

Modelos de cancro da mama: do *in vitro* para o *in vivo*

Jessica Silva
Ana Isabel Faustino Rocha
Paula Alexandra Martins Oliveira
José Alberto Ramos Duarte

Resumo

A incidência e mortalidade de cancro da mama têm vindo a aumentar ao longo dos anos. Esta doença foi descrita pela primeira vez no ano 3000 a.C. por Edwin Smith Papyrus como uma doença grave sem tratamento conhecido. Atualmente, continua a ser necessário o delineamento de estratégias de prevenção, deteção e tratamento do cancro da mama. Para tal, é extremamente importante a utilização de modelos alternativos ao Homem.

*A utilização de animais para fins experimentais iniciou-se há muitos séculos (2000 anos a.C.), com os Babilónios e os Assírios a utilizarem animais para a realização de cirurgias. Os modelos *in vitro* são relativamente recentes em comparação com os modelos *in vivo*, uma vez que a primeira linha celular de cancro da mama (BT-20) foi descoberta apenas em 1958 por Lasfargues e Ozzello. Os modelos *in vivo* são os mais utilizados pois mimetizam quase na sua totalidade o comportamento da neoplasia no organismo. Em 1965, Howell realizou o primeiro estudo de carcinogénese mamária quimicamente induzida em ratos. Posteriormente, surgiu a necessidade da criação de animais geneticamente modificados para reduzir ao máximo as diferenças nos mecanismos tumorais. Mesmo assim, não é possível mimetizar a 100% o processo de carcinogénese humano nestes animais devido à sua elevada complexidade e número limitado de genes.*

*Atualmente existe uma diversidade de modelos *in vitro* e *in vivo* para o estudo do cancro da mama. A escolha do modelo animal mais adequado é um dos passos mais importantes no delineamento experimental. Os objetivos do trabalho e o tipo de dados que poderão ser obtidos do modelo animal são aspetos fundamentais a ter em consideração. Todos os modelos apresentam vantagens e desvantagens e a sua seleção merece uma reflexão cuidada à luz dos objetivos do trabalho.*

Palavras-chave: Cancro da mama, modelos *in vitro*, modelos animais.

Abstract

The incidence and mortality of breast cancer has increased over the years. This disease was first described in the year 3000 BC by Edwin Smith Papyrus as a serious disease with no known treatment. Currently the design of strategies for the prevention, detection and treatment of breast cancer remains necessary. For this, it is extremely important to use alternative models to humans.

*The use of animals for experimental purposes began many centuries ago (2000 years BC), with the Babylonians and the Assyrians using animals to perform surgeries. *In vitro* models are relatively recent compared to *in vivo* models, as the first breast cancer cell line (BT-20) was only discovered in 1958 by Lasfargues and Ozzello. *In vivo* models are the*

most used as they almost entirely mimic the behavior of the neoplasm in the body. In 1965, Howell performed the first study of chemically induced mammary carcinogenesis in rats. Subsequently, the need arose for the creation of genetically modified animals to reduce as much as possible the differences in tumor mechanisms. Even so, it is not possible to 100% mimic the process of human carcinogenesis in these animals due to their high complexity and limited number of genes.

Currently there are a variety of *in vitro* and *in vivo* models for the study of breast cancer. Choosing the most suitable animal model is one of the most important steps in the experimental design. The purpose of the work and the type of data that can be obtained from the animal model are fundamental aspects to be considered. All models have advantages and disadvantages, and their selection deserves careful consideration considering the work objectives.

Keywords: Breast cancer, *in vitro* models, animal models.

Introdução

No ano de 2020, o cancro da mama foi o tipo de cancro mais diagnosticado nas mulheres e também a principal causa de morte entre as mesmas¹. A sua incidência tem aumentado ao longo dos anos o que levou à intensificação do seu estudo². Os principais fatores de risco associados ao desenvolvimento deste tipo de cancro incluem a idade, o género, a raça, a história familiar (mutações genéticas), a história reprodutiva (idade da menarca, idade de nascimento do primeiro filho, mulheres nulíparas), a exposição a estrogénios, o estilo de vida (obesidade, sedentarismo) e a exposição a agentes físicos e químicos (poluição)³. A exposição a diversos fatores ambientais e um estilo de vida pouco saudável, podem atuar em conjunto para a conversão de uma célula normal numa célula neoplásica (iniciação)⁴. Assim, é necessário delinear novas estratégias de prevenção, deteção e tratamento deste tipo de cancro, frequentemente com recurso a modelos animais. A utilização de animais para fins experimentais iniciou-se há muitos séculos. O primeiro registo aponta para 2000 anos a.C., onde os Babilónios e Assírios utilizaram animais para a realização de cirurgias. Mais tarde, Erasistratus (340-258 a.C.) desenvolveu alguns ensaios com animais⁵.

¹ Jacques Ferlay *et al.*, "Cancer Statistics for the Year 2020: An Overview", *International Journal of Cancer* 149, n. 4 (2021): 778–89.

² Angels Sierra, "Animal Models of Breast Cancer for the Study of Pathogenesis and Therapeutic Insights", *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 11, n. 11 (2009): 721–27.

³ E. A. El-Abd *et al.*, *Animal Models in Breast Cancer in Omics Approaches in Breast Cancer* (Ed. Barh, D.) New Delhi: Springer India, 2014.

⁴ Georgia Kyprianou, "Cancer: Cancer in the 21st Century, The Role of Lifestyle and Nutrition, Food Controversies and Recommendations for Cancer Prevention: Article", *Cancer Prevention* (2019): 6.

⁵ A. Faustino-Rocha, A. Alvarado & P. Oliveira, "The role of rat in biomedical research", *Revista Lusófona de Ciências e Medicina Veterinária* 10 (2019): 49–61.

Nos últimos 20 anos verificou-se um crescimento exponencial no número de publicações em revistas científicas na área da oncologia com recurso a modelos animais^{6,7}.

Cancro da mama

O processo de carcinogénese ocorre em quatro fases: *iniciação*, *promoção*, *progressão* e *metastização*. Durante a *iniciação* ocorrem alterações irreversíveis do ácido desoxirribonucleico (ADN) levando à conversão de uma célula normal numa célula iniciada. Esta modificação celular pode ocorrer devido à exposição a agentes carcinogénicos físicos, químicos e biológicos ou devido a fatores genéticos. Durante a *promoção*, as células iniciadas dividem-se descontroladamente devido à acumulação de erros genéticos, originando uma população de células pré-neoplásicas. Esta é uma fase relativamente lenta e potencialmente reversível através da administração de fármacos quimioterápicos. Durante a *progressão*, a lesão neoplásica cresce rapidamente e as células pré-neoplásicas podem converter-se em células neoplásicas, devido à acumulação de sucessivos erros genéticos. Este crescimento rápido e descontrolado pode conduzir à *metastização*, que é um processo complexo onde ocorre a disseminação das células neoplásicas para outros órgãos através da corrente sanguínea ou linfática^{8,9,10}. É importante salientar que, embora a capacidade de metastização seja exclusiva das neoplasias malignas, nem todas as neoplasias malignas metastizam.

O cancro da mama deriva de diversos tecidos que constituem a glândula mamária, nomeadamente o tecido glandular, o tecido conjuntivo fibroso e o tecido adiposo¹¹. O primeiro caso de cancro da mama foi descrito no *Edwin Smith Papyrus* há aproximadamente 3000 anos a.C., como uma doença grave e sem tratamento conhecido¹². Foi apenas em 1757 que o cirurgião francês Henri Le Dran propôs a remoção total

⁶ Li Ding *et al.*, "Genome Remodelling in a Basal-like Breast Cancer Metastasis and Xenograft", *Nature* 464, n. 7291 (2010): 999–1005.

⁷ Omar M. Rashid & Kazuaki Takabe, "Animal Models for Exploring the Pharmacokinetics of Breast Cancer Therapies", *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 11, n. 2 (2015): 221–30.

⁸ Faustino-Rocha, Alvarado & Oliveira, "The role of rat in biomedical research", *Revista Lusófona de Ciências e Medicina Veterinária* 10 (2019): 49–61.

⁹ Saraswati Sukumar, Katherine McKenzie & Ying Chen, "Animal Models for Breast Cancer", *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 333, n. 1–2 (1995): 37–44.

¹⁰ Yewei Liu *et al.*, "Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research", *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery* 5, n. 5 (2015): 708–29.

¹¹ JoEllen Welsh, "Animal Models for Studying Prevention and Treatment of Breast Cancer", in *Animal Models for the Study of Human Disease* (Elsevier, 2013), 997–1018.

¹² Steven I. Hajdu, "A Note from History: Landmarks in History of Cancer, Part 1", *Cancer* 117, n. 5 (2011): 1097–1102.

de uma neoplasia mamária¹³ e a primeira mastectomia radical foi realizada pelo cirurgião norte americano William Halsted em 1882¹⁴.

Modelos *in vitro* e *in vivo*

Existem diversos modelos para o estudo do cancro, como os modelos *in vitro* e os modelos *in vivo*^{15,16}. Cada um destes modelos apresenta vantagens e desvantagens, cabendo ao investigador seleccionar o modelo mais adequado considerando o objetivo do seu estudo.

Os modelos *in vitro* são importantes na pesquisa de vários aspetos, como a progressão das neoplasias mamárias, os mecanismos de invasão tumoral, a formação de metástases e a ação de fármacos^{17,18,19}. A primeira linha celular humana de cancro da mama foi descoberta em 1958 por Etienne Lasfargues e Luciano Ozzello. As células foram recolhidas diretamente da neoplasia mamária imediatamente após a realização de uma mastectomia²⁰. Até à data, mais de 50 linha celulares foram isoladas de pacientes com diferentes tipos de cancro da mama²¹. Os modelos *in vitro* têm como principais vantagens a fácil manipulação, a utilização de mecanismos simples, o custo reduzido comparativamente com outros modelos, a obtenção de resultados rápidos (a proliferação celular é mais rápida do que nos modelos *in vivo*) e a exposição uniforme das células ao meio e aos fármacos testados, resultando num crescimento e proliferação homogéneos^{20,22}. A cultura celular em 2D depende da aderência das células a uma superfície plana (placa de Petri de vidro ou poliestireno) que fornece suporte mecânico às células²³. Estes modelos 2D são menos complexos, pelo que as interações célula-célula são diferentes das

¹³ Kiven Erique Lukong, "Understanding breast cancer – The long and winding road", *BBA Clinical* 7 (2017): 64–77.

¹⁴ M Plesca *et al.*, "Evolution of radical mastectomy for breast cancer", *Journal of Medicine and Life* 9, n. 2 (2016): 183–86.

¹⁵ Gokhan Bahcecioglu *et al.*, "Breast cancer models: Engineering the tumor microenvironment", *Acta biomaterialia* 106 (2020): 1–21.

¹⁶ Bano Subia *et al.*, "Breast Tumor-on-Chip Models: From Disease Modeling to Personalized Drug Screening", *Journal of Controlled Release* 331 (2021): 103–20.

¹⁷ Gokhan Bahcecioglu *et al.*, "Breast cancer models: Engineering the tumor microenvironment", *Acta biomaterialia* 106 (2020): 1–21.

¹⁸ Bano Subia *et al.*, "Breast Tumor-on-Chip Models: From Disease Modeling to Personalized Drug Screening", *Journal of Controlled Release* 331 (2021): 103–20.

¹⁹ Kayla Duval *et al.*, "Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture", *Physiology (Bethesda, Md.)* 32, n. 4 (2017): 266–77.

²⁰ E. Y. Lasfargues & L. Ozzello, "Cultivation of Human Breast Carcinomas", *Journal of the National Cancer Institute* 21, n. 6 (1958): 1131–47.

²¹ JoEllen Welsh, "Animal Models for Studying Prevention and Treatment of Breast Cancer", in *Animal Models for the Study of Human Disease* (Elsevier, 2013), 997–1018.

²² Rasheena Edmondson *et al.*, "Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors", *Assay and Drug Development Technologies* 12, n. 4 (2014): 207–18.

²³ Kayla Duval *et al.*, "Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture", *Physiology (Bethesda, Md.)* 32, n. 4 (2017): 266–77.

observadas nos modelos *in vivo*, pois as células dispõem-se em monocamada perdendo o fenótipo original^{24,25}. Nestes modelos as células neoplásicas perdem vias de sinalização que são importantes na definição da resposta da célula em termos de crescimento, morfologia, metabolismo e diferenciação^{26,27}. As células em modelos 2D também não mimetizam completamente o comportamento da neoplasia no organismo devido à ausência de estroma²⁸. Durante muitos anos os modelos de cultura celular 2D foram comumente utilizados nas fases iniciais de projetos de investigação, com posterior utilização de modelos 3D e modelos *in vivo*. Embora 95% dos ensaios pré-clínicos de fármacos sejam considerados eficazes nos modelos *in vitro*, apenas 7,5% obtêm aprovação para uso clínico²⁹. Por outro lado, muitos dos estudos efetuados em modelos 2D obtêm resultados contraditórios quando comparados com os resultados dos modelos *in vivo*³⁰.

Os modelos *in vitro* tridimensionais (3D) que mimetizam o microambiente tumoral são muito importantes para o estudo dos mecanismos moleculares subjacente à iniciação, promoção, progressão e metastização das neoplasias, e para a pesquisa de tratamentos mais eficazes. Este modelo experimental tem vindo a revelar resultados idênticos aos obtidos nos estudos *in vivo* e nos ensaios clínicos^{31,32}. Este modelo 3D permite avaliar o microambiente tumoral uma vez que se verifica a interação célula-célula e célula-material, perfusão e condições de hipoxia, aproximando este modelo dos modelos *in vivo*^{33,34}. Uma das vantagens destes modelos é a possibilidade de estudo da angiogénese³⁵. No entanto, existe ainda a dificuldade de controlar a interface célula-célula, o microambiente tumoral, a distribuição de oxigénio no

²⁴ Gokhan Bahcecioglu *et al.*, "Breast cancer models: Engineering the tumor microenvironment", *Acta biomaterialia* 106 (2020): 1–21.

²⁵ Waseem Asghar *et al.*, "Engineering Cancer Microenvironments for in Vitro 3-D Tumor Models", *Materials Today* 18, n. 10 (2015): 539–53.

²⁶ Gokhan Bahcecioglu *et al.*, "Breast cancer models: Engineering the tumor microenvironment", *Acta biomaterialia* 106 (2020): 1–21.

²⁷ Edmondson *et al.*, "Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors" *Assay and Drug Development Technologies* 12, n. 4 (2014): 207–18.

²⁸ Jong Bin Kim, Robert Stein & Mike J. O'Hare, "Three-Dimensional in Vitro Tissue Culture Models of Breast Cancer - a Review", *Breast Cancer Research and Treatment* 85, n. 3 (2004): 281–91.

²⁹ Gokhan Bahcecioglu *et al.*, "Breast cancer models: Engineering the tumor microenvironment", *Acta biomaterialia* 106 (2020): 1–21.

³⁰ Waseem Asghar *et al.*, "Engineering Cancer Microenvironments for in Vitro 3-D Tumor Models", *Materials Today* 18, n. 10 (2015): 539–53.

³¹ Ju Han *et al.*, "Molecular Predictors of 3D Morphogenesis by Breast Cancer Cell Lines in 3D Culture", *PLOS Computational Biology* 6, n. 2 (2010): e1000684.

³² Katherine J. Martin *et al.*, "Prognostic Breast Cancer Signature Identified from 3D Culture Model Accurately Predicts Clinical Outcome across Independent Datasets", *PloS One* 3, n. 8 (2008): e2994.

³³ Gokhan Bahcecioglu *et al.*, "Breast cancer models: Engineering the tumor microenvironment", *Acta biomaterialia* 106 (2020): 1–21.

³⁴ Waseem Asghar *et al.*, "Engineering Cancer Microenvironments for in Vitro 3-D Tumor Models", *Materials Today* 18, n. 10 (2015): 539–53.

³⁵ Gokhan Bahcecioglu *et al.*, "Breast cancer models: Engineering the tumor microenvironment", *Acta biomaterialia* 106 (2020): 1–21.

tempo e no espaço, a distribuição de nutrientes e o gasto metabólico³⁶. As suas características tridimensionais dificultam a penetração uniforme do meio e dos fármacos a testar³⁷.

Atendendo a que a maioria dos procedimentos experimentais não podem ser realizados em seres humanos devido a questões éticas, os animais são frequentemente usados como modelos alternativos não só em investigação, mas também para fins de ensino. A utilização de modelos *in vivo* tem vindo a crescer significativamente, havendo diversos registos históricos da sua utilização³⁸. A primeira neoplasia mamária em rato foi descrita no ano de 1854³⁹. A partir desta data, muitos foram os estudos e descobertas efetuadas neste modelo animal. Em 1954, Foulkes efetuou o primeiro transplante de uma neoplasia benigna em ratos⁴⁰. Mais tarde, Howell realizou o primeiro estudo de carcinogénese mamária quimicamente induzida também em ratos⁴¹.

Os murganhos e os ratos são sem dúvida os modelos animais *in vivo* mais utilizados devido às suas características fisiológicas e de fácil manutenção^{42,43}. De facto, a sua fisiologia e genética são bem conhecidas, são animais de pequena dimensão, fáceis de alojar e manipular, relativamente baratos e são mamíferos com inúmeras semelhanças com os humanos (anatomia, fisiologia, genética e bioquímica)^{44,45,46}.

Relativamente à utilização do rato como modelo de cancro da mama, a glândula mamária do rato é estrogénio-dependente e apresenta características histológicas, bioquímicas, moleculares e genéticas muito semelhantes à glândula mamária da mulher⁴⁷. No entanto, existem algumas diferenças interespecie

³⁶ Kayla Duval *et al.*, "Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture", *Physiology* (Bethesda, Md.) 32, n. 4 (2017): 266–77.

³⁷ Edmondson *et al.*, "Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors" *Assay and Drug Development Technologies* 12, n. 4 (2014): 207–18.

³⁸ JoEllen Welsh, "Animal Models for Studying Prevention and Treatment of Breast Cancer", in *Animal Models for the Study of Human Disease* (Elsevier, 2013), 997–1018.

³⁹ Robert D. Cardiff & Nicholas Kenney, "A Compendium of the Mouse Mammary Tumor Biologist: From the Initial Observations in the House Mouse to the Development of Genetically Engineered Mice", *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3, n. 6 (2011): a003111.

⁴⁰ R. H. Foulkes, "Successful Transplantation of an Apparently Benign Neoplasm", *Science* 119, n. 3082 (1954): 124–124.

⁴¹ J. S. Howell, "Studies on Chemically Induced Breast Tumours in the Rat", *Acta - Unio Internationalis Contra Cancrum* 19 (1963): 762–64.

⁴² Daniela Kalla, Alexander Kind & Angelika Schnieke, "Genetically Engineered Pigs to Study Cancer", *International Journal of Molecular Sciences* 21, n. 2 (2020): 488.

⁴³ Li Zeng, Wei Li & Ce-Shi Chen, "Breast cancer animal models and applications", *Zoological Research* 41, n. 5 (2020): 477–94.

⁴⁴ Robert D. Cardiff & Nichola Kenney, "A Compendium of the Mouse Mammary Tumor Biologist: From the Initial Observations in the House Mouse to the Development of Genetically Engineered Mice", *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3, n. 6 (2011): a003111.

⁴⁵ Li Zeng, Wei Li & Ce-Shi Chen, "Breast cancer animal models and applications", *Zoological Research* 41, n. 5 (2020): 477–94.

⁴⁶ Zhitao Li *et al.*, "Application of Animal Models in Cancer Research: Recent Progress and Future Prospects", *Cancer Management and Research* 13 (2021): 2455–75.

⁴⁷ J. Russo & I. H. Russo, "Atlas and Histologic Classification of Tumors of the Rat Mammary Gland", *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 5, n. 2 (2000): 187–200.

que devem ser consideradas. Os ratos toleram doses de fármacos mais elevadas do que os humanos e a metastização das neoplasias mamárias nos ratos ocorre frequentemente no pulmão, enquanto nos humanos é mais frequente nos linfonodos, fígado, ossos e cérebro⁴⁸.

O modelo roedor de cancro da mama pode ser obtido através da indução química (administração de agentes carcinogénicos ou hormonas); da exposição a agentes carcinogénicos físicos como a radiação; ou a utilização de animais geneticamente modificados^{49,50,51,52}.

A indução química de neoplasias é o método mais utilizado. O 7,12 - Dimetilbenzantraceno (DMBA) e a N-metil-N-nitrosureia (MNU) são os carcinogénicos mais usados para a indução do cancro da mama em ratos e murganhos. Com apenas uma administração, estes químicos induzem o desenvolvimento de neoplasias mamárias 8 a 10 semanas após a administração. Ambos induzem o desenvolvimento de neoplasias através da alquilação do ADN, no entanto apresentam diferenças ao nível do seu metabolismo. A MNU não requer ativação metabólica, enquanto o DMBA requer a ativação metabólica pelas enzimas citocromo P450, tornando a sua ação mais lenta⁵³.

Apesar dos inúmeros estudos de investigação do cancro da mama em ratos e murganhos, a utilização de outros animais já foi anteriormente explorada. A cadela e a gata têm sido utilizadas como modelos para o estudo do cancro da mama devido ao desenvolvimento espontâneo deste tipo de neoplasia, que no caso do rato é raro e ocorre apenas após o primeiro ano de vida⁵³.

A galinha é um modelo animal que não é comumente utilizado na atualidade, no entanto, já foi utilizada em vários estudos não só na investigação do cancro, como também de outras patologias como a arteriosclerose, doenças do aparelho reprodutor e na realização de testes toxicológicos^{54,55}. Este modelo animal apresenta a vantagem dos seus embriões se desenvolverem extracorporalmente, o que permite acompanhar o desenvolvimento embrionário na totalidade. A galinha é considerada um modelo de baixo

⁴⁸ Li Zeng, Wei Li & Ce-Shi Chen, "Breast cancer animal models and applications", *Zoological Research* 41, n. 5 (2020): 477–94.

⁴⁹ Kay-Uwe Wagner, "Models of breast cancer: quo vadis, animal modeling?", *Breast Cancer Research* 6, n. 1 (2004): 31–38.

⁵⁰ Li et al., "Application of Animal Models in Cancer Research: Recent Progress and Future Prospects". *Cancer Management and Research* 13 (2021): 2455–75.

⁵¹ J. Russo & I. H. Russo, "Atlas and Histologic Classification of Tumors of the Rat Mammary Gland", *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 5, n. 2 (2000): 187–200.

⁵² Kay-Uwe Wagner, "Models of breast cancer: quo vadis, animal modeling?", *Breast Cancer Research* 6, n. 1 (2004): 31–38.

⁵³ Antonieta Alvarado et al., "Prognostic Factors in MNU and DMBA-Induced Mammary Tumors in Female Rats", *Pathology, Research and Practice* 213, n. 5 (2017): 441–46.

⁵⁴ P. Michael Conn, *Sourcebook of Models for Biomedical Research* (Totowa, N.J: Humana Press, 2008).

⁵⁵ I. Ayala et al., "Use of the chicken as an experimental animal model in atherosclerosis", *Avian and Poultry Biology Reviews* 16, n. 3 (2005): 151–60.

custo e de fácil manutenção⁵⁶. Em 1910, Peyton Rous extraiu células neoplásicas (sarcoma) de uma galinha e injetou-as numa outra saudável. Esta desenvolveu uma neoplasia, levando-o a concluir que as células neoplásicas injetadas continham uma substância infecciosa vírica capaz de transmitir cancro⁵⁷. Também Gheorghescu *et al.*, utilizou este modelo animal para estudar a angiogénese⁵⁸.

Em 1915, Yamagiwa e Ichikawa provaram que a aplicação de produtos químicos como o alcatrão de carvão na epiderme das orelhas de coelhos domésticos pode levar ao desenvolvimento de neoplasias (carcinoma das células escamosas)⁵⁹. Mais recentemente, em 2011, Luo *et al.* utilizaram leitões para o estudo do gene BRCA 1 mutado, principal responsável pela componente hereditária do cancro da mama⁶⁰.

O peixe-zebra é um animal vertebrado cuja utilização na investigação do cancro tem vindo a obter resultados cada vez mais promissores⁶¹. Este modelo tem vindo a ser muito utilizado em estudos relacionados com a angiogénese^{62,63}. O seu baixo custo, reduzidas dimensões e reprodução rápida são vantagens atrativas. As principais desvantagens são as diferenças genéticas e anatómicas com os humanos⁶⁴.

Os modelos animais geneticamente modificados são produzidos com o intuito de mimetizar o comportamento e as alterações encontradas nas neoplasias humanas. Os genes de interesse são mutados, eliminados ou sobreexpressos, o que leva ao desenvolvimento espontâneo das neoplasias^{65,66}. Estes modelos apresentam várias vantagens, como a reprodutibilidade das mutações genéticas encontradas nos humanos e a possibilidade de estudo da progressão das neoplasias e do efeito de diversas abordagens terapêuticas. No entanto, não é possível mimetizar a 100% as neoplasias humanas em animais transgênicos

⁵⁶ K. Yamagiwa & K. Ichikawa, "Experimental Study of the Pathogenesis of Carcinoma", *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 27, n. 3 (1977): 174–81.

⁵⁷ Peyton Rous, "Transmission of a Malignant New Growth by Means of a Cell-Free Filtrate", *JAMA* 250, n. 11 (1983): 1445–46.

⁵⁸ Anna Kaskova Gheorghescu *et al.*, "Exposure of chick embryos to cadmium changes the extra-embryonic vascular branching pattern and alters expression of VEGF-A and VEGF-R2", *Toxicology and Applied Pharmacology* 289, n. 1 (2015): 79–88.

⁵⁹ K. Yamagiwa & K. Ichikawa, "Experimental Study of the Pathogenesis of Carcinoma", *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 27, n. 3 (1977): 174–81.

⁶⁰ Yonglun Luo *et al.*, "High Efficiency of BRCA1 Knockout Using RAAV-Mediated Gene Targeting: Developing a Pig Model for Breast Cancer", *Transgenic Research* 20, n. 5 (2011): 975–88.

⁶¹ Li Zeng, Wei Li & Ce-Shi Chen, "Breast cancer animal models and applications", *Zoological Research* 41, n. 5 (2020): 477–94.

⁶² Sankar Jagadeeshan *et al.*, "Toxicity and Anti-Angiogenicity Evaluation of Pak1 Inhibitor IPA-3 Using Zebrafish Embryo Model", *Cell Biology and Toxicology* 33, n. 1 (2017): 41–56.

⁶³ Annika Schuermann, Christian S. M. Helker & Wiebke Herzog, "Angiogenesis in Zebrafish", *Seminars in Cell & Developmental Biology* 31 (2014): 106–14.

⁶⁴ Ann Richmond & Yingjun Su, "Mouse Xenograft Models vs GEM Models for Human Cancer Therapeutics", *Disease Models & Mechanisms* 1, n. 2–3 (2008): 78–82.

⁶⁵ R. L. Brinster *et al.*, "Somatic Expression of Herpes Thymidine Kinase in Mice Following Injection of a Fusion Gene into Eggs", *Cell* 27, n. 1 Pt 2 (1981): 223–31.

⁶⁶ Ann Richmond & Yingjun Su, "Mouse Xenograft Models vs GEM Models for Human Cancer Therapeutics", *Disease Models & Mechanisms* 1, n. 2–3 (2008): 78–82.

devido à sua elevada complexidade, número limitado de genes e a lentidão do desenvolvimento neoplásico. É necessário ter em consideração que as neoplasias dos animais transgênicos não são de origem humana, o que leva a que apenas seja possível fazer uma previsão do que poderá acontecer na neoplasia humana⁶⁷. O primeiro animal geneticamente modificado foi descoberto por Beatrice Mintz e Rudolf Jaenisch em 1974 através da introdução do ADN de um vírus numa célula embrionária de rato. Esta experiência mostrou que, após o desenvolvimento embrionário, todas as células do animal apresentavam o gene introduzido. No entanto, não foi possível reproduzir descendência com as mesmas características⁶⁸. Foi em 1981 que Frank Costantini e Elizabeth Lacy injetaram ADN purificado numa célula embrionária de rato que mostrou transmissão do material genético para a descendência⁶⁹.

⁶⁷ L. T. Amundadottir, G. Merlino & R. B. Dickson, "Transgenic Mouse Models of Breast Cancer", *Breast Cancer Research and Treatment* 39, n. 1 (1996): 119–35.

⁶⁸ Rudolf Jaenisch & Beatrice Mintz, "Simian Virus 40 DNA Sequences in DNA of Healthy Adult Mice Derived from Preimplantation Blastocysts Injected with Viral DNA", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71, n. 4 (1974): 1250–54.

⁶⁹ Franklin Costantini & Elizabeth Lacy, "Introduction of a Rabbit β -Globin Gene into the Mouse Germ Line", *Nature* 294, n. 5836 (1981): 92–94.

Cronologia Modelos Animais



Figura 1 - Cronologia da utilização dos animais como modelo.

Como selecionar o modelo animal mais adequado?

A seleção do modelo animal mais indicado para o estudo do cancro da mama é, sem dúvida, um dos passos mais importantes no delineamento experimental. O modelo animal selecionado deve mimetizar o processo de carcinogénese do humano. Também é importante perceber que tipo de dados poderão ser obtidos do modelo animal selecionado e o tempo de recolha dos mesmos. Os animais com ciclo reprodutivo mais curto geram resultados mais rápidos e vice-versa. A seleção de um modelo animal inadequado pode comprometer todo o projeto, desde a recolha de dados até à sua interpretação.

Com o intuito de facilitar esta escolha e definir algumas regras na seleção e utilização de modelos animais na experimentação, Russel e Burch (1959) definiram os 3 R's: reduzir (*reduce*), refinar (*refine*) e substituir (*replace*). Assim, o número de animais utilizados deve ser o menor possível que permita obter uma conclusão válida (*reduce*), devem ser tomados todos os cuidados durante os procedimentos experimentais para minimizar qualquer dano infligido aos animais (*refine*) e, sempre que possível, os animais devem ser substituídos por abordagens não animais, como por exemplo os modelos *in vitro* (*replace*)^{70,71}.

Todos os modelos apresentam vantagens e desvantagens, pelo que a sua seleção merece uma reflexão cuidada tendo em conta os objetivos do trabalho e a disponibilidade de recursos materiais e imateriais.

Autores

Jessica Silva

silva_jessy@hotmail.com

Ana Isabel Faustino Rocha

anafaustino.faustino@sapo.pt

Paula Alexandra Martins Oliveira

pamo@utad.pt

José Alberto Ramos Duarte

jarduarte@fade.up.pt

⁷⁰ W. M. S. Russel & R. Burch, *The principles of humane experimental technique*, Butler and Tanner, Frome and London, 1959.

⁷¹ Jerrold Tannenbaum & B Taylor Bennett, "Russell and Burch's 3Rs Then and Now: The Need for Clarity in Definition and Purpose", *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS* 54, n. 2 (2015): 120–32.