



Aspectos claves para el desarrollo de modelos murinos en investigaciones biomédicas sobre el cáncer de páncreas

Rolando Dario Rosales Campos¹, Diana Esperanza Monet Alvarez², Daniela Martínez Vega³, Dr. Héctor José Pérez Hernández⁴

- 1- Estudiante de 4^{to} año de Medicina. Alumno Ayudante de Cirugía General. Universidad de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba. Facultad de Medicina No.1. Correo electrónico: rolandodario@nauta.cu Orcid: <http://orcid.org/0000-0003-2711-9004>
- 2- Estudiante de 4^{to} año de Medicina. Alumno Ayudante de Inmunología. Universidad de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba. Facultad de Medicina No.1. Correo electrónico: esperanza71199@icloud.com Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-0996-874X>
- 3- Estudiante de 3er año de Medicina. Universidad de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba. Correo electrónico: dm0437489@gmail.com Orcid: <http://orcid.org/0000-0002-0541-3838>
- 4- Doctor en Medicina. Residente de 2do año de Inmunología. Hospital Provincial Clínico Quirúrgico Docente Saturnino Lora, Santiago de Cuba. Correo electrónico: hectorinmunologia@gmail.com Orcid: <http://orcid.org/0000-0002-4628-7436>

Autor para la correspondencia: Rolando Dario Rosales Campos. Teléfono: +53 54965418. Correo electrónico: rolandodario@nauta.cu

Institución: Universidad de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba. Hospital Ptovinial Saturnino Lora, Santiago de Cuba. Cuba

Resumen

Introduction: The transcendental role of murine models is exemplified by advances in understanding one of the most lethal tumors with the worst prognosis, pancreatic cancer.

Objective: To describe the key aspects that allow the development and selection of murine models in biomedical research applied to pancreatic cancer.

Method: Scientific information was accessed through Scielo, Lilacs, Ebsco, Medline, by introducing the descriptors pancreatic ductal adenocarcinoma; murine models in pancreatic cancer and murine models. Articles in Spanish and English referring to the topic were selected.

Conclusions: Preclinical studies in murine models have laid the foundations for understanding the different routes and molecular mechanisms involved in the genesis and progression of the disease, later contrasted in studies in humans, which, being different organisms, justifies that laboratory results are not exactly reproducible in humans.

Palabras clave: adenocarcinoma ductal pancreático; modelos murinos en el cáncer de páncreas; modelos murinos

Introducción

El cáncer de páncreas (CDP) es el decimosegundo cáncer más frecuente, con 495 773 casos a nivel mundial en el 2020, mientras que constituye la séptima causa más alta de mortalidad por cáncer en el mundo con 466 003 en el mismo año, en ambos sexos y en



todas las edades, según datos estadísticos mostrados por el Observatorio Mundial de Cáncer. Las tasas de incidencia varían significativamente entre regiones, es más alta en Asia donde se reportó en el 2020 el 47,1 % de los casos, y solo el 3,4 % en África, al igual que las tasas de mortalidad.¹ El CDP ocupa el cuarto lugar en frecuencia como causa de muerte en Estados Unidos.² En el 2016 en Cuba constituyó la décima y la séptima causa de mortalidad por cáncer en hombres y mujeres mayores de 60 años respectivamente, para un total de 670 defunciones.³

El tipo histológico más frecuente es el adenocarcinoma ductal (ACDP) localizado en la cabeza.⁴ Uno de los primeros eventos genéticos implicados en la patogénesis de ACDP es una mutación en el punto de activación del oncogén KRAS, que se encuentra en más del 90% de los casos.⁵

Con vistas a conseguir un diagnóstico precoz se está avanzando mucho en la investigación de los perfiles genéticos del Cáncer de páncreas, en los cuales se han observado con valor predictivo determinados Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) mediante Estudio de asociación del genoma completo (GWAS), ejemplos de ellos, referidos con sus números Rs, como: Rs6971499, Rs9581943, Rs16986825, Rs1561927, Rs2736098 y Rs7190459. Sin embargo la capacidad de poder hacer extensiva esta tecnología aún es limitada por sus altos costos.⁶ Las aberraciones genéticas posteriores incluyen la inactivación de genes supresores de tumores, que incluyen CDKN2A, TP53 y SMAD4, c-Myc o Hedgehog, y contribuyen a la evolución histológica de las lesiones precursoras. Las lesiones mucino productoras comparten mutaciones similares, incluidas mutaciones puntuales en el oncogén de KRAS y mutaciones de inactivación en p53 y p16.^{7,8}

Los modelos in vivo de cáncer de páncreas en animales pequeños fiables y clínicamente relevantes son un requisito previo indispensable para comprender mejor los procesos fisiopatológicos subyacentes que impulsan la carcinogénesis pancreática y la progresión del cáncer. Para que sean clínicamente relevantes, por un lado, dichos modelos animales deben imitar las características fenotípicas de la enfermedad humana lo más fielmente posible y, por otro lado, los patrones subyacentes de alteraciones genéticas idealmente también deberían reflejar los observados en homólogos humanos. Los modelos murinos de cáncer de páncreas han recorrido un largo camino para abordar muchos de estos requisitos clave, pero aún existen ciertas deficiencias.⁹ Por lo que se propone como objetivo describir los aspectos claves que permiten el desarrollo y selección de modelos murinos en investigaciones biomédicas aplicadas al cáncer de páncreas.

Método

Se accedió a información científica a través de las bases de datos disponibles mediante Infomed, tales como Medline, Scielo, Lilacs, Ebsco, entre otras, además de la amplia red de Revistas Cubanas de Salud, mediante de descriptores tales: adenocarcinoma ductal pancreático; modelos murinos en el cáncer de páncreas; modelos murinos y sus respectivas traducciones al inglés, seleccionándose un total de 73 artículos en idioma español e inglés referentes al tema, en base a su actualidad y trascendencia así como lo innovador del diseño de experimentación, utilizándose como métodos:

- *Revisión documental:* la cual permitió obtener una gran información sobre el tema de estudio, adquirida a través del acceso a las diferentes bases de datos de salud nacionales e internacionales disponibles a través de Infomed.
- *Analítico-sintético:* Después de una minuciosa revisión, se crearon fichas bibliográficas, se analizó toda la información recolectada y se sintetizó de manera tal que permitió resumirla en las páginas de este trabajo.



Desarrollo

Antecedentes históricos del uso de modelos pancreáticos en las investigaciones del cáncer de páncreas.

Un paso importante en la historia de los modelos de ratón humanizados fue la generación de una cepa de ratón inmunodeficiente, que permitió el injerto de células humanas. El trasplante de células humanas o tejidos tumorales en ratones desnudos atímicos comenzó en la década de 1960, pero pasaron casi 20 años antes de que los ratones CB17-Prkdcscid estuvieran disponibles.¹⁰

Los primeros intentos de modelar el cáncer de páncreas comenzaron en la década de 1980 cuando se desarrollaron tecnologías para generar ratones transgénicos portadores de oncogenes. Estos primeros modelos utilizaron el promotor de elastasa o el promotor de insulina de rata (RIP) para impulsar la expresión del oncogén viral SV40 en células acinares y células del páncreas de ratón, respectivamente. Los ratones RIP-Tag desarrollaron insulinomas y los ratones Elastase-SV40 desarrollaron carcinomas de células acinares. Los ratones Elastasa-SV40 también desarrollaron tumores de células de los islotes e hiperplasia de células de somatostatina, pero no desarrollaron PanIN o PDAC.¹¹

Otros intentos de producir modelos de ratón transgénico también utilizaron el promotor de elastasa para sobreexpresar oncogenes humanos en el páncreas de ratón. En 1987, Quaife et al. H-ras normal y mutante sobreexpresado usando el promotor de elastasa. Los ratones que expresaban H-ras normal desarrollaron hiperplasia y displasia de células acinares, mientras que la mayoría de los ratones que expresaban H-ras mutante murieron como recién nacidos; los que sobrevivieron fueron mosaico para H-ras y murieron de tumores pancreáticos entre 1,5 y 14 meses. La sobreexpresión de TGF- β en células acinares no indujo tumores pancreáticos, sin embargo, los ratones desarrollaron lesiones que se asemejan a la metaplasia acinar-ductal y fibrosis pancreática, y fue uno de los primeros modelos de ratón en sugerir un origen de células acinares para PDAC.¹¹

En 1991, Sandgren et al. publicó un modelo de ratón transgénico elastasa-cmyc. Estos ratones desarrollaron tumores con una histología mixta acinar / ductal entre los 2 y 7 meses de edad, sin embargo, las características ductales no se observaron hasta las etapas posteriores del desarrollo del tumor y no se observaron PanIN en este modelo.¹¹

En 2003, Grippo et al. sobreexpresó una mutación activadora común de Kras en las células acinares pancreáticas. Los ratones supervivientes desarrollaron hiperplasia de células acinares multifocal y, con menos frecuencia, la formación de complejos tubulares. En ratones más viejos, también se observaron metaplasia acinar a ductal y lesiones tempranas de PanIN. Si bien no se desarrollaron tumores en estos ratones, este modelo demostró que la activación de Kras en las células acinares podría resultar en el desarrollo de precursores de PDAC y sugirió que pueden ser necesarios eventos genéticos adicionales para la tumorigénesis pancreática.¹¹

Modelos de ratón diseñados genéticamente (GEMM).

El desarrollo de modelos de ratón de cáncer de páncreas ha progresado desde los esfuerzos iniciales que utilizaban la expresión transgénica simple de oncogenes hasta sistemas sofisticados más recientes que empleaban la tecnología Cre-Lox para generar



ratones mutantes compuestos con activación o inactivación específica de genes específicamente implicados en el linaje del PDAC humano. La mayoría de los GEMM se basan en la activación del oncogén Kras, que se puede encontrar en > 95% en el PDAC humano¹² seguido por la inactivación de los genes supresores de tumores CDKN2A (INK4A / ARF), TP53 y SMAD4. Sin embargo, la sola inactivación de cada uno de estos genes en el páncreas de ratón no da como resultado ningún fenotipo y debe combinarse con Kras mutante para inducir PDAC.¹¹

Los modelos de ratón genéticamente modificados (GEMM) tienen el potencial de recapitular fielmente muchas de las características clínicas clave observadas en los cánceres de páncreas humanos, como el desarrollo de tumores primarios intrapancreáticos de crecimiento invasivo y de rápida evolución, diseminación metastásica temprana a los ganglios linfáticos regionales y sitios de órganos distantes, ascitis maligna y caquexia tumoral. Además, dado que se trata de modelos singénicos que llevan un sistema inmunológico intacto, también permiten estudios sobre vigilancia inmunológica o enfoques inmunoterapéuticos como el uso de inhibidores de puntos de control. Además, el GEMM actual imita fielmente todo el espectro de carcinogénesis pancreática a través de lesiones precursoras premalignas, a saber, mPanIN, MCN o IPMN, incorporando ejemplos de aberraciones típicas tempranas (por ejemplo, Kras) y tardías (por ejemplo, p53). De interés, el sistema murino parece requerir menos alteraciones del conductor para desarrollar un fenotipo tumoral completamente invasivo y metastásico, con solo dos o tres alteraciones oncogénicas requeridas para la transformación maligna. Esto se opone a los tejidos humanos, donde el número de alteraciones genéticas requerido para la transformación maligna es supuestamente considerablemente más alto, con cánceres de páncreas humanos con frecuencia llevan alrededor de 50 o más alteraciones oncogénicas.⁹

Modelos Kras

Un gran avance en el desarrollo de GEMM de PDAC se produjo con la llegada del ratón LSL-KrasG12D. Este ratón alberga un alelo Kras mutante knockin que contiene una transición de glicina a ácido aspártico en el codón 12, aguas arriba del cual reside un casete STOP condicional flanqueado por sitios LoxP, que evita la expresión del alelo mutante. Cuando se combina con una recombinasa Cre específica de tejido, el casete STOP se escinde dando como resultado la activación constitutiva de Kras a niveles fisiológicos. Esta mutación representa la mutación activadora de Kras más común observada en PDAC humano, una de las semejanzas más sorprendentes.^{11, 12}

Esto se logró cruzando ratones con un alelo Kras activado condicional (LSL-KrasG12D) con cualquiera de las dos cepas ampliamente utilizadas que expresan Cre recombinasa bacteriana en linajes progenitores pancreáticos (transgénicos Pdx1-Cre o Ptf1a / p48Cre cepas knock-in).^{11, 12, 13}

Estos GEMM forman la lesión precancerosa denominada neoplasia intraepitelial pancreática (PanIN) con 100% de penetrancia y desarrollan PDAC que se asemeja a la enfermedad humana, a una edad avanzada (> 12 meses), lo que sugiere que se requieren alternancias adicionales antes de que progrese la malignidad. Las lesiones en estos ratones expresaron marcadores similares al PDAC humano, incluido el objetivo de señalización Notch Hes1, COX2 y MMP7.^{11, 12}

Este modelo demostró que la activación de Kras es suficiente para inducir precursores de PDAC y, en algunos casos, progresar a PDAC invasivo y metastásico y desde entonces se ha convertido en la columna vertebral para el desarrollo de muchos otros modelos de PDAC en ratón. Una de las limitaciones del LSL-KrasG12D; El modelo Pdx1-Cre (también conocido como KC) es que la activación de Kras está dirigida al páncreas embrionario, y



los PanIN se desarrollan poco después del nacimiento. Sin embargo, PDAC ocurre en personas mayores a través de mutaciones estocásticas en el páncreas adulto. Guerra y col. desarrolló un modelo que permitía el control temporal de la activación de Kras en el páncreas mediante un sistema Tet-off. Similar al modelo KC, cuando Kras se activó en el páncreas en desarrollo en E16.5, Kras + / LSL-G12VGeo; Los ratones Elas-tTA / tetOCre desarrollaron de acinar a metaplasia ductal progresando a PanIN de alto grado a los 12 meses de edad, una proporción de los cuales pasó a formar PDAC después de una larga latencia. Sin embargo, la activación de Kras en ratones de 10 días retrasó significativamente la formación de PanIN y redujo la incidencia de PDAC. Es importante destacar que la activación de Kras en ratones adultos no tuvo ningún efecto en las células acinares, lo que indica que las células acinares maduras son resistentes a la transformación por Kras oncogénico. El PDAC invasivo podría inducirse en estos ratones cuando se tratan con ceruleína para inducir pancreatitis crónica, lo que indica que la pancreatitis aumenta el conjunto de células susceptibles de transformación por KrasG12V, precursores potencialmente acinares. Además, este modelo apoya el vínculo entre la pancreatitis y un mayor riesgo de desarrollar PDAC, y proporciona un modelo valioso para investigar el papel de la inflamación inducida por pancreatitis en la tumorigénesis. Si bien estos modelos han demostrado que dirigir Kras mutante al páncreas del ratón es suficiente para inducir PDAC en ratones, la penetrancia incompleta y la latencia prolongada observadas en estos modelos sugirieron que eventos genéticos adicionales podrían aumentar la incidencia de tumores en ratones y acelerar la progresión tumoral. Desde la generación de estos modelos PDAC inducidos por Kras, se han desarrollado muchos otros modelos que combinan mutaciones de Kras con otros genes que supuestamente son impulsores de PDAC, como en genes supresores de tumores como p53 y p16 que comúnmente acompañan a PDAC humano, se desarrollaron GEMM adicional con mutación concomitante de p53 y p16 / p19.^{11,12}

En un estudio se utilizaron ratones modificados genéticamente KPC (KRas^{LSL.G12D/+}; p53^{LSL.R172H/+}; PdxCre) con el objetivo de detectar tempranamente el cáncer de páncreas mediante técnicas de imagen y la señalización de la respuesta al daño del ADN, los cuales se alojaron en jaulas ventiladas individualmente en grupos de hasta 5 por jaula del mismo sexo en una instalación con un ciclo artificial día-noche y acceso libre a agua y alimentos. Se realizaron imágenes de γ H2AX 24 h después de la administración intravenosa de 111In-anti- γ H2AX-TAT (5 MBq, 5 μ g). Para investigar el efecto de la inflamación pancreática sobre la captación de 111In-anti- γ H2AX-TAT, en un estudio separado se administró ceruleína a ratones BALB / c (n = 4 por grupo) a través de una serie de inyecciones intraperitoneales de 6 horas para inducir pancreatitis aguda. Se administró 111In-anti- γ H2AX-TAT por vía intravenosa 150 min después de la última inyección de ceruleína, y se realizaron imágenes de SPECT / CT 24 h después. Los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical; se extrajeron órganos, tejidos y sangre seleccionados; y se calculó el porcentaje de dosis inyectada por gramo (% DI / g) de cada muestra. El tejido pancreático se congeló instantáneamente con hielo seco y se almacenó a -80 ° C hasta que se requiriera para su posterior procesamiento. Demostrando que este modelo de ratón modificado genéticamente reproduce la hiperactivación de la maquinaria DDR observada en PanIN y PDAC humanos, medida por inmunotinción γ H2AX y se observó poca o ninguna tinción de γ H2AX en tejido acinar normal, en las lesiones precursoras anteriores (PanIN-1) o en áreas de infiltración de linfocitos marcada, y observamos poca tinción de γ H2AX en lesiones de PanIN-2 y en regiones de PDAC. Sin embargo, hubo una marcada tinción de γ H2AX en todas las áreas de las lesiones precursoras de alto grado (PanIN-3).¹⁴

En un segundo estudio que evaluaba el papel de la metformina en la supresión en el inicio y la progresión del cáncer en modelos genéticos de cáncer de páncreas en ratones



Se adquirieron ratones Pdx1-Cre, ratones LSL-KrasG12D y ratones Trp53fl / fl. La cría de LSL-KrasG12D; los ratones transgénicos Pdx1-Cre (KC) se lograron cruzando ratones LSL-KrasG12D con ratones Pdx1-Cre. LSL-KrasG12D / +; Trp53fl / +; se obtuvieron ratones Pdx1-Cre (KPC) cruzando en primer lugar ratones Trp53fl / fl con ratones Pdx1-Cre para generar Trp53fl / fl; descendencia de Pdx1-Cre. Trp53fl / fl; luego se cruzaron ratones Pdx1-Cre con ratones LSL-KrasG12D para generar animales KPC. Todos los ratones se alojaron en condiciones libres de patógenos y con acceso libre al agua y comida. Además, para inducir la pancreatitis crónica, se administró diariamente ceruleína mediante inyección intraperitoneal (0,1 ml de una solución de 50 mg / ml en solución salina) 5 días a la semana. Los ratones se trataron durante 4 semanas consecutivas y se dejaron recuperar durante 1 semana antes de recolectar el tejido.¹⁵

Estos autores pudieron comprobar que los modelos de ratón diseñados genéticamente tienen el potencial de simular las características histopatológicas de la neoplasia pancreática invasiva y no invasiva y, por lo tanto, facilitar el desarrollo de estrategias preventivas y terapéuticas para PDAC, así como el progreso de nuevas pruebas para la detección temprana de neoplasias pancreáticas. También, encontraron que en las lesiones tempranas de mPanIN, las lesiones se presentaban como lesiones epiteliales planas compuestas por células columnares con núcleos de localización basal y mucina supranuclear. En mPanIN tardío, el epitelio plano se convirtió en estructuras papilares acompañadas de anomalías nucleares, incluida la pérdida de polaridad y el apiñamiento nuclear. El PDAC en los ratones modificados genéticamente se presentó como un caos de la arquitectura y las células cancerosas intercaladas en abundante estroma. Se realizó tinción con tricrómico de Masson para observar la reacción desmoplástica durante la progresión de PDAC. Encontramos que la tinción tricrómica de Masson se detectó en lesiones precursoras tempranas como ADM y mPanIN1, y se exacerbó cuando las lesiones progresaron a mPanIN tardío y PDAC invasivo. De acuerdo con el tricrómico de Masson, se detectó tinción de α -SMA y mostró una tendencia creciente desde la mPanIN temprana a la PDAC invasiva. Estos resultados reforzaron la semejanza del inicio y la progresión del cáncer de páncreas en ratones y pacientes humanos modificados genéticamente.¹⁵

Xenoinjertos vs. Injertos ortópicos en la creación de modelos murinos de PDAC

Xenoinjertos

La mayoría de los modelos de xenoinjerto hasta la fecha utilizan células de cáncer de páncreas cultivadas, que normalmente pueden generarse mediante la implantación subcutánea quirúrgica de trozos de tejido tumoral en ratones inmunodeprimidos, generalmente en la espalda o los flancos.^{9,12}

Sin embargo, aunque los ratones desnudos se han utilizado durante más de 50 años y fue el primer modelo animal para el injerto de tumores, los ratones NOG, NSG y BRG aceptan más las células humanas trasplantes (incluso de células cancerosas), por lo que se utilizan ampliamente en la investigación del cáncer.¹⁶

Estas muestras de tejido tumoral se pueden obtener a partir de muestras de tumores primarios recién resecados, o se pueden generar a partir de tumores de xenoinjerto recolectados previamente, que se toman alícuotas en pequeños bloques de tejido con longitudes laterales de generalmente aproximadamente 1 mm que luego se reimplantan en serie por vía subcutánea. Alternativamente, las suspensiones de células tumorales, obtenidas de muestras de tejido picado o de líneas de células cancerosas cultivadas in vitro, pueden inyectarse directamente por vía subcutánea. Se descubrió que la adición



de matrigel mejora sustancialmente la eficiencia general de este procedimiento, lo que conduce a tasas más altas de toma de tumores.⁹

Varias cepas de ratones inmunodeprimidos se han utilizado como huéspedes, más comúnmente ratones desnudos atímicos, que carecen de una respuesta inmune de células T funcional, o ratones inmunodeficientes combinados graves (SCID), con una respuesta inmune defectuosa basada en células T de banda. Debido a la vigilancia inmunitaria deficiente, las células cancerosas humanas neoplásicas pueden sobrevivir y proliferar en estos ratones, mientras que las células estromales no neoplásicas del microambiente tumoral son reemplazadas gradualmente por contrapartes murinas, por lo que son altamente enriquecedoras para el compartimento de células neoplásicas. Este efecto puede ser particularmente útil para estudios traslacionales ya que el cáncer de páncreas humano se caracteriza típicamente por una reacción desmoplásica extensa, y las células neoplásicas reales a menudo representan solo una pequeña fracción de menos del 10% del tejido tumoral. Por lo tanto, se ha ampliado y enriquecido este compartimento de células neoplásicas mediante xenotrasplantes utilizado con éxito para expandir tejido para estudios traslacionales, como el cribado de alteraciones genéticas y genes expresados de forma aberrante o para evaluar la respuesta a una intervención terapéutica.⁹

El grado de inmunosupresión aparentemente juega un papel importante en la limitación de la supervivencia de las células neoplásicas; por ejemplo, se observó que incluso las lesiones precursoras de neoplasias mucinosas papilares intraductales premalignas (IPMN) pueden cultivarse como xenoinjertos en ratones NOD / SCID / IL2Rgamma (nulos) gravemente inmunodeprimidos, mientras que esto generalmente no tiene éxito en ratones desnudos atímicos simples. Es de destacar que se ha descubierto que la histología tumoral y los perfiles genómicos de las células cancerosas están muy conservados y reflejan fielmente los tejidos tumorales parentales incluso durante varios ciclos de trasplantes in vivo en serie.⁹

Aunque tal sistema permite el estudio de eventos genéticos aislados in vivo, no logra replicar la heterogeneidad genética inter e intratumoral y la complejidad del microambiente tumoral. Para abordar este último problema, se desarrollaron modelos de xenoinjertos ortotópicos (en latín: "lugar correcto") para que las células tumorales puedan implantarse en el órgano en el que se originó el cáncer. La heterogeneidad genética y la complejidad del PDAC humano se abordó aún más mediante el uso de tejido derivado del paciente.¹²

Xenoinjertos derivados de pacientes (PDX)

Los PDX se basan en la transferencia de una pequeña porción guardada como stock primario de tejido tumoral primario directamente del paciente a un ratón inmunodeficiente. Los modelos PDX se mantienen pasando las células directamente de un ratón a otro una vez que la carga tumoral se vuelve demasiado alta. Estos modelos utilizan fragmentos tumorales directamente del tumor primario y mantiene la estructura completa del tumor parental humano durante los pases iniciales, y como tal es un modelo excelente para evaluar regímenes de fármacos quimioterapéuticos personalizados en una fase preclínica. Suelen generarse mediante la implantación subcutánea u ortotópica directa de trozos de tejido recién resecados de tumores primarios o lesiones metastásicas, respectivamente, en ratones inmunodeprimidos, evitando la necesidad de una propagación intermedia ex vivo.^{9,11,12}

El establecimiento de los tumores primarios del xenoinjerto inicial ocurre típicamente con una latencia relativamente larga que varía de unas pocas semanas a varios meses, y las tasas de toma de tumores varían mucho de alrededor del 10% a casi el 100% entre



los diferentes informes, dependiendo de los respectivos procedimientos y protocolos seguidos. Una vez establecidos, los tumores de xenoinjerto pueden recolectarse y reimplantarse en serie en nuevas cohortes de ratones, expandiendo así la cantidad de tejido disponible para estudios traslacionales o caracterización genómica. Ahora se ha descrito bien que tales xenoinjertos tienen la capacidad de mantener fielmente la fidelidad genómica, las características histopatológicas y la capacidad de respuesta a la intervención terapéutica durante varias rondas de pases in vivo. Expresión de tumores específicos.⁹

Los PDX se han utilizado ampliamente para la investigación y caracterización de numerosos agentes terapéuticos anticancerosos, así como para el estudio de la biología tumoral, las interacciones tumor-huésped, el microambiente tumoral, la eficacia preclínica y la quimiorresistencia. Todo ello justificado por ventajas tales como una evaluación rápida de "primer paso" de la eficacia del fármaco; junto a la retención de las características del tumor (genotipo, fenotipo, estroma) durante el pase, y que estos xenoinjertos representan fielmente el tumor original del paciente del que se derivaron. Además de la facilidad de medir el crecimiento tumoral y de lo económico que resulta. Esto ha sido abordado recientemente por varios estudios, que colectivamente demostraron la estabilidad genómica de genes clave relacionados con el cáncer de páncreas hasta al menos la tercera generación de expansión (3 pases).^{11,12}

Es de destacar que algunos estudios también han informado de que las tasas de respuesta de la PDX a varios fármacos contra el cáncer en uso clínico son similares a la tasa de respuesta global registrada para los ensayos clínicos en monoterapia con estos fármacos. Con esta evidencia que confirma fuertemente la estabilidad genómica y arquitectónica de los tumores, el modelo PDX ha vuelto a favorecer recientemente para impulsar los descubrimientos en biomarcadores que predicen la respuesta terapéutica a terapias nuevas y establecidas, permiten estudios sobre los mecanismos moleculares de la quimiorresistencia y también facilitan la prueba de estrategias de medicina personalizada mediante la administración de tratamientos objetivo basados en la firma genómica / molecular de cada tumor / paciente individual.¹¹

Por otro lado, una de las principales deficiencias de los modelos PDX es la falta de un sistema inmunológico intacto, ya que los ratones inmunodeprimidos deben usarse como huéspedes, lo que dificulta enormemente su relevancia para su uso en estudios traslacionales que examinan conceptos inmunoterapéuticos. A pesar de las limitaciones, estos modelos han identificado agentes clínicamente eficaces y siguen siendo una herramienta principal en la investigación del cáncer.^{9,12}

Actualmente se están realizando varios esfuerzos para desarrollar modelos de xenoinjertos humanizados que imiten completamente la respuesta inmune nativa y en los que las interacciones específicas entre el tumor humano y las células inmunes se puedan estudiar de manera clínica manera relevante. Por ejemplo, Wulf-Goldenberg et al. describió recientemente un modelo en el que células sanguíneas de cordón umbilical humano CD34 + se implantan intrahepáticamente en ratones NOD / SCID-IL 2R-gamma-null (NSG). Curiosamente, los autores pudieron demostrar un injerto exitoso de linfocitos T CD4 + y CD8 + humanos, así como de células B. Actualmente, varios grupos están evaluando varios protocolos, que comprenden diferentes fuentes de células CD34 +, modos de aplicación y cepas de ratón con diferentes antecedentes genéticos. Los linfocitos B de estos ratones permanecen inmaduros, y estos ratones carecen de respuestas inmunitarias adaptativas ya que sus células T no son educadas por el timo murino. Otro enfoque es el trasplante intravenoso de células mononucleares de sangre periférica humana, que contienen células T CD4 + y CD8 +, linfocitos B y células asesinas naturales, en ratones inmunodeprimidos.^{9, 11}



Otra de las desventajas que limitan su uso es que las líneas celulares inmortalizadas son homogéneas, por lo que no recapitulan la heterogeneidad evidente entre los pacientes con cáncer de páncreas; el microambiente tumoral no refleja la situación clínica debido a la ausencia de estroma humano; los tumores no reflejan la histopatología del tumor primario; el crecimiento del tumor se produce lejos del origen del tejido del tumor; los regímenes farmacológicos observados que son curativos en estos modelos a menudo no reflejan la respuesta clínica en la enfermedad humana; y los tumores rara vez hacen metástasis, debido a su localización subcutánea.¹²

Los enfoques de secuenciación recientes (exoma completo y secuenciación del genoma completo) han identificado la heterogeneidad genómica sustancial que caracteriza al cáncer de páncreas. Con los modelos de xenoinjertos basados en líneas celulares, esta heterogeneidad no se tiene en cuenta y, por lo tanto, estos modelos sobreestiman sustancialmente los efectos antitumorales de una estrategia terapéutica determinada. La incapacidad de estos modelos de xenoinjerto convencionales para predecir de forma fiable la eficacia clínica es una de las razones citadas con más frecuencia para la alta tasa de fracaso de las nuevas terapias contra el cáncer en los ensayos clínicos.¹¹

Debido a la heterogeneidad del cáncer de páncreas, la firma molecular del tumor de un individuo es muy compleja y puede implicar aberraciones en numerosas vías de señalización. Como tal, el uso de múltiples agentes terapéuticos dirigidos a estos mecanismos puede administrarse y evaluarse en paralelo entre sí y compararse con el estándar de atención, gemcitabina. Además, el modelo PDX ayudará en el descubrimiento de biomarcadores de la capacidad de respuesta terapéutica, facilitará las investigaciones sobre los mecanismos de resistencia terapéutica, lo que sigue siendo un desafío insuperable en el campo de la investigación del cáncer de páncreas.¹¹

Xenoinjertos derivados de pacientes por debajo de la cápsula renal

Los modelos PDX se injertan típicamente por vía subcutánea, sin embargo, otro modelo de xenoinjerto heterotópico utilizado para la implantación de fragmentos de tejido derivados directamente del tumor primario es el modelo de cápsula subrenal (SRC). El sitio de SRC ofrece la ventaja particular de una perfusión de órganos muy alta y un desarrollo potencialmente rápido de la microvasculatura del injerto, mientras que las tasas de injerto de xenoinjertos de SRC son altas con > 95% informado en estudios de cánceres de ovario, pulmón, riñón y próstata. Además, el modelo de xenoinjerto SRC permite la retención de la heterogeneidad del tumor original, incluyendo de manera importante el abundante estroma asociado a tumores humanos, que es esencial para la intercomunicación y las interacciones tumor-huésped que impulsan la tumorigénesis.¹¹

En cuanto a los xenoinjertos derivados de pacientes subcutáneos, el modelo SRC permite la expansión rápida del tejido tumoral que fenotípicamente y genotípicamente se asemeja al tumor primario; una característica importante para la evaluación preclínica de terapias novedosas. Los xenoinjertos SRC también son un modelo muy útil para cribar la eficacia in vivo de agentes terapéuticos seleccionados en un entorno preclínico. Por ejemplo, Carter et al utilizaron el modelo SRC para implantar tejido fresco de tumores de mama positivos para HER2, para evaluar la eficacia de un panel de anticuerpos anti-HER2 para decidir qué anticuerpo murino debería humanizarse en el futuro. desarrollo clínico, en particular trastuzumab.¹¹

Para algunos tumores con bajas tasas de injerto, el trasplante debajo de la cápsula renal altamente vascularizada puede mejorar las tasas de injerto (pulmón, ovario, próstata) y reducir el tiempo de injerto. Curiosamente, utilizando la misma vía de trasplante, se puede lograr un crecimiento tumoral y un comportamiento metastásico diferentes, incluso utilizando líneas de células tumorales adaptadas in vitro. Por ejemplo, el



trasplante intrahepático de BT474, originalmente aislado de un paciente con crecimiento de cáncer de mama sólido, dio como resultado ratones con crecimiento de tumor sólido asociado con el hígado y metástasis poco común. Por el contrario, las células SK-BR-3, aisladas de un derrame pulmonar, desencadenaron ascitis y metástasis fuertes en varios órganos, incluido el cerebro.¹¹

En el contexto del cáncer de páncreas, Xue et al establecieron xenoinjertos SRC con un injerto exitoso de > 90%, y los tejidos posteriores al injerto demostraron una concordancia histopatológica > 90% con el tumor original. Además, de los pacientes con cáncer de páncreas que donaron tejido al estudio, cuyos tumores respondieron a gemcitabina en los xenoinjertos de SRC, no habían desarrollado recurrencia durante el período de estudio, mientras que aquellos que desarrollaron enfermedad metastásica temprana no respondieron a gemcitabina en el SRC modelo. Aunque todavía está en su relativa infancia en los estudios preclínicos de cáncer de páncreas, el xenoinjerto de cápsula subrenal derivado del paciente representa un excelente modelo alternativo para el estudio de enfoques de medicina personalizada.¹¹

Al igual que con el modelo PDX subcutáneo, el xenoinjerto SRC tiene la desventaja de la necesidad de ratones inmunodeficientes para el crecimiento y expansión del tumor, así como el crecimiento del tumor fuera del tejido de origen. El xenoinjerto SRC también es técnicamente más desafiante e invasivo que el modelo PDX y el monitoreo de la cinética del tumor requiere el uso de costosas modalidades de imágenes de bajo rendimiento.¹¹

Xenoinjertos ortópicos

Los tumores se pueden injertar de forma heterotópica u ortotópica. Los xenoinjertos de PDAC implantados por vía subcutánea no suelen hacer metástasis y el microambiente del crecimiento intrapancreático neoplásico no está bien representado. Por lo tanto, estos aspectos clave del PDAC humano no se pueden estudiar utilizando xenoinjertos subcutáneos. Estas deficiencias pueden superarse, al menos en parte, mediante la implantación intrapancreática ortotópica.^{9,17}

Los modelos ortotópicos implican la implantación directa en el páncreas de ratones inmunodeficientes. Tales PDX se generan directamente a partir de muestras tumorales de pacientes sin un intermediario de línea celular. PDX conserva la heterogeneidad genética y, debido a la manipulación ex vivo limitada, recapitula mejor el aspecto histológico y el compartimento del estroma del tumor original del paciente, incluso en múltiples pases en ratones, por lo que su uso es recomendado por el Instituto Nacional del Cáncer de los EEUU.^{12,16}

Aunque este método es técnicamente más desafiante y requiere más tiempo, imita con mayor precisión el PDAC humano. La mayoría de los autores abogan por el uso de modelos PDX con un número de pases bajo (<10) para preservar la integridad genética del tumor parental.¹²

A pesar de las diferencias anatómicas dadas con el páncreas humano ubicado en el retroperitoneo, mientras que los páncreas murinos se encuentran dentro de la cavidad peritoneal, los procesos de crecimiento localmente invasivo de tumores primarios de xenoinjerto y diseminación metastásica al hígado y otros sitios de órganos distantes están bien representados. Utilizando tales modelos de xenoinjertos ortotópicos, la diseminación tumoral metastásica puede estudiarse in vivo mediante bioluminiscencia o mediante la introducción de marcadores fluorescentes, en combinación con técnicas de imagen más avanzadas como la ecografía de pequeños animales, la tomografía por emisión de positrones-TC o la resonancia magnética.⁹



La reproducibilidad y la calidad general de los datos experimentales obtenidos mediante modelos de xenoinjerto ortotópico de cáncer de páncreas están muy influenciados por los procedimientos y protocolos reales que se siguen al generar estos modelos. Las células tumorales suspendidas se pueden inyectar directamente por vía intrapancreática, con la adición de matrigel que mejora el injerto local. Por lo general, se logran resultados más sólidos cuando se implantan quirúrgicamente trozos de tumor en alícuotas en el páncreas murino, lo que aumenta la tasa de absorción del tumor a cerca del 100%, limita las variaciones interindividuales en el tamaño del tumor primario después del establecimiento y reduce el riesgo de fuga peritoneal.⁹

Por ejemplo, en un estudio realizado con el objetivo de evaluar el efecto y seguridad de la administración de Gemcitabina mediante administración intraraterial directa se adquirieron ratones desnudos atímicos (nu/nu) machos y hembras inmunodeprimidos a las 6 semanas de edad y los alojaron en condiciones estándar (12 h: 12 h de luz: ciclos de oscuridad, temperatura a 21,8 ° C y humedad al 50%) con libre acceso a alimentos y agua. Las células cancerígenas AsPC1 se cultivaron de una paciente con ACDP en medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10% y penicilina y estreptomina al 1% para posterior incubación en atmósfera humidificada a 37 ° C y 5% de CO₂, con cambio de medio de cultivo cada 3 días. Inicialmente, los modelos de xenoinjerto de cáncer de páncreas se crearon utilizando células AsPC1 1,5 M que se colocaron en 100 µl de matrigel y luego se inyectaron por vía subcutánea en el costado de ratones desnudos de 6 semanas de edad. Después de tres semanas, los tumores de xenoinjerto alcanzaron un tamaño de 10 mm, momento en el que se extrajeron de cada animal y se cortaron en pequeños bloques (2 x 2 x 2 mm³). Luego, cada bloque tumoral se implantó en el páncreas de un nuevo grupo de ratones desnudos, como se describió anteriormente. Se realizó una incisión cutánea vertical de 10 mm en el lado izquierdo de la parte superior del abdomen de un ratón desnudo receptor. A continuación, se abrió con cuidado el peritoneo y se expuso el páncreas. Posteriormente, se implantó con cuidado un solo bloque de tumor en el cuerpo del páncreas. A continuación, se volvió a colocar el páncreas en la cavidad abdominal y se cerró la pared abdominal con una sutura absorbible 5-0 y grapas quirúrgicas. Después de la cirugía, los animales (n = 6 para cada grupo de tratamiento) se observaron en una almohadilla térmica durante 30 minutos antes de regresar a su jaula. Más tarde de la implantación del tumor ortotópico, se controló el crecimiento del tumor usando un escáner de ultrasonido cada 3 días. Una vez que los tumores ortotópicos alcanzaron los 6 mm, que por lo general fue 2-3 semanas después de la implantación del tumor, los animales se asignaron al azar en 3 grupos de estudio. Cada animal recibió tratamientos al comienzo de la semana 1 y 2. Los volúmenes tumorales se calcularon basándose en sus medidas de altura, ancho y longitud que se tomaron cada 3 días usando ultrasonido.¹⁸

En un segundo estudio se utilizaron ratones macho C57BL / 6J y C57BL / 6N de seis a 7 semanas de edad (20 ~ 25 g de peso corporal, CLEA Japón, Osaka, Japón). Los ratones fueron criados internamente y destetados a los 21 días de edad, y aproximadamente 7 semanas después, fueron sometidos a la implantación de un tumor ortotópico. Un total de 120 ratones se alojaron en una instalación de barrera en condiciones específicas libres de patógenos a una temperatura controlada de 23 ± 2 ° C con 55 ± 10% de humedad y ciclos de 12 h de luz / 12 h de luz oscura. Los animales se mantuvieron con una dieta estándar esterilizada y agua. Se implantaron ortotópicamente células variantes de Panc02 (2 x 10⁵ células) en ratones (4 ~ 7 ratones por grupo). Para ello, las células se implantaron con Matrigel a baja temperatura al 50% en el parénquima de las colas pancreáticas de ratones anestesiados con medetomidina (0,3 mg / kg) / midazolam (4,0 mg / kg) / butorfanol (5,0 mg / kg). El páncreas y el bazo se exteriorizaron a través de



una laparotomía, y las células se inyectaron usando una aguja de calibre 30 unida a una jeringa de insulina.¹⁹

En ambos casos la herida quirúrgica se controló diariamente para detectar cualquier signo de infección de la herida, sangrado o dehiscencia de la herida u otras complicaciones posteriores al procedimiento (es decir, cambios en su peso, comportamiento, patrones de alimentación, postura y nivel de actividad), si era necesario, los ratones recibieron la administración subcutánea de analgésicos para minimizar el dolor y la angustia. Las grapas se retiraron en el día 7-10 postoperatorio con extracción quirúrgica estéril de grapas. Al final de los estudios, los ratones fueron sacrificados mediante la inhalación continua de CO₂ durante al menos 15 minutos después del paro respiratorio siguiendo un protocolo aprobado por IACUC en el que se describían los criterios de valoración del estudio humanitario. En este estudio, los ratones fueron sacrificados antes de que se hiciera evidente una angustia obvia, la falta de deambulación o una pérdida de peso > 10%. Los tumores se extirparon y se pesaron.^{18,19}

Modelos animales químicamente inducidos.

Antes del desarrollo exitoso de modelos transgénicos y GEM, el estudio de PDAC se basaba en gran medida en modelos animales inducidos por la exposición a sustancias químicas cancerígenas. Si bien se ha descubierto que los ratones son generalmente más resistentes a la carcinogénesis inducida químicamente, las ratas y los hámsteres se han utilizado ampliamente para tales estudios.^{9,12}

Dos de los modelos más notables y ampliamente investigados son los martillos dorados sirios inyectados intraperitonealmente con NORTE-nitroso-bis (2-oxopropil) amina y ratas inyectadas con azaserina. Más recientemente, se utilizó dimetilbenzantraceno (DMBA) para inducir PDAC en ratones. Aunque estos modelos inicialmente proporcionaron resultados prometedores de desarrollo de adenocarcinoma, el desarrollo de novo de tumores sin progresión aparente de lesiones preneoplásicas conocidas y la formación de tumores extrapancreáticos, en particular carcinoma hepatocelular, limitan en gran medida su valor preclínico.¹²

El carcinógeno alquilante de ADN azaserina se ha utilizado para inducir la carcinogénesis pancreática en ratas. Es de destacar que, en modelos inducidos por azaserina, el cáncer de páncreas parece originarse a partir de la transformación maligna de las células acinares, y no se encontró que los cánceres de páncreas fueran provocados por mutaciones oncogénicas de Kras. El tratamiento local con 7,12-dimetilbenz [a] antraceno (DMBA) mediante la implantación quirúrgica de cristales de DMBA condujo al desarrollo de adenocarcinomas localmente invasivos y sistémicamente metastásicos en el páncreas de rata en el 50-80% de los casos con una latencia media de 6,5 meses. Tampoco se ha encontrado que los cánceres de páncreas inducidos por DMBA alberguen mutaciones de Kras oncogénicas, lo que limita su relevancia clínica y su idoneidad para estudios traslacionales con respecto a la enfermedad humana afín.⁹

Una serie de estudios recientes más sofisticados comenzaron a combinar el uso de modelos murinos avanzados modificados genéticamente con estímulos químicos, en un intento de mejorar aún más la relevancia clínica de los datos experimentales obtenidos. De interés, en un elegante estudio reciente, Fendrich y colaboradores compararon el efecto de la inhibición genética y farmacológica de Snail sobre la metaplasia acinar-ductal y la formación de mPanIN en LsL-Kras G12D genéticamente modificado; LsL-Snailflox / flox; Ratones Pdx1-Cre, así como en el marco de una lesión pancreática inducida por la administración de ceruleína. Del mismo modo, He et al. recientemente pudieron demostrar de manera convincente que el factor 5 similar a Krüppel (KLF5)



podría desempeñar un papel en la metaplasia acinar-ductal (ADM) y KRASmediateformation de PanINs. Específicamente, los autores observaron que Ptf1a-CreERTM; Los ratones LSL-KrasG12D desarrollaron una ADM más pronunciada después de la administración intraperitoneal de cerúleo que Ptf1a-CreERTM; LSL-KrasG12D; Klf5fl / fl y que el knockout de Klf5 condujo a la sobreexpresión del supresor de tumores NDRG2 ya una proliferación reducida. El uso combinatorio de pancreatitis inducida químicamente en ratones modificados genéticamente representa, por tanto, otro campo importante, que probablemente ganará más tracción en la investigación traslacional de PDAC en un futuro próximo.⁹

Conclusiones:

Los estudios preclínicos en modelos murinos, han sentado las bases para la comprensión de las distintas rutas y mecanismos moleculares involucrados en la génesis y progresión de la enfermedad, contrastado luego en estudios en humanos, que, al tratarse de organismos diferentes justifica que los resultados del laboratorio no sean en exactitud reproducibles en humanos.

A pesar de las limitaciones en la homogeneidad de las líneas inmortalizadas, y la ausencia de un sistema inmune intacto, el PDX ha permitido obtener importantes datos correlacionables con los resultados de los estudios clínicos que le precedieron, aspectos claves de la terapéutica en la acción y efecto global de los quimioterápicos.

A pesar de los múltiples modelos estandarizados existentes, con relevantes ventajas en las investigaciones biomédicas, el desarrollo de métodos mixtos gana mucha atención, por la fiabilidad de los posibles resultados obtenidos, partiendo de la premisa de que la propia transferencia de alteraciones genéticas *per se* no desarrolla tumores, y la estimulación con carcinógenos químicos, puede ayudar a un mejor entendimiento de la génesis en el mundo real de esta entidad tan compleja y mortal.

Referencias bibliográficas

¹ World Health Organization. The Global Cancer Observatory. [en línea] [Actualizado: Diciembre 2020; citado: 9 may 2021]. Disponible en: <http://gco.iarc.fr/>

² Smyth E, Cunningham D. Cáncer pancreático. En: Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Fauci AS, Longo DL, Loscalzo J. Harrison: principios de medicina interna. 19ª ed; 2015: vol. 2 p.554-7

³Ministerio de Salud Pública. Dirección de registros médicos y estadísticas de salud. Anuario Estadístico de Salud 2019. La Habana, 2020.

⁴ Alonso Hernández S. Historia natural del cáncer de páncreas en el departamento de salud de Elda [tesis doctoral]. Alicante: Universidad Miguel Hernández, Facultad de Medicina; junio 2017

⁵ Wolpin B, Rizzato C, Kraft P, Kooperberg C, Petersen GM, Wang Z, *et al.* Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pancreatic cancer. Nat Genet [en línea] 2014 [citado: 29 jul 2021]; 46, 994-1000. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/ng.3052>

⁶ Servicio de noticias en salud Al Día [sede Web]. La Habana: Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas; c1999-2021 [actualizado 31 de octubre de 2010; acceso 8 de julio de 2021]. El cáncer de páncreas evoluciona y se desarrolla lentamente; [aproximadamente 2 pantallas]. Disponible en:



<https://boletinaldia.sld.cu/aldia/2010/10/31/el-cancer-de-pancreas-evolucionaria-y-se-desarrolla-lentamente/>

⁷ Madrigal Ureña A, García Chaves D. Cáncer de páncreas: alteraciones genéticas, cambios morfológicos y sus implicaciones terapéuticas. Med. leg. Costa Rica [en línea] 2018 [citado: 9 may 2021]; 35(1). Disponible en: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1409-00152018000100003&lng=en&nrm=iso&tlng=es

⁸ Martínez-Bosch N, Fernández-Barrena MG, Moreno M, Ortiz-Zapater E, Munné-Collado J, Iglesias M, et al. Galectin-1 drives pancreatic carcinogenesis through stroma remodeling and Hedgehog signaling activation. Cancer Res [en línea] 2014 [citado: 9 may 2021]; 74(13). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24812270/>

⁹ Bisht S, Feldmann G. Animal models for modeling pancreatic cancer and novel drug discovery. Exp Opin Drug Disc [en línea] 2019 [citado: 26 jun 2021]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30657339/>

¹⁰ Kathrin Wege A. Humanized Mouse Models for the Preclinical Assessment of Cancer Immunotherapy. BioDrugs. [en línea] 2018 [citado: 26 jun 2021]; 32(3), 245–66. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29589229/>

¹¹ Colvin EK, Scarlett CJ. A historical perspective of pancreatic cancer mouse models. Semin Cell Dev Biol [en línea] 2014 [citado: 26 jun 2021], 27: 96–105. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24685616/>

¹² Mazur PK, Herner A, Neff F, Siveke JT. Current Methods in Mouse Models of Pancreatic Cancer. Mouse Mod Can [en línea] 2015 [citado: 26 jun 2021], 1267: 185–215. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25636470/>

¹³ Mann KM, Ying H, Juan J, Jenkins NA, Copeland NG. KRAS-related proteins in pancreatic cancer [en línea] 2016 [citado: 26 jun 2021], 168: 29–42. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27595930/>

¹⁴ Knight JC, Baguña Torres J, Goldin R, Mosley M, Dias GM, Contreras Bravo L, et al. Early Detection in a Mouse Model of Pancreatic Cancer by Imaging DNA Damage Response Signaling. J Nucl Med [en línea] 2020 [citado: 26 jun 2021]; 61(7): 1006–1013. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7383084/>

¹⁵ Chen K, Qian W, Jiang Z, Cheng L, Li J, Sun L, et al. Metformin suppresses cancer initiation and progression in genetic mouse models of pancreatic cancer Mol Cancer [en línea] 2017 [citado: 26 jun 2021]; 16: 131. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5525317/>

¹⁶ Ito R, Takahashi T, Ito M. Humanized mouse models: Application to human diseases. J Cel Phys [en línea] 2017 [citado: 26 jun 2021]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28598567/>

¹⁷ Ngiow SF, Loi S, Thomas D, Smyth MJ. Mouse Models of Tumor Immunotherapy. Tumor Immunology [en línea] 2016 [citado: 26 jun 2021]; 130. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26922998/>



¹⁸ Rezaee M, Wang J, Razavi M, Ren G, Zheng F, Hussein A. A Study Comparing the Effects of Targeted Intra-Arterial and Systemic Chemotherapy in an Orthotopic Mouse Model of Pancreatic Cancer. *Sci Rep* [en línea] 2019 [citado: 26 jun 2021]; 9: 15929. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6828954/>

¹⁹ Takenaga K, Akimoto M, Koshikawa N, Nagase H. Cancer cell-derived interleukin-33 decoy receptor sST2 enhances orthotopic tumor growth in a murine pancreatic cancer model. *PLoS One* [en línea] 2020 [citado: 26 jun 2021]; 15(4): e0232230. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7185704/>