doença metástica (Francia *et al.*, 2011).

Os modelos animais podem desenvolver metástases experimentais ou espontâneas. No caso das metástases experimentais, é transplantado um número controlado de células, o desenvolvimento da doença metástica é rápido, existem linhas celulares de vários tipos de tumores disponíveis e a doença metástica pode ser desenvolvida em locais específicos. No entanto, as metástases são geradas apenas num tecido, as linhas celulares são isoladas através de várias passagens, a administração é feita por uma via artificial e a monitorização só pode ser feita após a ocorrência de extravasão (Francia *et al.*, 2011).

Nas metástases espontâneas, o processo de metastização ocorre de forma mais natural, o modelo pode ser monitorizado em todas as etapas da cascata de metastização, não são necessárias muitas passagens para isolar as células altamente metastizadas e assemelham-se bastante à doença humana. Porém, é necessário um maior período de tempo para a doença se tornar evidente, existe um número limitado de modelos, a doença metástica não está confinada a um local e o desenvolvimento da doença metástica é assíncrono. Uma

descoberta surpreendente, foi o facto de as metástases espontâneas avançadas responderem a fármacos, que se mostraram inefetivos no tratamento do tumor primário (Francia *et al.*, 2011).

O modelo de murganho ideal deveria apresentar características histológicas e fisiológicas semelhantes, as mutações deveriam ser iguais e o processo de metastização análogo ao que se verifica nos humanos. A resposta às terapêuticas instituídas deveria ser comparável à resposta humana. O fenótipo canceroso deveria ser rapidamente reprodutível. Este modelo também deveria permitir o estudo de regimes terapêuticos. Desta forma, com um pequeno número de animais, mas estatisticamente significativos, seria possível a obtenção de informação acerca das contribuições dos genes, do microambiente tumoral e das células imunitárias na progressão metástica (Saxena e Christofori, 2013).

No entanto, alguns autores defendem que nenhum modelo conseguirá recapitular completamente todos os aspetos da doença humana. Isto deve-se a alguns aspetos relacionados com o modelo animal: esperança de vida pequena, diferente composição de elementos do estroma, metabolismo de xenobióticos, taxas de mutação distintas, capacidade de biotransformação (Saxena e Christofori, 2013).

## 6. LIMITAÇÕES DOS MODELOS ANIMAIS NA INVESTIGAÇÃO DO CANCRO

---

Os murganhos são os modelos mais usados, mas são modelos pobres para a maioria das doenças humanas. Existem diferenças cruciais a nível genético, molecular, imunológico e celular, que introduzem vieses nos estudos. A falha na transposição de animais para doentes deve-se em grande parte a uma metodologia pouco apropriada e ao facto do modelo não conseguir mimetizar fielmente a doença humana (Mak, Evaniew e Ghert, 2014).

Existem alguns casos que exemplificam o insucesso de alguns ensaios clínicos, que ocorreram após a obtenção de bons resultados com modelos animais na fase pré-clínica. Um caso muito conhecido foi o ensaio TGN1412. O fármaco TGN1412, descrito como anticorpo monoclonal anti-CD28 para o tratamento de doenças imunológicas, como a esclerose múltipla, artrite reumatoide e alguns tipos de cancro. Antes de se chegar à fase de ensaio clínico, o fármaco foi testado em vários modelos animais, incluindo o modelo de murganho, para assegurar a segurança e efetividade nos modelos animais. Estes testes demonstraram que doses cem vezes superiores às administradas nos doentes, não

provocavam qualquer tipo de reação tóxica. No entanto, quando se chegou à fase de ensaio clínico nos doentes, o fármaco provocou uma falha nos órgãos generalizada catastrófica. É de salientar, que isto se verificou com a administração de uma dose subclínica, cerca de quinhentas vezes inferior à administrada nos modelos animais (Mak, Evaniew e Ghert, 2014).

Recentemente, um ensaio clínico de fase II do saridegib para o tratamento do condrossarcoma foi interrompido precocemente. O saridegib atuava por antagonismo da via *Hedgehog*, que se encontra desregulada nos tumores sólidos e fornece sinais chave de crescimento e de sobrevivência às células tumorais. Os modelos de murganho, usados na fase pré-clínica, com um tumor sólido cerebral maligno responderam muito bem ao fármaco, tendo apresentado um aumento de cinco vezes da sua sobrevivência. No entanto, no ensaio com doentes, o fármaco não apresentou nenhum benefício quando comparado com o placebo, e, por isso, o ensaio foi interrompido por inutilidade (Mak, Evaniew e Ghert, 2014).

As metaloproteinases de matriz são uma família de proteinases dependentes de zinco, envolvidas na degradação e remodelação das proteínas de matriz extracelulares e estão relacionadas com o processo tumorigénico (promovem a invasão tumoral e metastização). O cancro e artrite foram consideradas as primeiras indicações para a utilização de inibidores de metaloproteinases de matriz. Os resultados obtidos com modelos animais mostraram que estes tipos de inibidores são efetivos no tratamento do cancro e de outras doenças. Porém, vários ensaios clínicos falhados em humanos, reduziram o interesse na utilização de inibidores de metaloproteinases de matriz como opção terapêutica. Mais de cerca de dezasseis metaloproteinases de matriz passaram para a fase de ensaio clínico, mas apenas o hiclato de doxiclina foi aprovado para utilização na doença periodontal. Os problemas de segurança nos ensaios clínicos foram atribuídos a uma baixa seletividade das metaloproteinases de matriz, uma fraca validação do alvo e um baixo valor preditivo dos modelos animais usados nos estudos (Mak, Evaniew e Ghert, 2014).

Apesar da falta de sucesso na transposição dos modelos animais para os ensaios clínicos, os modelos animais continuam a ser os modelos mais utilizados para testar a segurança, toxicidade e efetividade de fármacos. Têm sido essenciais na investigação oncológica, devido às implicações práticas e éticas associadas à experimentação humana. No entanto, nos últimos anos a Agência Europeia do Medicamento e a FDA introduziram *guidelines* para realizar testes em humanos com utilização de “micro-doses” (dose inferior a um centésimo da dose terapêutica) de fármacos. Estes estudos “fase 0”, permitem recolher rapidamente resultados em humanos, permitindo o estudo da farmacocinética do fármaco e avaliar se o fármaco alcança o alvo molecular correto. Cerca de um quarto das moléculas que entram

em ensaio clínico falham devido a problemas farmacológicos como a falta de absorção ou penetração no órgão alvo (Mak, Evaniew e Ghert, 2014).

O Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos suspendeu todos os fundos para investigação biomédica e comportamental em chimpanzés após concluírem que era desnecessário. O Conselho de Investigação Nacional dos Estados Unidos recomenda a substituição de modelos animais por ensaios *in vitro* com linhas celulares humanas, modelos *in silico*. Torna-se urgente, a criação de modelos mais preditivos que permitam mimetizar melhor a doença humana e cujos resultados possam ser translacionados para ensaios clínicos, caso contrário, o futuro da utilização de modelos animais na investigação fundamental passará a estar em risco (Mak, Evaniew e Ghert, 2014).

## 7. CO-CLINICAL TRIAL PROJECT

---

Um “*co-clinical trial*” refere-se a ensaios que são efetuados, simultaneamente, nos GEMMs ou modelos xenotransplantados e nos humanos como parte dos ensaios de fase I/II para desenvolvimento de fármacos. O ensaio envolve a coleção, comparação e integração dos dados obtidos de análises feitas aos tumores murinos e dos doentes. Este projeto, tem como objetivo a integração de toda a informação recolhida a partir dos murganhos e doentes em *real-time*, permitindo decisões clínicas melhores e mais rápidas. Para além disso, traduz uma tentativa de preenchimento da lacuna existente entre a investigação académica e a indústria farmacêutica, que possibilita a aplicação dos dados obtidos com os modelos animais em ensaios com humanos. Os estudos de eficácia e segurança são realizados em modelos animais, e, posteriormente, em doentes (Mouse e Therapy, 2015).

Este conceito tem sido aplicado no cancro do pulmão e da próstata. O cancro do pulmão de células não pequenas apresenta um mau prognóstico. Neste sentido, foi conduzido um “*co-clinical trial*” para o oncogene mutado KRAS do cancro do pulmão, com recurso a GEMMs. Nos tumores, muitas vezes, ocorre a perda progressiva de supressores dos tumores como o p53 e o Lkb1 (em inglês, *Liver Kinase B1*), sendo interessante a análise da sua influência nos resultados de saúde obtidos. Este ensaio, teve como objetivo determinar se o selumetinib (inibidor da cascata de sinalização Ras) atua sinergicamente com o docetaxel (agente quimioterápico padrão). A sinergia verificou-se nos modelos de murganho com mutações apenas no oncogene KRAS e nos que tinham mutações KRAS e p53. Os murganhos com mutações KRAS e Lkb1, foram resistentes à combinação. Estes resultados foram aplicados aos doentes com sucesso (Mouse e Therapy, 2015).

Normalmente, o cancro da próstata avançado responde inicialmente à terapêutica de privação do androgénio por depleção da testosterona gonadal. Esta resposta, geralmente, é transitória e os tumores metásticos progridem como cancro da próstata resistente à castração. A progressão deste cancro, é acompanhada de um aumento da expressão de SRD5A1 (*3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 1*) face à SRD5A2 (*3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 2*). A síntese de dihidrotestosterona no cancro da próstata resistente à castração necessita da redução 5 $\alpha$ -testosterona. O aumento da expressão da SRD5A1 resulta da conversão da testosterona em dihidrotestosterona (Chang *et al.*, 2011).

Pandolfi desenhou um “*co-clinical trial*” para estudar a terapêutica de privação do androgénio no cancro da próstata. Para compreender as falhas associadas à terapêutica de privação do androgénio, utilizaram GEMMs com cancro da próstata resistente à castração. Com este estudo, foi possível concluir que a perda progressiva dos genes p53 e Zbtb7a foi responsável pelo desenvolvimento dos tumores refratários nos murganhos. Para além disso, identificaram o XAFI (*XIAP-associated factor 1*) e a SRD5A1 como biomarcadores de resposta à terapêutica de privação de androgénio. O XAFI é um inibidor da apoptose subregulado nos cancros da próstata resistentes à castração e a SRD5A1 é uma enzima sobrerregulada que catalisa a conversão da testosterona em dihidrotestosterona. A subregulação do XAFI e a sobrerregulação do SRD5A1 foram identificados como biomarcadores de baixa sensibilidade à terapêutica de privação do androgénio. Este estudo permitiu prever a utilidade dos inibidores de XIAP (*X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*) e SRD5A1 na sensibilização do cancro da próstata resistente à castração face à terapêutica de privação do androgénio (Mouse e Therapy, 2015).

Os “*Avatars*” têm sido usados no cancro do pâncreas e do pulmão de células não pequenas. No cancro do pulmão de células não pequenas, estes modelos foram utilizados para averiguar a efetividade de três agentes quimioterápicos de primeira linha, sendo que os doentes foram agrupados consoante a sensibilidade ou resistência aos tratamentos, tendo em conta que foi variável. Também, foram desenvolvidos trinta e dois modelos PDX para cancro da mama, representando uma grande variedade de subtipos de cancro da mama. Todos os modelos se apresentaram genomicamente consistentes com as amostras dos doentes e demonstraram respostas ao tratamento comparáveis tanto nos modelos PDX como nos doentes (Mouse e Therapy, 2015).

Atualmente, encontram-se a decorrer estudos em GEMMs para o glioblastoma humano. No glioblastoma humano, a via de sinalização PI3K/AKT/mTOR é sobrerregulada, hiperativa e associada a tumores de mau prognóstico. Os tumores murinos foram obtidos por sobreexpressão das plaquetas derivadas do recetor do fator de crescimento mediada por

um retrovírus. No Memorial Sloan Kettering Cancer Center, está a ser realizado “co-clinical trial” para estudar o efeito da combinação de um inibidor AKT e de um inibidor mTOR na supressão do crescimento tumoral. Deste modo, uma das estratégias para combater o glioblastoma pode passar pelo desenvolvimento de inibidores de múltiplos componentes da via PI3K/AKT/mTOR. Para poder ser estabelecida uma relação entre a resposta terapêutica e o PTEN (gene supressor do tumor, que se perde ou sofre mutações nos gliomas), os modelos tumorais foram gerados em meios com PTEN e sem PTEN. A combinação da perfosina (inibidor do AKT) e do CCI-779 (inibidor do mTOR) demonstrou suprimir o crescimento em culturas de glioma obtidas a partir de GEMMs, independentemente do estado PTEN (Mouse e Therapy, 2015).

A ampliação deste projeto à escala global apresenta alguns desafios. Desempenhando os GEMMs um papel fundamental nestes ensaios, é importante averiguar se a progressão oncogénica é semelhante nos doentes e murganhos, tendo em conta a sua esperança de vida. Para além disso, os tumores humanos acumulam muitas mutações ao longo do tempo. No entanto, como os GEMMs, normalmente, são criados com drivers mutations para um dado tipo de tumor, surge a necessidade de comparação das mutações observadas nos GEMMs e nos doentes. Em paralelo, o modelo de murganho deve mimetizar a progressão tumoral humana (metástase, angiogénese) e mudanças no microambiente. Todo este processo, requer uma estreita colaboração entre investigadores e médicos, bem como pessoal especializado (genética, biologia, oncologia médica, biologia do animal). Quando os GEMMs conseguirem mimetizar a doença humana, este projeto pode ser levado a cabo com sucesso (Mouse e Therapy, 2015).

A heterogeneidade tumoral dos doentes, toxicidade dos fármacos (os regimes de posologia diferentes), desenvolvimento de resistência aos fármacos, polimedicação, dietas e as diferenças interindividuais entre doentes são fatores causadores de vieses nos resultados. O uso de estratégias de medicina personalizada requer análises genéticas, proteicas e metabólicas para cada doente. Isto torna-se um problema, quando se pretende ampliar a sua utilização à população em geral, uma vez que, implicam um aumento do custo do diagnóstico e tratamento. No entanto, os avanços tecnológicos permitiram que o preço da sequenciação completa do genoma tenha baixado de três milhões de dólares para alguns milhares de dólares. Deste modo, para implementar com sucesso a medicina personalizada na clínica, é preciso melhorar os sistemas tecnológicos (Mouse e Therapy, 2015).

Em suma, esta estratégia permite o acesso simultâneo à resposta aos fármacos tanto no doente como no modelo animal (importante para estudos correlativos), a identificação de

biomarcadores de suscetibilidade e resistência, a investigação de novas terapêuticas para fazer face aos mecanismos de resistência emergentes.

## 8. MODELOS EMERGENTES

---

### 8.1. Sistemas de Edição do Genoma

Os animais geneticamente modificados que têm sido alterados para usar tecnologias dirigidas aos genes são usadas modelos experimentais para realizar análises funcionais ou vários testes em investigação biomédica. Os animais *knockout* permitem perceber as funções de genes específicos *in vivo*. Mais tarde, apareceram os modelos de murganho *knock-in*, em que os genes são adicionados ou modificados, ou de murganhos *knockout* com controlo espacial ou temporal de inativação génica. As tecnologias dirigidas aos genes tornaram-se ferramentas poderosas para compreender as funções dos genes, incluindo a base genética de doenças humanas (Whitelaw *et al.*, 2016).

A edição do genoma é feita com recurso a nucleases que clivam o DNA em locais específicos do genoma, que se designam *double-strand breaks* (DSBs). As DSBs podem ser reparadas por dois mecanismos: recombinação homóloga (HDR, em inglês *homology-directed repair*) ou recombinação não homóloga por união das extremidades (NHEJ, em inglês *non-homologous end joining*), que facilitam a criação de animais *knockout* e *knock-in*. Existem 4 grupos de sistemas de edição do genoma: meganucleases, *zinc finger nucleases* (ZFNs), *transcription activator-like effector nucleases* (TALEN), e *clustered regularly interspaced palindromic repeats* [CRISPR ou CRISPR-associated (*Cas*) *nuclease protein*] (Whitelaw *et al.*, 2016).

As ZFNs são proteínas muito comuns nos eucariotas. Estima-se que 1% dos genes dos mamíferos são codificados por proteínas *zinc finger* (ZF). Os ZFNs são sistemas de edição de genes de genoma que recorrem a proteínas de fusão que compreendem locais específicos nos domínios de ligação de DNA muito direcionados para o ZF, que se encontra fundido com um domínio da endonuclease de restrição da enzima FokI. Para clivar num local específico do genoma, ZFNs são concebidos como um par que reconhece duas sequências que atuam no local alvo, um a jusante e outro a montante na cadeia reversa (Gupta e Musunuru, 2014). Ocorre a ligação das ZNFs às sequências de DNA contrárias para facilitar a dimerização da FokI para catalisar a DSB no DNA alvo. A reparação do DNA pode ser

feita por recombinação homóloga ou recombinação não homóloga por união das extremidades (Mashimo, 2014). A tecnologia ZFN foi inicialmente desenvolvida para vários tipos de células de mamíferos, no entanto, mais tarde foi utilizada no nematode e no peixe-zebra (Gupta e Musunuru, 2014).

As *transcription activator-like effectors* (TALEs) são proteínas virulentas obtidas a partir da bactéria *Xanthomonas* e são injetadas nas células eucariotas do hospedeiro, onde funcionam como fatores de transcrição. As TALENs também se podem ligar e clivar o DNA em pares, pois apresentam um domínio com a endonuclease FokI. Assim sendo, tal como as ZFNs podem ser utilizadas no desenvolvimento de modelos de rato *knockout* ou *knock-in* (Gupta e Musunuru, 2014). Esta tecnologia tem sido utilizada em células somáticas pluripotentes, nematodes, plantas, peixe-zebra e ratos (Gupta e Musunuru, 2014).

O sistema CRISPR produz componentes de RNA, em conjunto com *CRISPR-associated Cas nuclease protein* (CRISPR/Cas). Em bactérias, o sistema CRISPR fornece imunidade adquirida contra DNA estranho por clivagem do DNA conduzida pelo RNA. O sistema CRISPR/Cas9, corta pequenos segmentos de DNA estranho, denominados “espaçadores” que são integrados no interior do *loci* genómico CRISPR e são transcritos e processados em pequenos RNA CRISPR (crRNAs). Os crRNAs fundem com o crRNA de ativação em trans (tracrRNA) e conduzem a clivagem específica e silenciamento do DNA pelas proteínas Cas. O sistema CRISPR/Cas9 pode ser utilizado em humanos por co-administração de plasmídeos que expressem a endonuclease Cas9 e os componentes crRNA necessários. O sistema de edição do genoma CRISPR/Cas9 tem demonstrado sucesso nos peixes-zebra e células bacterianas (Manuscript, 2014).

Ao contrário dos métodos convencionais, que abordam de forma temporária os sintomas da doença, os ZFNs e TALENs são capazes de corrigir a causa subjacente à doença, eliminando de forma permanente os sintomas com modificação precisa do genoma (Manuscript, 2014).

## **8.2. Células Estaminais Espermatogoniais em Cultura na Produção de Murganhos *knockout* dos Genes alvo por Transplantação de Células Germinativas Estaminais**

A linha de células estaminais como um veículo para a manipulação genética. Esta técnica permite a produção de murganhos heterozigóticos com mutações nos genes alvo por

acasalamento das fêmeas do tipo selvagem com machos transplantados com células estaminais espermatogoniais geneticamente modificadas (SSCs, em inglês *genetically modified spermatogonial stem cells*). Esta abordagem permite a geração de modelos knockout no murganho (Mulder *et al.*, 2016).

A azoospermia ou oligospermia pode ser causada por um distúrbio na espermatogénese, em resultado de tratamentos com quimioterapia ou radioterapia. A transplantação de células estaminais espermatogoniais pode ser útil no restabelecimento da infertilidade masculina. Neste caso, ocorre transplantação de células estaminais espermatogoniais para os túbulos seminíferos através do ducto eferente ou rede testicular. As células migram para a parte basal dos túbulos seminíferos, colonizam o epitélio, ocorre renovação e diferenciação, sendo a espermatogénese estabelecida (Mulder *et al.*, 2016).

Nos casos em que a infertilidade se deve a uma mutação genómica, a transplantação de SSCs só será bem-sucedida se combinada com a correção da mutação. Para isso, utilizam-se sistemas de edição do genoma, especialmente o CRISPR/Cas9 que permite alterações genéticas eficientes, rápidas e económicas (Mulder *et al.*, 2016).

### 8.3. Modelos *In Silico*

Os modelos *in silico* são um complemento dos tradicionais modelos *in vivo*. A biologia de sistemas é uma disciplina que tem crescido rapidamente e emprega uma abordagem integrativa para caracterizar sistemas biológicos, em que as interações entre todos os componentes no sistema são descritas matematicamente para estabelecer um modelo computacional. A vantagem de utilizar ferramentas de alto rendimento para a medição simultânea de milhares de moléculas, é a construção de um modelo *in silico* cada vez mais abrangente e com sistemas biológicos mais diversos. A integração de dados heterogéneos em modelos preditivos quantitativos poderá significar um aumento da nossa capacidade em compreender e intervir em doenças que resultam de perturbações nos sistemas biológicos. Isto levou ao desenvolvimento de novos métodos para a análise dos sistemas biológicos e da doença.

Alguns dos esforços feitos no desenvolvimento de modelos *in silico* para estudo do cancro compreendem: modelos estatísticos de cancro; modelos que representam redes de comunicação bioquímicas, metabólicas e de sinalização importantes na oncogénese; modelos do microambiente tumoral e que incluem as interações a nível tecidual.

A utilização destes ensaios irá acelerar o desenvolvimento de terapêuticas anticancerosas seguras, e oferecer uma esperança para tratamentos de doenças que se mantêm refratárias às tecnologias clínicas existentes (Edelman, Eddy e Price, 2011).

## CONCLUSÃO

---

Com este trabalho, é possível concluir que existe uma grande diversidade de modelos animais que podem ser utilizados em investigação. A escolha do tipo de modelo animal, é uma arte em si, pela sua complexidade. O futuro passa pela otimização dos modelos animais, para que estes mimetizem o melhor possível, o que se passa no ser humano. Só assim, as indústrias farmacêuticas conseguirão fazer uma melhor gestão dos fármacos que passam para a fase de ensaio clínico. O investimento, muitas vezes perdido em ensaios clínicos falhados, poderia ser drasticamente reduzido e dirigido para a investigação de fármacos mais promissores.

## BIBLIOGRAFIA

---

- CHANG**, Kai-hsiung et al. - Dihydrotestosterone synthesis bypasses testosterone to drive castration-resistant prostate cancer. 2011).
- DENAYER**, Tinneke; **STÖHR**, Thomas; **ROY**, Maarten Van - New Horizons in Translational Medicine Animal models in translational medicine: Validation and prediction. *New Horizons in Translational Medicine*. . ISSN 2307-5023. 2:1 (2014) 5–11. doi: 10.1016/j.nhtm.2014.08.001.
- DOROSHOW**, James H.; **KUMMAR**, Shivaani - Translational research in oncology — 10 years of progress and future prospects. *Nature Publishing Group*. 11:11 (2014) 649–662.
- EDELMAN**, Lucas B.; **EDDY**, James A.; **PRICE**, Nathan D. - NIH Public Access. 2011).
- FRANCIA**, Giulio et al. - Mouse models of advanced spontaneous metastasis for experimental therapeutics. *Nature Publishing Group*. 11:2 (2011) 135–141.
- GOPINATHAN**, Aarthi; **TUVESON**, David A. - The use of GEM models for experimental cancer therapeutics. 86:2008) 83–86.
- GUPTA**, Rajat M.; **MUSUNURU**, Kiran - Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs , TALENs , and CRISPR-Cas9. 124:10 (2014).
- HEJMADI**, Momna - *Introduction to Cancer Biology*. 2a edição ed.
- KILKENNY**, Carol et al. - The ARRIVE guidelines A nimal R esearch : R eporting I n V ivo E xperiments. 2010).
- KYRIAKAKIS**, Emmanouil; **MARKAKI**, Maria; **TAVERNARAKIS**, Nektarios - research *Caenorhabditis elegans* as a model for cancer research. 3556:August 2016 (2015).
- LODHIA**, K. A. et al. - *Biochimica et Biophysica Acta* Prioritizing therapeutic targets using patient-derived xenograft models. *BBA - Reviews on Cancer*. 1855:2 (2015) 223–234.
- MAK**, Isabella W. Y.; **EVANIEW**, Nathan; **GHERT**, Michelle - Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. 6:2 (2014) 114–118.
- MANUSCRIPT**, Author - NIH Public Access. 31:7 (2014) 397–405.
- MASHIMO**, Tomoji - Gene targeting technologies in rats: Zinc finger nucleases , transcription activator-like effector nucleases , and clustered regularly interspaced short palindromic repeats. 2014) 46–52.

- MICHAEL S. RAND** - Selection of Biomedical Animal Models. 2008) 9–16.
- MOUSE, O. N. E.; THERAPY**, Personalized Cancer - NIH Public Access. 344:1 (2015) 1–12.
- MULDER**, Callista L. et al. - Spermatogonial stem cell autotransplantation and germline genomic editing: a future cure for spermatogenic failure and prevention of transmission of genomic diseases. 2016) 1–13.
- MURPHY**, Joseph F. - Pre-Clinical Murine Models : Syngeneic Models for. 2:4 (2015) 2–5.
- PANDEY**, Udai Bhan; **NICHOLS**, Charles D. - Human Disease Models in Drosophila melanogaster and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery. 63:2 (2011) 411–436.
- RICHMOND**, Ann; SU, Yingjun - Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics. 82:2008) 78–82.
- SAXENA**, Meera; **CHRISTOFORI**, Gerhard - Rebuilding cancer metastasis in the mouse. Molecular Oncology. 7:2 (2013) 283–296.
- STEIN**, Ulrike et al. - Mouse Models of Human Cancer. 2014) 4671–4675.
- TALMADGE**, James E. et al. - Murine Models to Evaluate Novel and Conventional Therapeutic Strategies for Cancer. 2007) 793–804.
- THAKUR**, Meghna Das; **PRYER**, Nancy K.; **SINGH**, Mallika - Mouse tumour models to guide drug development and identify resistance mechanisms. 2014) 103–111.
- WHITELAW**, C.Bruce A. et al. - Engineering large animal models of human disease. November 2015 (2016) 247–256.
- WOOD**, Mary W.; **HART**, Lynette A. - Selecting appropriate animal models and strains : Making the best use of research , information and outreach search examples and suggested options , acting as a springboard for consideration of the best model . Arranged. 2008) 303–306.
- WORKMAN**, P. et al. - Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. British Journal of Cancer. 102:11 (2010) 1555–1577.