

Alcance, limitaciones y perspectivas éticas de los sistemas experimentales murinos en la evaluación de estrategias inmunoterapéuticas del cancer

Scope, limitation and ethical perspective for murine experimental systems in the evaluation of cancer immunotherapeutic strategies

Beausoleil-Delgado, Irene., Avellanet-Martínez, Janet., López-Medinilla, Armando., Montero-Casimiro, José. E.

Centro de Inmunología Molecular. Calle 216 y 15 Playa, Havana
11600. Cuba

E-mail: irene@cim.sld.cu

REDVET: 2008, Vol. IX, Nº 12

Recibido 27.02.2008 - Ref. prov. H026 - Revisado 22.06.08 - Ref. def. 121210_REDVET - Aceptado 18.11.08 –
Publicado 01.12.08

Este artículo de investigación está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121208.html>
concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121208/121210.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®.
Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org> y con REDVET®
- <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

Resumen

El uso de modelos de cáncer en animales, particularmente ratones y ratas han aportado muchos conocimientos acerca de los procesos de malignización, por lo que en las fases pre-clínicas de las investigaciones en esta enfermedad es necesario contar con modelos experimentales que porten tumores para poder facilitar la valoración inicial de la eficacia de nuevos agentes antitumorales.

Para evaluar la eficacia y los mecanismos de acción de nuestros agentes inmunoterapéuticos establecimos diferentes sistemas experimentales utilizando ratones isogénicos (BALB/c y C57BL/6) y ratones atímicos con diferentes tumores autólogos y humanos dependiente de estas líneas, se utilizaron para ello tres escenarios inmunoterapéuticos, abordamos el tumor primario, la metástasis experimental y el escenario adyuvante post-cirugía controlando la recurrencia tumoral y las metástasis. Estos modelos también fueron relevantes para definir el potencial anti-angiogénico, anti-proliferativo, pro-apoptico y antimetastásico de estos agentes. Se establecieron igualmente las normas éticas para el trabajo con estos sistemas experimentales y los aspectos a tener en cuenta para definir el punto final de los experimentos.

Alcance, limitaciones y perspectivas éticas de los sistemas experimentales murinos en la evaluación de estrategias inmunoterapéuticas del cancer
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121208/121210.pdf>

Palabras claves: Animales de Laboratorio | Sistemas experimentales | ética animal | Cáncer | Agentes inmunoterapéuticos |

Abstract

Animal models in cancer, specially the use of mice and rats, have contributed to understand malignant processes. Consequently, the development of new anti-cancer drugs requires their early evaluation in pre-clinical animal models bearing different kind of tumors. These projects particularly address three different cancer immunotherapy settings: advanced primary tumors, experimental metastasis, and post-surgery adjuvant setting, controlling tumor recurrences and metastasis.

Different murine and human tumor cells grown in BALB/c, C57BL/6 and nu/nu mouse models are used to evaluate the efficacy of therapeutics in development.

These models also become relevant to define the potential anti-angiogenic, anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-metastatic properties for cancer targeted therapies. Furthermore, ethics considerations are considered for the use of these experimental systems and to evaluate different aspects for defined protocol endpoints

Key words: laboratory animal's | experimental systems | animal ethics | cancer | immunotherapeutic agents' |

INTRODUCCION

El cáncer constituye un importante problema de salud a nivel mundial con una elevada letalidad. En épocas pasadas, el tratar esta enfermedad mediante la manipulación del sistema inmune se podía considerar una utopía. Sin embargo los avances en la inmunología y en la oncología nos dicen que no solamente en teoría sino en la práctica este tipo de tratamiento es muy promisorio.

En las fases preclínicas de las investigaciones en esta enfermedad es necesario contar con sistemas experimentales donde pueda evaluarse la eficacia de los nuevos productos.

En nuestro trabajo establecimos varios Sistemas Experimentales para la evaluación de diferentes estrategias en la inmunoterapia del cáncer mostrando que a pesar de sus limitaciones, traen consigo beneficios que redundan en la clínica

SISTEMAS EXPERIMENTALES

El desarrollo de las drogas depende en gran manera de los modelos animales, los cuales permiten validar blancos terapéuticos, para anticipar los efectos de una droga sobre un blanco de interés y para examinar efectos colaterales potenciales.

Los humanos y los ratones poseen semejantes órganos y sistemas fisiológicos, además de que desarrollan tumores con características fisiológicas similares, con la adquisición de mutaciones en el espectro de oncogenes y genes supresores de tumores equivalentes. Estas similitudes han hecho del ratón el modelo por excelencia para el estudio de la patogénesis de diferentes enfermedades incluida el cáncer.

Sin embargo, a pesar de las muchas semejanzas existentes entre el ratón y el hombre y de que reportes recientes muestran que en la secuencia de los genomas del ratón y el humano hay solamente alrededor de 300 genes que parecen ser único para cada una de ellas, existen diferencias sustanciales entre ambas especies en cuanto al desarrollo del sistema inmune, su activación y respuestas al cambio. Estas diferencias son debido a que entre estas especies existen de 65-70 millones de años de evolución, y esta evolución el ratón y el humano la realizaron en diferentes nichos ecológicos, por lo que los cambios patogénicos debieron ser diferentes (9)

Si nos guiamos por los muchos paralelismos que existen entre las dos especies tendemos a ignorar las diferencias existentes y en muchos casos se asume que lo que es verdad en los ratones es necesariamente cierto en los humanos, por lo que es necesario analizar con cautela los resultados y entender las limitaciones potenciales de la extrapolación de los resultados del ratón al hombre, pues las terapias en los humanos son cada vez más sofisticadas y los blancos más específicos.(9) Estas realidades no significan que los modelos animales utilizando ratones están invalidados para estos estudios, ya que hay muchos paradigmas que se traducen bien entre ambas especies, lo que unido a la relativa facilidad con que el ratón se manipula genéticamente permitirá que esta especie nos siga aportando información importante durante muchos años.

Los modelos animales han jugado un rol importantísimo en el desarrollo de las inmunoterapias con anticuerpos monoclonales y las vacunas de cáncer ya que han permitido la adquisición de nuevos conocimientos como la interpretación de los mecanismos biológicos que llevan a las neoplasias a permanecer inadvertidas y los procesos que gobiernan la respuesta inmunológica contra las células transformadas así como los procesos de invasión tumoral y metástasis. El uso de los modelos de cáncer en animales de experimentación en particular ratones y ratas, han posibilitado además el desarrollo de en los estudios pre-clínicos para el estudio de la eficacia terapéutica de nuevas drogas en cáncer (12)

Históricamente los investigadores han trabajado con modelos tumorales trasplantables, a partir de tumores espontáneos o de tumores inducidos por productos químicos tales como los derivados del antraceno o por irradiación, que después de varios pases "in vitro" deben de reinocularse en un animal del mismo fondo genético (singénico) en el cual se indujo o surgió de forma espontánea el tumor. Estos tumores pueden mantenerse por pases "in vivo" de animal a animal o "in vitro" mediante el establecimiento de las líneas tumorales en cultivo, los animales portadores de estos tumores son los llamados Sistemas Experimentales

Para realizar nuestro trabajo se establecieron a priori los perfiles tumorales de diferentes Sistemas Experimentales, por lo que trabajando con diferentes líneas tumorales a diferentes concentraciones en las líneas de ratones singénicos se estableció: su latencia, la curva del volumen tumoral medido a diferentes tiempos, la invasión local y la metástasis (2, 4, 5, 6, 10, 15).

Para establecer la estrategia a seguir en estos sistemas se valoraron tres escenarios diferentes; tumor primario, metástasis experimental y en el escenario adyuvante, este último entendemos que es lo más cercano a como se trata esta enfermedad en el humano.

Algunos autores recomiendan el escenario adyuvante pues se ha encontrado que tratando directamente tumores primarios estos crecen de forma lenta o se estabiliza el crecimiento tumoral pero nunca llegan a "curarse", sin embargo cuando se resecaba el tumor y se trataba con los preparados post-cirugía los mismos regresaban y no reaparecían nuevamente por lo que los animales permanecían libre de la enfermedad. (13).

Otros utilizan la metástasis experimental, Garrido G. y cols. mostraron resultados muy alentadores con el fármaco utilizado. (5,6)

La aplicabilidad de los tumores trasplantables en la enfermedad humana tiene sus limitaciones; primero ellos fueron establecidos hace muchos años atrás y pueden ser parcialmente histoincompatibles con los ratones singénicos actuales, también algunos de ellos han incorporado virus endógenos no expresados por sus huésped murinos por lo que pueden ser mucho más inmunogénicos que los tumores humanos que surgen de modo natural, estos tumores generalmente son inoculados de forma subcutánea o intravenosa por lo que no crecen en el sitio anatómico apropiado por lo tanto no son mímica de la fisiología órgano específica característica del tumor, de esta forma el sistema inmune no se expone al tumor de forma lenta como ocurre en el humano.(12) Los tumores trasplantables generalmente progresan de forma rápida después de su implantación, en el humano este desarrollo es lento y sucede atravesando una serie de cambios celulares graduales que van desde los estadios pre-malignos hasta los malignos por lo que el sistema inmune se aclimata de forma lenta; todo lo

contrario con lo que ocurre en los tumores trasplantables en los cuales debido a la forma de crecimiento el mismo se expone abruptamente. Estas variaciones cinéticas pueden conducir a diferentes consecuencias inmunológicas tales como tolerancia, activación y por último estos tumores generalmente no son metastásicos por lo que el uso de los mismos hace que no sean considerados relevantes para evaluar la eficacia de las vacunas de cáncer.

No obstante estas limitaciones obvias algunos tumores trasplantables tienen ventajas experimentales que los distinguen de otros, como lo son las variantes altamente metastizantes y el tratar de establecer el perfil tumoral de estos sistemas apropiándolos al uso del protocolo experimental.

CONSIDERACIONES PARA LA EXPERIMENTACION CON ANIMALES PORTADORES DE TUMOR, NORMAS ETICAS Y ESTABLECIMIENTO DEL PUNTO FINAL DE ESTOS EXPERIMENTOS

Para poder apropiarse el Sistema Experimental al protocolo experimental que vamos a utilizar podríamos preguntarnos cuáles serían las consideraciones mínimas para la experimentación con un modelo animal portador de tumor.

- ¿Es el surgimiento del tumor del ratón comparable con el del humano?
- ¿La progresión tumoral y las etapas son similares?
- ¿La patología tumoral del animal es similar a su contraparte humana?
- ¿Es la extensión de la carga tumoral comparable?
- ¿Tienen estos tumores respuestas hormonales similares?
- Si la terapia en el humano está diseñada para el tratamiento de enfermedad metastásica en un escenario post-quirúrgico ¿Es el modelo animal el apropiado?.
- Si los pacientes a tratar están inmunocomprometido a causa de su edad ¿El modelo animal tiene similitud en el inmunocompromiso?.

De ser positivas estas respuestas estaríamos acercándonos al modelo apropiado y tendríamos en la mano una buena herramienta de trabajo para la lucha contra esta terrible enfermedad, en este sentido están dirigidos todos los esfuerzos de nuestro grupo de trabajo.

De hecho algunos de estos agentes inmunoterapéuticos cuya eficacia fueron probados en los Sistemas Experimentales pre-establecidos han sido llevados a la clínica con éxito, extendiendo y mejorando la calidad de vida de los pacientes oncológicos.(1,7)

Por otro lado se conoce que hay muchas respuestas en las investigaciones oncológicas que solo pueden ser respondidas en estudio de tumores creciendo in vivo y que es necesario tratar de minimizar la angustia y el dolor en los animales portadores de estos tumores por lo que instituímos una normativa para este trabajo guiándonos por las recomendaciones de la "Guía para el bienestar Animal en las Neoplasias Experimentales" (14), sobre todo para predecir y reconocer los efectos adversos y establecer el punto final de los experimentos con animales portadores de tumor de forma humanitaria.

Para esto es necesario:

1. Saber reconocer los signos de pena, pérdida del confort y angustia de los animales portadores de tumores de la especie que se está utilizando
 - En animales con tumores sólidos debe de incluirse: La ulceración.
 - En animales con tumores ascíticos: La distensión del tejido y la caquexia.
 - En animales con linfomas: El compromiso linfático.
 - En animales con tumores cerebrales: Los disturbios neurológicos.
2. Conocer la severidad de los procedimientos utilizados
 - Sitio de inoculación (ejemplo la vía subcutánea se tolera mejor que la intramuscular o la intraperitoneal).
 - Obtención de muestras (ejemplo Extracción de sangre del seno orbital es mas severo que la extracción de la vena de la cola)
3. Conocer la biología del tumor que se está trabajando. Se debe de establecer el perfil tumoral conociendo:
 - Prendimiento
 - Velocidad de crecimiento
 - Invasión
 - Distensión
 - Ulceración
 - Metástasis
 - Sitio de inoculación
 - Producción de factores de caquexia
4. Controlar adecuadamente a los animales para verificar efectos individuales del tumor y/o del tratamiento aplicado.
 - Conociendo la biología de la especie que se está trabajando.

Para establecer el punto final en animales portadores de tumores nosotros nos guiamos por los siguientes signos y establecimos nuestra normativa:

- Anorexia persistente o deshidratación
- La carga tumoral en animales involucrados en experimentos terapéuticos no debe exceder del 10% de su peso ejemplo 17 mm en un ratón de 25 g o 35 mm en una rata de 250 g
- Incapacidad para mantener posición normal o para moverse
- Atrofia o emaciación muscular
- Moribundo, letárgico o fallo en la respuesta a estímulos suaves
- Hipotermia
- Tumores ulcerados o tan grandes que interfieran con el movimiento normal.
- Distensión abdominal significativa o donde la carga de ascitis exceda del 10% del peso corporal básico.
- Incontinencia o diarrea prolongada.
- Respiración laboriosa, Descargas sanguinolenta o muco purulenta por cualquier orificio, particularmente si esta acompañada por descargas nasales y/o cianosis

Si alguno de estos signos esta presente en el animal este debe ser eliminado de forma humanitaria inmediatamente.

CONCLUSIONES

El uso de biomodelos para el cáncer, particularmente ratones y ratas han aportado muchos conocimientos y esta plenamente justificado su uso por los beneficios que han aportado a la humanidad.

En la fase pre-clínica de las investigaciones en esta enfermedad es necesario contar con modelos experimentales que porten tumores para poder facilitar la valoración inicial de la eficacia de nuevos agentes antitumorales, sin embargo los estudios en las neoplasias experimentales presentan problemas particulares de esta enfermedad y generalmente los investigadores y técnicos involucrados en este trabajo tienen poco conocimiento de los Sistemas Experimentales y la biología de los animales utilizados.

El establecimiento de nuevos modelos que se acerquen o que den mejor respuesta a todas las interrogantes que existen para librar a la humanidad de este mal que es el cáncer aún no han cesado y es un reto para todo investigador dedicado a este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. Crombet, T., Osorio, M., Cruz, T., Roca, C., Del Castillo, R., Mon, R., IznagaEscobar, N., Figueredo, R., Koropatnic, J., Renguinfo, E., Fernández, E., Alvarez, D., Torres, O., Ramos, M., Leonard., Pérez, R., Lage, A. 2004. Use of the humanized anti-Epidermal Growth Factor Receptor monoclonal antibody h-R3 in combination with radiotherapy in the treatment of locally advance Head and Neck cancer patients. *Journal of clinical Oncology*.22:1646-1654.
2. Díaz, A., Suarez, E., Blanco, R., Baída, T., Rivero, D., López-Requena, A, López, A., Montero, E. 2007. Functional expression of human-epidermal- growth-factor receptor in a melanoma cell line. *Biotechnol Appl Biochem*. 48(Pt 1):21-7.
3. Duconge, J., Fernández-Sánchez, E., Macías, A., Castillo, R., García, I., Beausoleil, I., Amador, J.F., Matheu, J. 2002. Monoclonal anti-EGF receptor antibody (ior-R3) pharmacokinetic study in tumor bearing nude mice: role of the receptor-mediated endocytosis on drug clearance. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 27(2):101-5.
4. Duconge, J., Castillo, R., Crombet, T., Alvarez, D., Matheu, J., Vecino, G., Alonso, K., Beausoleil, I., Valenzuela, C., Becquer, M.A., Fernández-Sánchez, E. 2004. Integrated pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling and allometric scaling for optimizing the dosage regimen of the monoclonal ior EGF/r3 antibody. *Eur J Pharm Sci*. 21(2-3):261-70.
5. Garrido, G., Sánchez, B., Rodríguez, H.M., Lorenzano, P., Alonso, D., Fernández, L.E. 2004. 7A7 MAb: a new tool for the pre-clinical evaluation of EGFR-based therapies. *Hybrid Hybridomics*. 23(3):168-75.
6. Garrido, G., Lorenzano, P., Sánchez, B., Beausoleil, I., Alonso, D.F., Pérez, R., Fernández, L.E. 2007 .T cells are crucial for the anti-metastatic effect of anti-epidermal growth factor receptor antibodies. *Cancer Immunol Immunotherapy*. 56(11):1701-10.
7. González, G., Crombet, T., Torres, F., Catala, M., Alfonso, L., Osorio, M., Neningen, E., García, B., Mullet, A., Pérez, R., Lage, A. 2003. Epidermal Growth Factor-based cancer vaccine for non-small-cell lung cancer therapy. *Annals of Oncology*. 14:461-466.
8. Ludger, Wess. 2004 *BioCentury*, June 28
9. Mestas, Javier., Hughes, Christopher C.W. 2004. Of mice and not men: Differences between mouse and human immunology. *The Journal of Immunology*. 172:2731-2738
10. Montero, E., Amador, J.F., Pérez, R., Lage, A. 2000. Tumor-specific immunotherapy based on dominant models of natural tolerance. *Med Hypotheses*. 54(4):531-6.
11. Montero, E., Alonso, L., Perez, R., Lage, A. 2007. Interleukin-2 mastering regulation in cancer and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci*. 1107:239-50.

12. Ostrand-Rosenberg, S. 2004. Animal models of tumor immunity, immunotherapy and cancer vaccines. *Current Opinion in Immunology*. 16(2):143-50.
13. Srivastava, P. K. 2000. Immunotherapy of human cancer: lessons from mice. *Nature Immunology* 1, 363 - 366
14. UK Co-ordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR) segunda Edición
15. Vázquez, A.M., Gabri, M.R., Hernandez, A.M., Alonso, D.F., Beausoleil, I., Gómez, D.E., Pérez, R. 2000. Antitumor properties of an anti-idiotypic monoclonal antibody in relation to N-glycolyl-containing gangliosides. *Oncol Rep*. 7(4):751-6.