

Importanța modelelor animale în cercetarea oncologică: Un review

The importance of animal models in oncological research: A review

Diana Mihaela Alexandru^{1*}, Ana-Maria Coman^{2,3}, Răzvan Dobre¹, Maria Crivineanu¹

¹: Universitatea de Științe Agronomice și Medicină Veterinară, Facultatea de Medicină Veterinară, București

²: Institutul Oncologic „Prof. Dr. Alexandru Trestioreanu”, București

³: Universitatea „Spiru Haret”, Facultatea de Medicină Veterinară, București

*Corresponding author: albu.dm@gmail.com

Cuvinte cheie: cancer, cercetarea oncologică, oncologia experimentală, modele animale

Keywords: cancer, oncological research, experimental oncology, animal models

Rezumat

În cercetarea oncologică, experimentele *in vivo* pe modele animale au avut și au un rol esențial în înțelegerea etiologiei, evoluției, diagnosticului și terapiei bolii canceroase la om. Scopul acestui review este de a evidenția importanța studiilor preclinice oncologice atât pe animale de experiență cât și pe animale de companie ce au dezvoltat tumori spontane, în evoluția metodelor de diagnostic și a managementului terapeutic din afecțiunile neoplazice. De asemenea, sunt subliniate o serie de criterii ce stau la baza elaborării unui studiu *in vivo*, referitoare la specie, rasă, sex, vârsta animalelor, la linia tumorală selectată și la scopul acestuia, ținând cont obligativitatea respectării principiilor etice care stau la baza utilizării animalelor în cercetare.

Abstract

In oncology research, *in vivo* experiments on animal models have played and still play an essential role in understanding the etiology, evolution, diagnosis and therapy of human cancer. The purpose of this review is to highlight the importance of preclinical oncological studies on both experimental animals and pets that have developed spontaneous tumours, in the evolution of diagnostic methods and therapeutic management of neoplastic diseases. Also, a series of criteria underlying the elaboration of an *in vivo* study are emphasized, regarding the species, breed, sex, age of the animals, the selected tumour line and its purpose, taking into account the obligation to respect the ethical principles regarding the use of animals in research.

Introducere

Cancerul este a doua cea mai frecventă cauză de deces, după patologia cardiovasculară, motiv pentru care se regăsește în numeroase studii de cercetare.

Din nefericire, acesta este detectat, de obicei, tardiv, când deja au avut loc atât modificări structurale la nivelul țesutului sau organul în care s-a dezvoltat, cât și la nivelul întregului organism, prin dezvoltare de metastaze. Astfel, se impune dezvoltarea de studii comparative om-animale cât și studii experimentale, privind etiologia, evoluția, diagnosticul și terapia bolii canceroase.

Depistarea precoce a leziunilor de tip canceros și monitorizarea exactă a răspunsului acestora la schemele de tratament, reprezintă cheia supraviețuirii pacientului oncologic. Un pas înainte, în lupta cu această boală a fost

făcut prin descoperirea țintelor moleculare specifice tumorii, ce a permis astfel elaborarea de tratamente personalizate (Boddy și col. 2020, Cekanova și Rathore, 2014; Manolescu, 2003).

Un rol aparte pe scara evolutivă a descoperiri și studierii cancerului este adus de către medicina experimentală și cea comparată, prin rezultatele remarcabile obținute *in vitro* și *in vivo*, ce au stat la baza dezvoltării metodelor de diagnostic și tratament oncologic (Cekanova și Rathore, 2014; Ruggeri și col., 2014).

La nivel mondial, lupta împotriva cancerului a făcut ca cercetarea științifică, oncologia experimentală și cea comparată să capete noi valențe și să se dezvolte într-un ritm accelerat. Modelele experimentale, în domeniul biomedical, sunt dificile și complexe,

iar modelul experimental oncologic prezintă numeroase trasături specifice care îl individualizează și care au transformat oncologia experimentală în o ramură separată a medicinei experimentale (Aclam și col., 2007; Manolescu, 2003).

Utilizarea modelelor animale în cercetare

Posibilitatea experimentării în situații controlate și posibilitatea imitării condițiilor biologice ale unor boli umane și animale au permis crearea și dezvoltarea conceptului de modele animale (Andersen și Winter, 2019).

Conform ultimului raport al Uniunii Europene, ce cuprinde o analiză a animalelor utilizate în cercetare și testare pe perioada 2015-2017 în 28 state membre, se utilizează sub 10 milioane de animale pe an în acest sens (Tabel 1).

Deși ultimele statistici au arătat că numărul de animale totale utilizate în cercetare este în scădere, se observă totuși că pe parcursul celor trei ani procentul de utilizare a primatelor neumane a crescut cu 15 %.

În 2017, în cercetarea experimentală preponderent s-au utilizat șoarecii (61 %), fiind urmați apoi de pești (13 %), șobolani (12 %), alte mamifere (8%), păsări (6%), reptile (0.3 %), câini, pisici și primate neumane (0.3 %) (Figura 1). Rozătoarele, peștii și păsările sunt preferate ca modele animale, însumând un procent de 92 %. Datorită dezavantajelor (dificultăți de întreținere și manipulare, accesibilitate) și principiilor etice numărul primatelor neumane, animalelor de companie și al altor mamifere (suine, bovine) utilizate în scopuri științifice este mult mai mic (8 %). Principalele domenii în care au fost utilizate modele animale sunt neurologia, imunologia, oncologia și etologia, acestea ocupând peste jumătate din utilizările animalelor în cercetarea de bază. În cercetarea translațională și aplicată, domeniul principal în care s-au utilizat animalele este oncologia, fiind urmată de tulburările nervoase și infecțioase ale oamenilor și tulburările și patologia animalelor (sursa: Raportul Comisiei Europene din 2019 privind statisticile utilizării animalelor în scopuri științifice).

Tabel 1. Numărul total de animale utilizate în cercetare și testare în intervalul 2015-2017 (conform raportului Uniunii Europene prezentat în 2019)

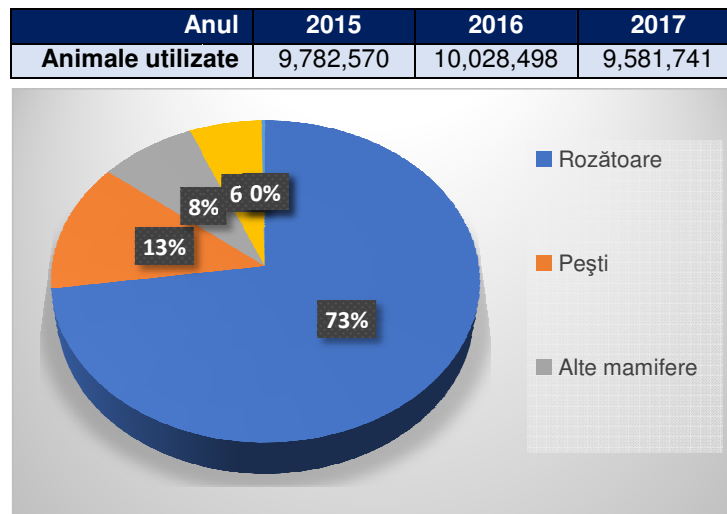


Figura 1. Reprezentarea procentuală a categoriilor principale de animale utilizate în cercetare

Modele animale rozătoare

Modelele de cancer rozătoare sunt cele mai frecvent utilizate în oncologia experimentală. Modelele de șoareci au revoluționat capacitatea noastră de a studia

funcția genelor și a proteinelor *in vivo* și de a înțelege mai bine căile și mecanismele lor moleculare (Kelland, 2004).

Utilizarea rozătoarelor prezintă mai multe avantaje, precum timpi scurți de gestație,

dimensiuni reduse, întreținere relativ ieftină și manipularea ușoară a expresiei genetice. Primii șobolani folosiți pentru studii experimentale, chiar înainte de 1828, au fost *Rattus norvegicus* domesticiți.

Pe baza acestei tulpini, au fost apoi dezvoltate alte tulpini de șobolani, diferiți din punct de vedere genetic, care sunt folosiți și în prezent. Șoarecii sunt utilizați pentru studii pe animale încă din 1900 și provin de la șoarecele de casă *Mus musculus* (Asinimoc și col., 2005; Tennekes și col., 2004; Rangarajan și Weinberg, 2003).

Modelele animale rozătoare au o istorie îndelungată în oncologia experimentală datorită numeroaselor avantaje de care dispun, printre acestea o importanță majoră o au accesibilitatea lor și existența unor caracteristici similare cu carcinogeneza umană. Incidența de sub 1% a dezvoltării spontane a carcinoamelor atât la șoareci, cât și la șobolani limitează apariția tumorilor non-iatrogene și garantează un risc foarte scăzut de încălcare a experimentului.

Deși există numeroase diferențe patologice la nivel molecular, similaritățile în dezvoltarea neoplazică și răspunsul la terapie, dintre rozătoare și oameni, au contribuit la utilizarea preponderent a modelelor rozătoare în cercetarea oncologică (De Jong și col., 2009; Mognetti și col., 2006).

În oncologia experimentală sunt utilizate linii inbred, outbred, animale germ-free și animale transgenice. Liniile inbred de animale (homozigote) prezintă avantajul că se lucrează pe animale identice din punct de vedere genetic, cu reactivitate uniformă, crescând astfel calitatea cercetărilor efectuate și implicit a rezultatelor obținute.

Dezavantajul acestor linii (pe lângă costul ridicat) este imposibilitatea extrapolării unor modele experimentale la populația umană, considerată "outbred".

Liniile outbred (heterozigote) precum șobolanii Wistar sunt utilizate pentru dezvoltarea unor tumori solide sau ascitice (tumora Walker 256, hepatomul RS1, etc).

Animalele germ-free sunt necontaminate din punct de vedere microbial, obținute prin cezariană și menținute în condiții de sterilitate.

Animalele transgenice au o foarte mare valoare în studiul oncogenelor și în studierea procesului de genereză tumorală (Anisimov și col., 1989; Hawk și col., 2005; Manolescu, 2003).

Cele mai frecvente modele de cancer la rozătoare sunt xenogrefele și cancerule induse chimic sau genetic.

În cazul xenogrefelor, celulele canceroase umane sau animale sunt transplantate fie sub piele, fie în organul de origine tumorală folosind rozătoare imunocompromise.

Cele mai frecvente tipuri de rozătoare imunosupresate, utilizate în cercetarea cancerului sunt șoarecii nuzi și șoarecii imunodeficienți sever compromiși (SCID).

Utilizarea xenogrefelor reprezintă o metodă relativ ieftină și cu numeroase avantaje pentru generarea de tumori *in vivo* folosind linii celulare de cancer uman și animal.

Dezavantajul major este reprezentat de faptul că șoarecii și șobolanii utilizați au un sistem imunitar compromis, deci nu reprezintă comportamentul cancerelor care apar în mod natural la om.

Modelele de cancer de rozătoare induse chimic sunt dezvoltate prin expunerea la agenți cancerigeni, aceste modele animale ajută la studiul trăsăturilor complexe ale cancerului, însă este o metodă laborioasă și cronofagă întrucât necesită identificarea mutațiilor (Cekanova și Rathore, 2014; Kersten și col., 2017; Tentler și col., 2012).

Un dezavantaj major în utilizarea rozătoarelor ca modele animale este faptul că acestea pot tolera concentrații mai mari de substanțe citotoxice spre deosebire de pacienții umani (Cekanova și Rathore, 2014).

Modele animale nerozătoare

Dintre modelele animale ne-rozătoare s-au evidențiat primatele neumane care s-au dovedit a fi extrem de utile în cercetarea biomedicală. Acestea au fost și sunt utilizate datorită existenței a numeroase similitudini cu oamenii, atât genetice, cât și biochimice, fiziologice și comportamentale.

Primatele au fost utilizate în cercetare pentru studiul multor boli precum SIDA,

hepatită dar și pentru studierea tulburărilor psihologice, toxicologice, nutritive și bineînțeles oncologice (Xia și Chen, 2011).

Deși importanța utilizării primatelor neumane în cercetare continuă să fie esențială pentru creșterea cunoștințelor noastre în multe domenii, datorită apropierii din punct de vedere genetic cu oamenii, o problemă majoră este reprezentată de considerațiile etice ale utilizării acestor modele animale (Andersen și Winter, 2019).

Pe lângă primatele neumane și modelele porcine s-au dovedit a fi extrem de utile în cercetarea oncologică, datorită asemănărilor lor genetice, anatomice și fiziologice cu oamenii.

Modelele porcine au contribuit semnificativ la dezvoltarea oncologiei experimentale și datorită progreselor recente în secvențierea genomului animalelor domestice (Robertson și col., 2020).

Spre deosebire de alte animale utilizate în cercetare, porcii datorită dimensiunii mari necesită mai mult spațiu, mai multă hrană și sunt mai dificil de manevrat.

Întrucât sunt mult mai ușor de manevrat, rasele mini de porci precum Gottingen și Yucatan au fost preferate în cercetarea biomedicală.

Rasa mini de suine Sinclair a fost foarte utilizată în studierea melanomului, deoarece la aceasta rasă melanoamele maligne apar spontan, apoi fie regresează, fie cresc și metastazează similar cu melanoamele umane (Gutierrez și col., 2015).

Animale de companie

Cancerle spontane la câini și pisici oferă un model unic pentru biologia cancerului uman și cercetarea cancerului translațional.

Animalele de companie au o incidență relativ mare a cancerelor, cu comportament biologic și răspuns la tratament similari cu cei care apar la om.

În prezent, animalele de companie cu neoplasme spontane sunt încă o abordare subexploată, dar se fac progrese în acest sens întrucât datele obținute s-au dovedit a fi mai promițătoare decât cele obținute pe

modele de rozătoare (Hansen și Khanna, 2005; Macewen, 1990).

Oncologia comparativă integrează animalele de companie cu cancer naturale pentru a studia biologia cancerului, noi tehnici de diagnosticare și noi scheme terapeutice iar acest studii clinice aduc beneficii atât oamenilor, cât și animalelor de companie (Porrello și col., 2006).

Avantajele cercetării pe astfel de modele animale sunt reprezentate de: durata de viață generală mai scurtă și progresia mai rapidă a bolii, existența unei populații mare de animale de companie care poate dezvolta o varietate mare de neoplazii, asemănările clinice, biologice, histologice cu cancerle umane, răspunsul similar la terapii.

Ciclul de viață semnificativ mai scurt este un avantaj major pentru efectuarea studiilor clinice, deoarece permite colectarea mai rapidă a datelor de supraviețuire.

De exemplu, la oameni sunt necesari 7 ani pentru a evalua rezultatele tratamentului spre deosebire de câinii tratați pentru cancer pentru care sunt necesare doar 18 luni. Vârsta medie a unui câine care dezvoltă un cancer spontan este de aproximativ 8 ani, ceea ce corespunde unei vârste medii umane de 50 de ani, sugerând astfel că, la fel ca la oameni, cancerle spontane la câini sunt influențate de vârstă și mediul înconjurător.

Studiile de specialitate au arătat asemănări mai puternice între genomul canin și cel uman comparativ cu genomul șoarecelui, observându-se că aceleași oncogene tumorale și gene supresoare contribuie la dezvoltarea cancerului atât la oameni cât și la câini.

Cancerle animalelor de companie captează esența cancerului uman mai bine decât orice alt model (Cekanova și Rathore, 2014).

Câinii pot dezvolta o gamă largă de tipuri de cancer (limfom, hemangiosarcom, osteosarcom, melanom, diferite carcinoame) asemenea pacienților umani.

Oamenii și câinii au o histologie similară a limfomului non-Hodgkin și un management terapeutic asemănător, fiind utilizate aceleași citostatice. Astfel datele obținute în studiile clinice de pe aceste modele animale pot fi

translaționate în cadrul cercetărilor oncologice umane.

Câinii cu osteosarcom reprezintă un model foarte util datorită histopatologiei, prezentării clinice, țintelor moleculare, situsurilor metastatice și ratei de supraviețuire similare.

Studiile clinice efectuate pe câinii diagnosticați cu osteosarcom au stat la baza dezvoltării tehnicilor de salvare a membrilor la pacienții umani diagnosticați cu osteosarcom.

Similarități există și în cazul neoplaziilor mamare, s-a demonstrat că în ambele situații sterilizarea timpurie împiedică dezvoltarea acestui tip de cancer.

Studiile au arătat o creștere semnificativă a numărului de tumori maligne ale tractului respirator la câinii expuși fumului de țigară, astfel încât aceștia pot fi folosiți pentru a studia efectele factorilor de mediu în carcinogeneza ca model epidemiologic (Cekanova și Rathore, 2014).

Selectarea modelului animal

Selectarea unui model animal valid și predictiv este esențială pentru a obține rezultate cu semnificație clinică.

Selectia atentă a celor mai utile specii pentru un experiment este foarte importantă, dar reprezintă și o provocare pentru cercetători. Oamenii de știință trebuie să ia în considerare nu numai fezabilitatea financiară și experimentele anterioare care utilizează o specie dată, ci și caracteristicile biologice ale unei specii și tehnicile moleculare disponibile pentru respectiva specie (Ericsson și col., 2013).

Alegerea modelului animal se face ținând cont de o serie de factori precum: durata tratamentului, caracteristicile animalelor, obiectivele urmărite în studiu, reproductibilitatea rezultatelor.

Dimensiunea loturilor de animale experimentale trebuie aleasă cu atenție, recomandându-se utilizarea unui număr echilibrat între minimul posibil și cel necesar pt analiza statistică (Denayer și col., 2014).

De asemenea, este important să subliniem că, pentru a obține rezultate viabile,

calitatea sănătății animalului folosit ca model este fundamentală (Andersen și Winter, 2019).

Specia și tulpina animalelor selectate pentru un anumit experiment trebuie alese cu atenție. Factorii importanți precum vârsta, sexul și starea de sănătate a animalelor ar trebui să fie în concordanță cu starea clinică a animalului (Denayer și col., 2014).

Sexul animalelor folosite în transplatarele seriate tumorale influențează evoluția acestora, preferându-se utilizarea animalelor de sex masculin deoarece, femelele suferă fluctuații hormonale ce pot influența rezultatele studiilor, în special atunci când se utilizează tumori hormone-dependente.

Din punct de vedere al greutatei corporale, aceasta diferă evident în funcție de specie.

În cazul șobolanilor, pentru transplantarea tumorală, se preferă utilizarea a celor cu greutatea medie de până la 120-150 g.

Vârsta șobolanilor reprezintă un factor care poate să influențeze dezvoltarea tumorii.

Studiile de specialitate au arătat că la rozătoarele de 10-14 zile virulența tumorii este mult mai mare datorită sistemului imun incomplet dezvoltat.

Un alt factor care poate influența dezvoltarea tumorii este susceptibilitatea individuală a animalului.

Astfel, se preferă utilizarea animalelor omogene din punct de vedere genetic (liniile inbred), la care rata de prindere tumorală este, în general, mai mare și constantă (Gonder și Laber, 2007; Hedrich, 2000; Manolescu, 2003).

Un model animal ideal pentru studiul neoplazic ar trebui să imite toate aspectele dezvoltării neoplazice la om și să fie, practic, previzibil și optim din punct de vedere etc.

Până în prezent, nu a fost dezvoltat nici un model care să îndeplinească toate aceste condiții. În consecință, alegerea unui model animal pentru cercetarea oncologică necesită compromisuri care depind de scopul experimentelor intenționate (De Jong și col., 2009; Sobczuk și col., 2020).

Perspectiva etică și principiile celor 3 R

Cercetarea pe animale a avut un rol esențial în progresul medical, oamenii și

animalele fiind principalii beneficiari ai acestei dezvoltări. Cu toate că evoluția în ramura oncologică nu ar fi fost posibilă fără utilizarea animalelor în cercetare, este intens discutat cadrul etic în care se desfășoară aceste cercetări (Festing și Wilkinson, 2007; Perry, 2007).

La nivel global, au fost elaborate principii etice pentru oncologia experimentală, au fost implicate diferite organe guvernamentale și comisii instituționale pentru a dezvolta legislație și procese de aprobare etică pentru a îmbunătăți condițiile de cercetare experimentală. Aceste măsuri au fost luate pentru a se asigura că toate alternativele sunt pe deplin luate în considerare și suferința animalelor este minimizată (Loeb și col., 1989; Robinson și col., 2019).

Utilizarea modelelor animale trebuie să fie justificată și relevantă pentru dezvoltarea sănătății veterinare și umane, să respecte principiile etice, normele și reglementările în vigoare.

Fie că modele animale sunt utilizate în scop didactic sau de cercetare, perspectivele etice trebuie să stea la baza acestor experimente. Cercetătorii trebuie să dea dovadă de integritate, responsabilitate și să se asigure de respectarea regulilor etice în cadrul experimentelor derulate (Andersen și Winter, 2019).

În 1959, Russel și Burch au introdus principiile celor trei R în cercetarea pe animale: **înlocuire** (*replacement*), **reducere** (*reduction*) și **rafinare** (*refinement*).

Fiecare R reprezintă un principiu pentru utilizarea etică a animalelor în experimente, fiind concepute pentru a impune cercetătorilor respectarea unor reguli de conduită în efectuarea experimentelor pe animale (Arck, 2019; Burden și col., 2015).

Primul principiu constă în **înlocuirea** animalelor cu alte modele precum culturi celulare, organe, microorganisme atunci când acest lucru este posibil. Acest obiectiv trebuie avut în vedere la inițierea oricărui experiment, fiecare cercetător trebuie să analizeze dacă poate obține aceleași rezultate evitând utilizarea modelelor animale (Ferdowsian și Gluck, 2015).

Atunci când utilizarea animalelor este mandatorie în cercetare, se recomandă utilizarea unui număr cât mai mic cu puțință de animale.

Reducerea numărului de animale poate fi realizată și prin utilizarea speciilor și liniilor care prezintă același fond genetic (Andersen și Winter, 2019).

În oncologia experimentală, liniile inbreed (homozigote) de rozătoare, fiind animale identice genetic și prezentând o reactivitate uniformă, au permis efectuarea experimentelor pe un număr mai mic de animale cu obținerea unor rezultate valide.

Reducerea numărului de animale folosite într-un experiment trebuie totuși să permită obținerea unor date cu semnificație statistică, prin urmare se recomandă utilizarea numărului minim de animale care oferă date cu relevanța statistică (Denayer și col., 2014).

Principiul **rafinării** constă în aplicarea metodelor care evită suferința animalelor, îmbunătățirea tehnicilor utilizate și a protocoalelor experimentale.

Maximizarea rafinării se face prin utilizarea anesteziei și/sau a medicației analgezice, utilizarea tehnicilor neinvazive în detrimentul celor invazive, manipularea cât mai atentă a animalelor și asigurarea îngrijirii corespunzătoare. Măsurile simple care se pot lua într-un laborator țin de îmbunătățirea mediului animalelor și asigurarea bunăstării acestora, aceste măsuri au ca scop satisfacerea nevoilor fiziologice și comportamentale a animalelor.

Astfel pentru respectarea acestui principiu este esențială instruirea adecvată a tehnicienilor și lucrătorilor din domeniu și asigurarea că aceștia respectă reglementările stricte impuse (Festing și Wilkinson, 2007; Kilkenny și col., 2010).

Pentru modelele experimentale, programele de îngrijire și manipulare a animalelor sunt o componentă foarte importantă care contribuie la succesul experimentelor (Gonder, 2007).

Aceste principii coordonează preocupările etice din domeniu, punând accentul pe aspecte legate de responsabilitate, respect față de orice ființă vie și bunăstare (Donnelley, 1993).

Concluzii

În oncologia experimentală și în oncologia comparată, cercetătorii trebuie să aibă o viziune de ansamblu asupra studiului și asupra subiectului cercetat. Dincolo de cunoștințele tehnice și teoretice în domeniu sunt necesare înțelegerea completă a biologiei și comportamentului animalului luat în studiu, alegerea justificată a modelului animal și cunoașterea modelului tumoral.

În același timp, totul ar trebui să se bazeze pe asigurarea respectării principiilor etice și analizarea datelor obținute într-un mod cât mai corect și complet.

Doar ținând cont de toate aceste aspecte se pot obține rezultate valide și utile în dezvoltarea biomedicală. În acest review este evidențiată importanța utilizării modelelor animale în cercetarea oncologică, fiind subliniat rolul esențial pe care acestea l-au avut în înțelegerea patogenezei și evoluției acestei maladii precum și în dezvoltarea metodelor de diagnostic și tratament.

De asemenea, sunt prezentate recomandări pentru studiile viitoare care implică utilizarea animalelor; recomandări ce țin de selecția modelului animal în funcție de subiectul cercetat și de respectarea principiilor etice ce țin de utilizarea animalelor.

Mulțumiri

Autorii sunt recunoscători și doresc să le mulțumească tuturor membrilor și colegilor Departamentului de Biologie a Cancerului de la Institutul de Oncologie "Profesor Doctor Alexandru Trestioreanu" pentru materialul și informațiile furnizate.

Bibliografie

1. **ACLAM Medical Records Committee, Field K., Bailey M., Foresman L.L., Harris R.L., Motzel S.L., Rockar R.A., Ruble G., Suckow M.A.** (2007). Medical records for animals used in research, teaching, and testing: public statement from the American College of Laboratory Animal Medicine. *ILAR journal*, 48(1): 37-41.
2. **Andersen M.L., Winter L.M.F.**, (2019). Animal models in biological and biomedical research – Experimental and ethical concerns. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 91 (1).
3. **Anisimov V.N., Pliss G.B., Iogannsen M.G., Popovich I.G., Romanov K.P., Monakhov A.S., Averyanova T.K.** (1989). Spontaneous tumors in outbred LIO rats. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 8(4): 254-262.
4. **Anisimov V.N., Ukraintseva S.V., Yashin A.I.**, (2005). Cancer in rodents: does it tell us about cancer in humans?. *Nature Reviews Cancer*, 5(10): 807-819.
5. **Arck P.C.**, (2019). When 3 Rs meet a forth R: Replacement, reduction and refinement of animals in research on reproduction. *Journal of Reproductive Immunology*, 132: 54-59.
6. **Boddy A.M., Harrison T.M., Abegglen L.M.**, (2020). Comparative Oncology: New Insights into an Ancient Disease. *iScience*, 23(8): 101373.
7. **Burden N., Chapman K., Sewell F., Robinson V.**, (2015). Pioneering better science through the 3Rs: an introduction to the national centre for the replacement, refinement, and reduction of animals in research (NC3Rs). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 54(2): 198-208.
8. **Cekanova M., Rathore K.** (2014). Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. *Drug design, development and therapy*, 8:1911.
9. **De Jong G.M., Aarts F., Hendriks T., Boerman O.C., Bleichrodt R.P.** (2009). Animal models for liver metastases of colorectal cancer: research review of preclinical studies in rodents. *Journal of Surgical Research*, 154(1): 167-176.
10. **De Jong M., Maina T.** (2010). Of mice and humans: are they the same?—Implications in cancer translational research. *Journal of Nuclear Medicine*, 51(4): 501-504.
11. **Denayer T., Stöhr T., Van Roy, M.** (2014). Animal models in translational medicine: Validation and prediction. *New Horizons in Translational Medicine*, 2(1): 5-11.
12. **Donnelley S.** (1993). The ethical challenges of animal biotechnology. *Livestock Production Science*, 36(1): 91-98.
13. **Ericsson A.C., Crim M.J., Franklin C.L.** (2013). A Brief History of Animal Modeling. *Missouri Medicine*, 110(3):201-205.
14. **Ferdowsian H.R., Gluck J.P.** (2015). The Ethical Challenges of Animal Research Honoring Henry Beecher's Approach to Moral Problems. *Cambridge Q. Healthcare Ethics*, 24: 391-406.
15. **Festing S., Wilkinson R.** (2007). The ethics of animal research: talking point on the use

- of animals in scientific research. *EMBO reports*, 8(6): 526-530.
16. **Gonder J.C.**, (2007). Recent studies, new approaches, and ethical challenges in animal research. *ILAR journal*, 48(1): 1-2.
 17. **Gonder J.C., Laber K.** (2007). A renewed look at laboratory rodent housing and management. *ILAR journal*, 48(1): 29-36.
 18. **Greek R., Menache A.** (2013). Systematic reviews of animal models: methodology versus epistemology. *International journal of medical sciences*, 10(3): 206.
 19. **Gutierrez K., Dicks N., Glanzner W.G., Agellon L.B., Bordignon V.** (2015). Efficacy of the porcine species in biomedical research. *Frontiers in genetics*, 6: 293.
 20. **Hansen K., Khanna C.** (2005). Spontaneous and genetically engineered animal models; use in preclinical cancer drug development. *Eur. J. Cancer*, 40: 858–880.
 21. **Hawk E.T., Umar A., Lubet R.A., Kopelovich L., Viner J.L.** (2005). Can animal models help us select specific compounds for cancer prevention trials?. In *Tumor Prevention and Genetics III* (pp. 71-88). Springer, Berlin, Heidelberg.
 22. **Hedrich, H.J.** (2000). Chapter 1-History, Strains and Models. *The Laboratory Rat-Handbook of Experimental Animals*, 3-16.
 23. **Kelland, L.R.** (2004). "Of mice and men": values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. *European journal of cancer*, 40(6): 827-836.
 24. **Kersten K., De Visser K.E., Van Miltenburg M.H., Jonkers J.** (2017). Genetically engineered mouse models in oncology research and cancer medicine. *EMBO molecular medicine*, 9(2): 137-153.
 25. **Kilkenny C., Browne W.J., Cuthill I.C., Emerson M., Altman D.G.** (2010). Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*, 8(6): e1000412.
 26. **Loeb J.M., Hendee W.R., Smith S.J., Schwarz M.R.** (1989). Human vs animal rights: In defense of animal research. *JAMA*, 262(19): 2716-2720.
 27. **Macewen E.G.** (1990). Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment. *Cancer and Metastasis Reviews*, 9(2): 125-136.
 28. **Manolescu N.** (2003). Introducere în oncologia comparată, Editura Universitară "Carol Davila", București.
 29. **Paoloni M., Khanna C.** (2008). Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nature Reviews Cancer*, 8(2): 147-156.
 30. **Perry P.** (2007). The ethics of animal research: a UK perspective. *ILAR journal*, 48(1): 42-46.
 31. **Porrello A., Cardelli P., Spugnini E.P.** (2006). Oncology of companion animals as a model for humans. An overview of tumor histotypes. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, 25(1): 97-105.
 32. **Rangarajan A., Weinberg R.A.** (2003). Comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice. *Nature Rev. Cancer*, 3: 952–959.
 33. **Report from the Commission to the European Parliament and the Council**, 2019. Report on the statistics on the use of animals for scientific purposes in the Member States of the European Union in 2015-2017.
 34. **Robertson N., Schook L.B., Schachtschneider K.M.** (2020). Porcine cancer models: potential tools to enhance cancer drug trials. *Expert Opinion on Drug Discovery*, pp. 1-10.
 35. **Robinson N.B., Krieger K., Khan F.M., Huffman W., Chang M., Naik A., Yongle R., Hameed I., Krieger K., Girardi L.N., Gaudino M.** (2019). The current state of animal models in research: A review. *International Journal of Surgery*, 72: 9-13.
 36. **Ruggeri B.A., Camp F., Miknyoczki S.** (2014). Animal models of disease: pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. *Biochemical pharmacology*, 87(1): 150-161.
 37. **Sobczuk P., Brodziak A., Khan M.I., Chhabra S., Fiedorowicz M., Welniak-Kamińska M., Synoradzki K., Bartnik E., Cudnoch-Jędrzejewska A., Czarnecka A.M.** (2020). Choosing the right animal model for renal cancer research. *Translational Oncology*, 13(3): 100745.
 38. **Tennekes H., Kaufmann W., Dammann M., Van Ravenzwaay B.** (2004). The stability of historical control data for common neoplasms in laboratory rats and the implications for carcinogenic assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 40: 293–304.
 39. **Tentler J.J., Tan A.C., Weekes C.D., Jimeno A., Leong S., Pitts T.M., Arcaroli J.J., Messersmith W.A., Eckhardt S.G.** (2012). Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nature reviews Clinical oncology*, 9(6): 338-350.
 40. **Xia H.J., Chen C.S.** (2011). Progress of non-human primate animal models of cancers. *Dongwuxue Yanjiu*, 32(1): 70-80.