ADRIANA TOMOKO NISHIYA

**Administração intratumoral de uma toxina engenheirada ativada
por uroquinase (UPA) e metaloproteinase (MMP) para o tratamento
do melanoma oral canino: estudo piloto**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Profª. Dra. Maria Lucia
Zaidan Dagli

**São Paulo
2017**

ADRIANA TOMOKO NISHIYA

**Administração intratumoral de uma toxina engenheirada ativada
por uroquinase (UPA) e metaloproteinase (MMP) para o tratamento
do melanoma oral canino: estudo piloto**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lucia
Zaidan Dagli

**São Paulo
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Nishiya, Adriana Tomoko

Administração intratumoral de uma toxina
engenheirada ativada por uroquinase (UPA) e
metaloproteinase (MMP) para o tratamento do
melanoma oral canino : estudo piloto / Adriana
Tomoko Nishiya. -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Oncologia.

Orientadora: Maria Lucia Zaidan Dagli.

Descritores: 1.Neoplasias bucais 2.Bacillus
anthracis 3.Cães 4.Melanoma 5.Terapia de alvo
molecular 6.Ensaio clinico

USP/FM/DBD-493/17

*Dedico este trabalho ao maior presente de Deus que
recebi nessa vida durante os trabalhos no doutorado, meu filho Fernando
Takeshi Nishiya Maia, que trouxe e traz toda a força e alegria na minha vida
para a finalização desta tese.*

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram de alguma forma para a confecção deste trabalho, principalmente, a minha orientadora Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli que, além de uma grande pesquisadora, é sinonimo de força, otimismo e generosidade.

Aos colaboradores Dr. Shihui Liu, Dr. Thomas Henrik Bugge, Dr. Stephen Leppa do *National Institutes of Health* em Bethesda, Maryland-USA pela oportunidade e credibilidade em desenvolver um projeto em conjunto com a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis*.

Ao Dr. Jaime J Modiano do *College of Veterinary Medicine and the Masonic Cancer Center* da Universidade de Minnesota em Minneapolis-USA por ceder gentilmente as linhagens de células de melanoma canino utilizadas neste estudo.

Ao Dr. Jose Luis Guerra da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Anhembi Morumbi pelo apoio e paciência na leitura das lâminas de histopatologia.

À Dra. Natalia Coelho Couto de Azevedo Fernandes e Dr. Rodrigo Albergaria Rêssio do Departamento de Patologia Morfológica e Imunopatologia do Instituto Adolfo Lutz pelo aprendizado da técnica de imunohistoquímica.

À Dra. Ivone Izabel Mackowiak da Fonseca do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo pelo aprendizado em técnicas de laboratório.

À Marcia Kazumi Nagamine do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo em São Paulo-Brasil pelo auxílio e paciência imensuráveis no aprendizado das técnicas de cultivo celular e espectrofotometria.

À Nayra Villar Scattone do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo em São Paulo-Brasil pelo auxílio no tissue microarray.

À Marguiti Soares Silva do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo pelo auxílio grandioso no aprendizado das técnicas histopatológicas e imunohistoquímicas, assim como à Dra Luciana Ahlf Bandini pelo aprendizado no manuseio dos animais de laboratório.

Ao Dr. Jose Guilherme Xavier, Dr. Mario Santos e Dra. Silvia Regina Kleeb do laboratório de patologia Rous pelo auxílio no diagnóstico e imuno-histoquímica dos melanomas caninos.

À Dra. Tatiana Regina Intelizano do Setor de Cirurgia do Hospital Veterinário da Universidade Anhembi Morumbi pelos procedimentos anestésicos de meus pacientes caninos, assim como a estagiária Andrea Caringi pelo acompanhamento cuidadoso desses.

Ao Dr. Ronaldo Lucas da coordenação do Hospital Veterinário da Universidade Anhembi Morumbi pelo apoio ao estudo clínico em meus pacientes caninos.

À Dra. Isabelle Tancione do *Department of Reproductive Medicine* da Universidade da Califórnia em San Diego, Califórnia-USA pelo apoio ao estudo estatístico, assim como, ao Dr. Fernando Ferreira do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo em São Paulo-Brasil.

À amiga Raquel Helena Rocha Fernandes pela amizade e apoio sempre.

Este projeto recebeu recursos de auxílio à pesquisa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Processo número 400250/2014-4 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Proc. No 2015/16776-3. Agradecemos ao CNPq e à FAPESP a concessão dos imprescindíveis recursos.

*“O período de maior ganho de conhecimento e
experiência é o período de maior dificuldade na
vida de cada um”.*
(Dalai Lama)

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	2
2 REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1 Ocorrência dos melanomas orais em cães.....	6
2.2 Localização anatômica dos melanomas.....	7
2.3 Diagnóstico.....	8
2.4 Tratamento e prognóstico.....	12
2.5 Metaloproteinases de Matriz (MMP) e uroquinases (UPA).....	15
2.6 A toxina do <i>Bacillus anthracis</i>	16
3 JUSTIFICATIVA.....	23
3.1 Hipótese.....	23
4 OBJETIVOS.....	25
4.1 Primário	25
4.2 Secundário	25
5 MÉTODOS	27
5.1 Cultivo celular	27
5.2 Ensaio de citotoxicidade in vitro	29
5.3 Análise imuno-histoquímica dos melanomas.....	31
5.4 Ensaio clínico piloto em cães	33
6 RESULTADOS.....	38
6.1 Ensaio de citotoxicidade in vitro	38
6.2 Análise imuno-histoquímica dos melanomas.....	49
6.3 Ensaio clínico piloto em cães	52
6.3.1 Cão número 1 (estadiamento III).....	57

6.3.2 Cão número 2 (estadiamento III)	63
6.3.3 Cão número 3 (estadiamento III)	69
6.3.4 Cão número 4 (estadiamento III)	73
6.3.5 Cão número 5 (estadiamento I)	78
7 DISCUSSÃO	85
8 CONCLUSÕES	95
9 ANEXOS	97
9.1 Anexo A - Parecer do Comitê de Ética no uso de animais – Faculdade Medicina da Universidade de São Paulo.....	97
9.2 Anexo B - Parecer do Comitê de Ética no uso de animais – Faculdade Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo.	98
9.3 Anexo C - Parecer do Comitê de Ética no uso de animais – Faculdade Medicina Veterinária da Universidade Anhembi Morumbi.	99
9.4 Anexo D – Termo de consentimento livre e esclarecido TCLE.	100
9.5 Anexo E – Sequencia de fotos do cão 1 ao longo do tratamento com a toxina reengenheirada do <i>Bacillus anthracis</i>	103
9.6 Anexo F – Sequencia de fotos do cão 2 ao longo do tratamento com a toxina reengenheirada do <i>Bacillus anthracis</i>	106
9.7 Anexo G – Sequencia de fotos do cão 3 ao longo do tratamento com a toxina reengenheirada do <i>Bacillus anthracis</i>	109
9.8 Anexo H – Sequencia de fotos do cão 4 ao longo do tratamento com a toxina reengenheirada do <i>Bacillus anthracis</i>	111
9.9 Anexo I – Sequencia de fotos do cão 5 ao longo do tratamento com a toxina reengenheirada do <i>Bacillus anthracis</i>	113
9.10 Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 1	115
9.11 Anexo L – Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 2	116
9.12 Anexo M – Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 3.....	117
9.13 Anexo N – Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 4.....	118
9.13 Anexo O – Anexo O – Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal 5	119
10 REFERÊNCIAS	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACI	animal clinical investigation
ALT	alanina amino transferase
AMPc	adenosina monofosfato ciclica
AMPc	3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico
<i>B anthracis</i>	<i>Bacillus anthracis</i>
BRAF	<i>B type Raf kinase</i>
CCE	carcinomas de células escamosas
CCOGC	Canine Comparative Oncology and Genomic consortium
CMG2	<i>capillary morphogenesis protein-2</i>
COTC	Comparative Oncology Trials Consortium
DE	doença estável
DNA	ácido desoxirribonucleico
DP	doença progressiva
EF	<i>edema factor</i>
EF-2	<i>elongation factor-2</i>
ERK	extracellular regulated kinase
FA	fosfatase alcalina
FP ou FP59	<i>fusion protein</i>
H&E	hematoxilina e eosina
HT	hematócrito
HT29RJ	linhagem celular HT-29
LF	<i>letal factor</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MM	melanomas malignos
mm ³	milímetro cúbico
MMC	melanoma maligno cutâneo
MMP	metaloproteinases de matriz
MT1-MMP	metaloproteinase 1 de membrana

MTT	brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium
NCI-COP	National Cancer Institute Comparative Oncology Program
NIH	National Institutes of Health
PA	<i>protective antigen</i>
RC	reposta completa
RECIST	<i>response evaluation criteria in solid tumours</i>
RO	resposta objetiva
RP	resposta parcial
RT-PCR	<i>real time polimerase chain reaction</i>
TEM-8	<i>tumor endothelium marker-8</i>
TIMP2	inibidor de metaloproteinase 2
TLD	tempo livre da doença
TMS	tempo médio de sobrevida
UPA	uroquinase
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

$\%$	porcentagem
$\geq$	igual ou maior
X	vezes

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Melanoma maligno em cavidade bucal de cão. Formação ulcerada de superfície irregular, hemorrágica em região de mucosa gengival e sublingual. Fonte: Nishiya, AT. 9
- Figura 2 -** Melanoma maligno em cavidade bucal de cão. Formação arredondada e enegrecida em região de mucosa gengival em maxila. Fonte: Nishiya, AT 10
- Figura 3 -** Melanoma maligno em cavidade bucal de cão. Formação irregular, eritematosa e hemorrágica em região de mucosa gengival de maxila. Fonte: Nishiya, AT. 10
- Figura 4 -** Modo de ação da toxina do *Bacillus anthracis*. Após a secreção pelo *Bacillus anthracis*, os componentes nativos da toxina (PA, EF e LF) distribuem-se para vários tecidos. Após ligação aos receptores de superfície celular (CMG2 e TEM8), a PA é clivada por uma furina ou protease do tipo furina, obtendo-se a PA63, que forma espontaneamente ligômeros capazes de se ligar a LF e EF. A PA também pode ser clivada por outras proteases não identificadas e resultar em um PA63 oligomerizada e ligar-se a LF e EF antes mesmo da ligação com CMG2 e TEM8. CMG2 é o principal receptor da toxina *in vivo*. O complexo da toxina é então internalizado por endocitose mediada pelo receptor. Uma vez dentro de endossomas, o complexo da toxina encontra um ambiente ácido, o que induz a formação do canal na membrana, permitindo que LF e EF exerçam o seu efeito citotóxico no citosol (Leppa *et al.*, 2014). Fonte: Starnbach e Collier (2003)..... 19
- Figura 5 -** Modo de ação da toxina reengenheirada do B anthracis. O componente PA da toxina ativa foi substituído por PAU2-R200A (marrom), distribuindo-se para vários tecidos. Após ligação aos receptores de superfície celular (pink), são clivadas por uma UPA (verde) da célula, ao invés da furina, obtendo-se a PA63, que forma espontaneamente oligômeros (marrom) capazes de se ligar a LF (roxo) ou FP reengenheirada. LF ou FP são liberados no citoplasma da célula para agir inibindo a via MAPK ou a síntese proteica, respectivamente, causando morte celular. O mesmo ocorre com a PAL1-I207R e MMP. Fonte: ³modificado por Nishiya AT. 20

Figura 6 -	Modo de ação da toxina reengenheirada do antrax combinada, PAL1-I207R associada ao PAU2-R200A, e juntamente com a LF, dependentes da clivagem pela MMP e UPA, respectivamente. Fonte: ³ modificado por Nishiya, AT.	21
Figura 7 -	Células de melanoma bucal canino oriundas de cultivo celular primário. THEO.....	28
Figura 8 -	Células de melanoma bucal canino oriundas de cultivo celular primário. TLM1.....	29
Figura 9 -	Modelo de placa de 96 poços para o tratamento com LF (500 ng/ml) associada à PA (colunas 1-6) e PAL1/PAU2 (colunas 7-12) nas células. B. mesmo esquema foi utilizado para a placa FP 100ng/ml. Controle negativo (linha H colunas 1-6) e controle branco (linha H colunas 7-12). Fonte: Nishiya, AT.....	31
Figura 10 -	Aplicação intratumoral da toxina reengenheirada do <i>Bacillus anthracis</i> em melanoma bucal. As áreas circulares representam as regiões da biopsia por punch. A. Mensuração do tumor com paquímetro digital. B. Fonte: Nishiya, AT.....	35
Figura 11 -	Mensuração do tumor com paquímetro digital. Fonte: Nishiya, AT..	36
Figura 12 -	Densidade óptica mensurada por espectrofotometria em cada tratamento (barra) com a toxina do <i>Bacillus anthracis</i> por 48 horas na linhagem HT29RJ. Todas as associações em concentrações de 0-5000ng/ml de PA ou PAL1/PAU2 causaram citotoxicidade significativa à HT29-RJ em relação ao grupo sem tratamento (controle) ($p < 0,0001$ ****).	41
Figura 13 -	Densidade óptica mensurada por espectrofotometria em cada tratamento com a toxina do <i>Bacillus anthracis</i> por 48 horas na linhagem GMGD2. Todas as associações em concentrações de 0-5000ng/ml de PA ou PAL1/PAU2 causaram citotoxicidade significativa à GMGD2 em relação ao grupo controle sem tratamento ($p < 0,0001$ ****).	42
Figura 14 -	Densidade óptica mensurada por espectrofotometria em cada tratamento com a toxina do <i>Bacillus anthracis</i> por 48 horas na linhagem GMGD5. Toxicidade significativa com o uso da FP+PA ou PAL1/PAU2 em relação ao grupo controle sem tratamento ($p < 0,0001$ ****), porém não houve citotoxicidade após o tratamento com LF+PA ou PAL1/PAU2	43

- Figura 15 -** Densidade óptica mensurada por espectrofotometria em cada tratamento com a toxina do *Bacillus anthracis* por 48 horas na linhagem THEO. Toxicidade celular significativa com o uso da FP+PA ou PAL1/PAU2 em relação ao grupo controle foi observada ($p < 0,0001$ ****), porém não houve citotoxicidade após o tratamento com LF+PA ou PAL1/PAU2 44
- Figura 16 -** Densidade óptica mensurada por espectrofotometria em cada tratamento com a toxina do *Bacillus anthracis* por 48 horas na linhagem TLM1. Toxicidade significativa foi observada com o uso da FP+PA ou PAL1/PAU2 em relação ao grupo sem tratamento ($p < 0,0001$ ****). A linhagem não demonstrou citotoxicidade após o tratamento com LF+PA ou PAL1/PAU2 em relação ao grupo sem tratamento, exceto nas concentrações de 494 (**) e 1571ng/ml (*) de LF+PA 45
- Figura 17 -** Densidade óptica mensurada por espectrofotometria em cada tratamento com a toxina do *Bacillus anthracis* por 48 horas na linhagem YAN. Toxicidade significativa foi observada com o uso da FP+PA ou PAL1/PAU2 em relação ao grupo sem tratamento ($p < 0,0001$ ****), exceto nas concentrações menores de FP+PAL1/PAU2 (5 e 15ng/ml). A linhagem não demonstrou citotoxicidade após o tratamento com LF+PA ou PAL1/PAU2 em relação ao grupo sem tratamento. citotoxicidade não significativa somente em 5 e 15ng/ml. 46
- Figura 18 -** Média da viabilidade celular em diferentes concentrações das associações da toxina do *Bacillus anthracis* A. (FP+PA), B. (FP+PAL1/PAU2), C. (LF+PA) e D. (LF+PAL1/PAU2) nas linhagens celulares de melanoma bucal canino. Nos tratamentos com FP, somente a linhagem YAN não atingiu 50% de viabilidade Nos tratamentos com LF somente a GMGD2 demonstrou citotoxicidade tendo comportamento semelhante ao controle positivo (HT29-RJ)..... 48
- Figura 19 -** Porcentagem de marcações imuno-histoquímicas positivas, negativas e inconclusivas para a uroquinase UPA, receptor da uroquinase UPAR, MMP-2, MT1-MMP e TIMP-2 em 30 amostras de melanomas bucais caninos..... 51
- Figura 20 -** Variação do volume tumoral ao longo das aplicações da toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis*. Considerando-se o volume inicial e final de cada tumor, verificou-se que, os cães 1 e 3 apresentaram doença estável (DE) e os cães 2, 4 e 5 resposta parcial (RP)..... 55

- Figura 21 -** Aspecto macroscópico do melanoma do cão 1, ao longo do tratamento intratumoral com a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis*. **A.** Formação ulcerada, friável e hemorrágica em ramo horizontal de mandíbula esquerda no dia 0. **B.** Diminuição da hemorragia no dia 02. **C.** Necrose e secreção purulenta nos **D.** dias 04 e **E.** 07. **F.** Retorno do aumento de volume, presença de necrose e hemorragia discretas nos dias 09 e 11. **G.** Formação eritematosa e hemorragia discreta no dia 14 da cirurgia. (Fonte: Nishiya, AT..... 60
- Figura 22 -** Variação do volume tumoral ao longo das 6 aplicações da toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* no cão 1. No final do tratamento houve redução de 12% do volume tumoral. 61
- Figura 23 -** Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 1. **A.** Melanoma melânico desmoplásico, cujas células arranjam-se em ninhos entremeados por tecido conjuntivo, constituído por matriz extracelular, células fusiformes e redondas e numerosos vasos sanguíneos. H&E, objetiva 1,25x. **B.** objetiva 5,6x. **C.** Após o tratamento com a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis*, observa-se a presença de linfócitos em meio às células neoplásicas em . Área de necrose de coagulação contígua à massa tumoral, com congestão e edema e hemorragia. Notas infiltrado inflamatório de mononucleares. H&E, objetiva 1,25x. **D.** Objetiva 5,6x. 62
- Figura 24 -** Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 1. **E.** Detalhe da área de necrose, mostrando fibrina, edema e hemorragia. H&E, objetiva 20x. **F.** Detalhe da massa tumoral, mostrando célula em mitose atípica (seta maior) e corpúsculo apoptótico (seta menor). H&E, objetiva 40x. 63
- Figura 25 -** Fotomicrografia da imuno-histoquímica em aumento de 400x evidenciando a marcação para o ki-67, **A.** antes ≥ 19 e **B.** após ≥ 19 o tratamento com a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* no animal 1. 63
- Figura 26 -** **A.** Aspecto macroscópico do melanoma do cão 2, ao longo do tratamento intratumoral com a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis*. Formação enegrecida, friável e circunscrita em maxila esquerda no dia 0. **B.** Ulceração em mucosa jugal no dia 04 (B). **C.** Face normal e **D.** com edema no dia 07. **E.** Diminuição da hemorragia e do volume no dia 14 e **F.** maxilectomia parcial no dia 14. Fonte: Nishiya, AT..... 65
- Figura 27 -** Variação do volume tumoral ao longo das 6 aplicações da toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* no cão 2. No final do experimento houve uma redução de 47% do volume tumoral inicial. 67

- Figura 28 -** Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 2. **A.** Melanoma melânico, cujas células arranjam-se em ninhos entremeados por tecido conjuntivo antes do tratamento com a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis*. H&E, objetiva 1,25x. **B.** H&E, objetiva 5,6x. **C.** Presença de infiltrado linfocítico após o tratamento. H&E, objetiva 1,2x. **D.** Presença de infiltrado linfocítico após o tratamento. H&E, objetiva 5,6x. 68
- Figura 29 -** Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 2. **E.** Detalhe da área de necrose. H&E, objetiva 40x. **F.** Detalhe dos melanócitos neoplásicos organizados em ninhos. H&E, objetiva 40x. 68
- Figura 30 -** Fotomicrografia da imuno-histoquímica em aumento de 400x. **A.** marcação para o Ki-67, antes ≥ 19 . **B.** após 12,2 o tratamento com a toxina reengenheirada no animal 2. 69
- Figura 31 -** **A.** Aspecto macroscópico do melanoma do cão 3 em maxila direita. formação enegrecida, ulcerada, friável e excessivamente hemorrágica no dia 0. **B.** Formação enegrecida e pouco hemorrágica no dia 07 para remoção cirúrgica. Fonte: Nishiya, AT 70
- Figura 32 -** Variação do volume tumoral ao longo das aplicações da toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* no cão 3. Houve aumento em 20% do volume tumoral no final do experimento. 71
- Figura 33 -** Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 3. **A.** Melanoma melânico antes do tratamento. H&E, objetiva 1,25x. **B.** H&E, objetiva 5,6x. **C.** Presença de extensas área de necrose após o tratamento com a toxina. H&E, objetiva 1,25x. **D.** Presença de vênulas em necrose. H&E, objetiva 5,6x. 72
- Figura 34 -** Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 3. **A.** Melanoma melânico, cujas células arranjam-se em ninhos entremeados por tecido conjuntivo. Observar vasos sanguíneos apresentando necrose e infiltrado inflamatório após o tratamento com a toxina. H&E, objetiva 4x. **B.** Detalhe de vaso sanguíneo mostrando necrose, fibrina, e trombo (seta). H&E, objetiva 40x 72
- Figura 35 -** Fotomicrografia da imuno-histoquímica em aumento de 400x. **A.** marcação para o Ki-67, antes ≥ 19 . **B.** Ki-67 após 7 o tratamento com a toxina reengenheirada no animal 3. 73

- Figura 36 -** Aspecto macroscópico do melanoma do cão 4 em pré-maxila direita. **A.** Formação ulcerada, enegrecida e hemorrágica no dia 0. **B.** Formação sem hemorragia no dia 02. **C.** Aplicação intratumoral da toxina reengenheirada, **D.** Formação de dimensões menores e sem hemorragia no dia 07 da cirurgia. **E.** Remoção e confecção de retalho de mucosa labial para o defeito. Fonte: Nishiya, AT 75
- Figura 37 -** Variação do volume tumoral ao longo das 3 aplicações da toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* no cão 4. No final do tratamento houve 37% de diminuição do volume tumoral inicial..... 76
- Figura 38 -** Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 4. **A.** Melanoma melânico desmoplásico antes do tratamento. H&E, objetiva 1,25x. **B.** H&E, objetiva 5,6x. **C.** Após o tratamento com a toxina, presença de intensa vascularização, congestão e necrose. H&E, objetiva 1,25x. **D.** H&E, objetiva 5,6x..... 77
- Figura 39 -** Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 4. **A.** Detalhe da área de necrose, mostrando edema e hemorragia. H&E, objetiva 20x. **B.** Detalhe de vaso sanguíneo mostrando congestão, infiltrado inflamatório de polimorfonucleares e edema. H&E, objetiva 40x..... 77
- Figura 40 -** Fotomicrografia da imuno-histoquímica em aumento de 400x. **A.** marcação para o Ki-67, antes 8,2. **B.** marcação Ki-67 de 4,6 depois do tratamento no animal 4..... 78
- Figura 41 -** Aspecto macroscópico do melanoma do cão 5 em maxila na região de mucosa de palato duro. **A.** Formação plana de coloração negra e bordos róseos, discretamente ulcerada no dia 0. **B.** Formação plana de coloração negra e bordos róseos sem ulceração no dia 07. **C.** Aplicação intratumoral da toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis*. **D.** Cirurgia de remoção do melanoma e enxerto. **E** Formação de fistula oro-nasal 17 dias após a cirurgia. Fonte: Nishiya, AT 80
- Figura 42 -** Variação do volume tumoral ao longo das 3 aplicações da toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* no cão 5. No final do tratamento, o tumor diminuiu em 34%. do seu volume inicial..... 81
- Figura 43 -** Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 5. **A.** Melanoma melânico antes do tratamento com a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis*. H&E, objetiva 1,25x. **B.** células arranjam-se em ninhos entremeados por tecido conjuntivo. Nota-se necrose superficial. H&E, objetiva 5,6x. **C.** Outra área de necrose superficial. H&E, objetiva 1,25x. **D.** Detalhe da área de necrose de coagulação. H&E, objetiva 5,6x..... 82

- Figura 44 -** Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 5. **A.** Necrose e alteração do vaso sanguíneo próximo a área de necrose. H&E, objetiva 4x. Outra área de necrose superficial. H&E, objetiva 4x. 82
- Figura 45 -** Fotomicrografia da imuno-histoquímica em aumento de 400x, **A.** marcação para o Ki-67, antes 3,6. **B.** Ki-67 no valor de 16 depois do tratamento no animal 5. 83

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Estadiamento clínico para tumores da cavidade bucal. Classificação TNM “ <i>Tumor, Nodes, Metastasis</i> ”.	11
Quadro 2 -	Anticorpos utilizados para o exame imuno-histoquímico das amostras de melanoma oral canino. UPA (<i>uroquinase plaminogen activator</i>), UPAR (receptor para UPA), MMP-2 (matriz metaloproteinase-2), MT1-MMP (metaloproteinase de membrana tipo 1), TIMP-2 (inibidor de metaloproteinase-2) e Ki-67 (índice de proliferação celular).....	33
Quadro 3 -	Critérios para inclusão do paciente canino com melanoma na cavidade bucal.	34
Quadro 4 -	Protocolo para aplicação intratumoral da toxina reengenheirada em cães com melanoma oral.	35
Quadro 5 -	Resenha dos 5 cães tratados com a toxina reengenheirada do <i>B anthracis</i>	52
Quadro 6 -	Classificação da resposta clínica segundo RECIST para tumores sólidos (Nguyen <i>et al.</i> , 2015).	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Presença ou ausência de citotoxicidade e IC50 (ng/ml) alcançada nas linhagens de melanoma oral canino, submetidas às quatro associações da toxina reengenheirada do <i>B anthracis</i> . A associação principal para fins terapêuticos é a LF+PAL1/PA2.	40
Tabela 2 -	Estudo qualitativo imuno-histoquímico dos anticorpos UPA, UPAR, MMP-2, MT1-MMP e TIMP-2 em 30 amostras de melanoma bucal canino e 5 tecidos normais controles (intestino, mucosa jugal, mucosa gengival , rim e fígado).	50
Tabela 3 -	Características dos melanomas bucais malignos dos cães tratados com a toxina reengenheirada.	54
Tabela 4 -	Porcentagem de redução do maior diâmetro (mm) e do volume (mm ³) nos dias 07 e 14, após o tratamento com a toxina reengenheirada nos 5 cães com melanoma bucal.	55
Tabela 5 -	Resultados dos exames laboratoriais uma semana antes da aplicação da toxina reengenheirada do <i>Bacillus anthracis</i> nos 5 cães com melanoma bucal.	56
Tabela 6 -	Resultados dos exames laboratoriais de 5 a 22 semanas após aplicação da toxina reengenheirada do <i>Bacillus anthracis</i> nos 5 cães com melanoma bucal.	56
Tabela 7 -	Imunomacação de UPA, UPAR, MMP-2, MT1-MMP e TIMP-2 nas amostras teciduais dos 5 animais com melanoma bucal tratados com a toxina reengenheirada do <i>Bacillus anthracis</i>	56
Tabela 8 –	Alterações histológicas e marcação para proliferação celular Ki-67 antes e após o tratamento com a toxina reengenheirada do <i>Bacillus anthracis</i>	57
Tabela 9 -	Resultados obtidos das mensurações do tumor, peso vivo do animal, sintomas locais e condição dos linfonodos mandibulares nos dias 0, 02, 04, 07, 09, 11 e 14 da aplicação da toxina modificada no cão numero 1.	59

Tabela 10 -	Resultados obtidos das mensurações do tumor, peso vivo do animal, sintomas locais apresentados e condição dos linfonodos mandibulares nos dias 0, 02, 04, 07, 09, 11 e 14 da aplicação da toxina modificada no cão numero 2.	66
Tabela 11 -	Resultados obtidos das mensurações do tumor, peso vivo do animal, sintomas locais apresentados e condição dos linfonodos mandibulares nos dias 0, 02, 04 e 07 da aplicação do cão numero 3.....	71
Tabela 12 -	Resultados obtidos das mensurações do tumor, peso vivo do animal, sintomas locais apresentados e condição dos linfonodos mandibulares nos dias 0, 02, 04 e 07 da aplicação da toxina modificada no cão numero 4	76
Tabela 13 -	Resultados obtidos das mensurações do tumor, peso vivo do animal, sintomas locais apresentados e condição dos linfonodos mandibulares nos dias 0, 02, 04 e 07 da aplicação do cão numero 5.....	81

RESUMO

Nishiya AT. Administração intratumoral de uma toxina engenheirada ativada por uroquinase (UPA) e metaloproteinase (MMP) para o tratamento do melanoma oral canino: estudo piloto [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Os melanomas malignos em cães são uma das mais frequentes neoplasias diagnosticadas na cavidade oral. Infiltração local, recidiva (15-41%) e o alto potencial para metástases em linfonodos regionais (18-53%) e pulmões (23-27%) nos animais acometidos, conferem uma menor sobrevida (131-818 dias), ressaltando a necessidade e importância do estudo de novas terapias para o tratamento efetivo da doença. As uroquinases (UPA) e metaloproteinases (MMPs) são proteases superexpressas em uma variedade de células tumorais e raramente estão presentes em células fisiologicamente normais. A toxina do *Bacillus anthracis* é composta por três proteínas chamadas: fator letal (LF), fator de edema (EF) e antígeno protetor (PA). A toxina foi reengenheirada para a formação de dois tipos de PAs chamadas PAU2-R200A e PAL1-I207R, ativadas por UPA e MMPs da superfície das células tumorais, respectivamente, formando um complexo semelhante a um poro celular para permitir a internalização da LF. A citotoxicidade dessa associação reengenheirada PAU2-R200A, PAL1-I207R e LF ocorre quando a LF atinge o meio intracelular e causa a morte celular por interrupção da via de sinalização celular MAPkinase. O objetivo deste estudo é avaliar o potencial terapêutico da toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis*, PAU2-R200A, PAL1-I207R e LF, dependentes de UPA e MMP, em melanomas orais de cães. Três etapas foram propostas para este estudo: o estudo *in vitro* da citotoxicidade de 5 linhagens de melanomas caninos submetidas à toxina reengenheirada, a avaliação da expressão de UPA e MMP em amostras parafinadas de melanoma oral canino e o tratamento intratumoral com a toxina modificada em cães com melanomas orais espontâneos. A linhagem GMGD2 foi a única que demonstrou sensibilidade à toxina estudada, apesar da concentração inibitória de 50% das células ter sido alta ($IC_{50}=4.964,16$ mg/dl) em relação a linhagem controle HT29-RJ ($IC_{50}=179,47$). As demais linhagens não demonstraram redução da viabilidade celular com o aumento da concentração da toxina reengenheirada e não atingiram a IC_{50} . Dentre as amostras de melanomas submetidos a imuno-histoquímica, 76,6% expressavam tanto uroquinases quanto metaloproteinases. Melanomas orais espontâneos de cães variando de 231,8 a 18601,6 mm³ em volume, sem evidências de metástases, foram tratados com as aplicações da toxina modificada por via intratumoral, previamente à excisão, realizada nos dias 07 ou 14 do tratamento. Dentre os animais estudados, todos apresentaram evolução favorável classificada como doença estável e resposta parcial.

Somente um animal apresentou reação local. Nenhum dos pacientes apresentou efeito colateral sistêmico importante. Os resultados sugerem que existe potencial terapêutico da toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* sobre os melanomas bucais caninos e futuros ensaios clínicos são possíveis em cães e de extrema importância para o estudo mais aprofundado da toxina como nova terapia antineoplásica.

Descritores: Neoplasias bucais; *Bacillus anthracis*; Cães; Melanoma; Terapia de alvo molecular; Ensaio clínico.

ABSTRACT

Nishiya AT. *Intratumoral administration of urokinase (uPA) and metalloproteinase (MMP)-activated engineered toxin for treatment of canine oral melanoma: pilot study* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Malignant melanomas in dogs are one of the most frequent malignancies diagnosed in the oral cavity. Local infiltration, recurrence (15-41%) and the high potential for regional lymph nodes metastases (18-53%) and lungs (23-27%) in the affected animals, confer a lower survival (131-818 days), emphasizing the necessity and importance of the study of new therapies for the effective treatment of the disease. Urokinase (UPA) and metalloproteinases (MMPs) are overexpressed proteases in a variety of tumor cells and are rarely present in normal physiological cells. *Bacillus anthracis* toxin is composed of three proteins called lethal factor (LF), edema factor (EF) and protective antigen (PA). The toxin was re-engineered for the formation of two types of PAs called PAU2-R200A and PAL1-I207R, activated by UPA and MMPs from the surface of tumor cells, respectively, forming a cell-like complex to allow the internalization of the LF. The cytotoxicity of this association PAU2-R200A, PAL1-I207R and LF occurs when LF reaches the intracellular environment and causes cell death by disruption of the MAPkinase cell signaling pathway. The objective of this study is to evaluate the therapeutic potential of UPA and MMP-dependent *Bacillus anthracis* toxin (PAU2-R200A, PAL1-I207R and LF) to treat oral melanomas in dogs. Three steps were proposed: cytotoxicity assay of 5 lineages of canine melanomas submitted to the re-engineered toxin, immunohistochemistry study for UPA and MMP expression in paraffin samples of canine oral melanoma and intratumoral treatment with toxin in dogs with spontaneous oral melanomas. The lineage GMGD2 was the only one that showed sensitivity to the toxin studied, although 50% inhibitory concentration of the cells was high (IC₅₀ = 4,964.16 mg / dl) in relation to the HT29-RJ control lineage (IC₅₀ = 179.47). Among the samples of melanomas submitted to immunohistochemistry, 76.6% expressed both urokinase and metalloproteinases. Spontaneous oral melanomas of dogs ranging volume from 231.8 to 18601.6 mm³ with no evidence of distant metastases, were treated with the applications of intratumoral re-engineered toxin prior to surgical excision. All of them has presented favorable evolution classified as stable disease and partial response. Only one animal had a local allergic reaction. None of the patients had a significant systemic side effects. The results suggest that there is a potential therapeutic effect of re-engineered anthrax toxin on canine melanomas and future clinical trials are possible in dogs and extremely important for further studies on the role of the *B. anthracis* toxin as a new antineoplastic agent.

Descriptors: Mouth neoplasms; *Bacillus anthracis*; Dogs; Melanoma; Molecular targeted therapy; Clinical trial.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Nos dias de hoje, o câncer ainda representa um dos maiores desafios para a ciência e para a prática médica no homem. Quanto aos animais, o problema não é diferente. Dentre as espécies de animais domésticos, os cães, que estão se tornando mais longevos, também são acometidos por diversos tipos de neoplasias, à semelhança da espécie humana.

Modelos de câncer murino têm sido úteis para analisar a biologia das vias envolvidas na iniciação, promoção e progressão do câncer. No entanto, freqüentemente não apresentam características que definem o câncer em humanos, incluindo longos períodos de latência, instabilidade genômica, heterogeneidade de células tumorais e seu microambiente circundante. Mais importante, a biologia complexa de recorrência do câncer e o desenvolvimento de metástases não são adequadamente reproduzidos nos modelos convencionais de animais de laboratório utilizadas no desenvolvimento de antineoplásicos. Em virtude destes fatos, o desenvolvimento e aprovação de novos medicamentos contra o câncer tem sido um processo moroso e caro, e, por conseguinte, modelos adicionais que representam melhor a doença humana são necessários.

Neste cenário, a oncologia veterinária começa a destacar-se junto ao meio científico. A transição disciplinar entre oncologia humana e veterinária é conhecida como oncologia comparada. Os tumores de cães e os humanos apresentam diversas semelhanças, como o aspecto histológico, alterações genéticas, alvos moleculares, comportamento biológico e respostas a terapias convencionais (Paoloni; Khanna, 2008). De fato, diversos grupos, principalmente nos Estados Unidos, têm voltado sua atenção para os cânceres espontâneos de cães, como modelos das neoplasias humanas, já que o genoma do cão, publicado em 2005 (Lindblad-Toh *et al.*, 2005), mostrou muitas semelhanças entre estas espécies.

Khanna *et al.*, 2009, publicaram em *Nature Biotechnology* artigo informando que os cães podem ser utilizados como modelos para a oncologia humana; num trocadilho, afirmaram que até neste momento o cão é o melhor amigo do homem.

Neoplasias mamárias, ósseas, hemolinfóides, hepáticas, cutâneas, e também o melanoma, apresentam indiscutíveis semelhanças com as correspondentes na espécie humana.¹

Estudos experimentais para a descoberta de novos agentes antineoplásicos são importantes e fazem parte dos estudos pré-clínicos. Para estes estudos, linhagens celulares são geradas a partir de neoplasias espontâneas, ou são adquiridas de bancos de células no Brasil ou exterior, para que sejam expostas aos agentes que se quer testar. Havendo efeitos positivos nestas linhagens, os estudos podem prosseguir para a próxima etapa, os estudos in vivo.

Ensaio clínico multicêntrico é um tipo especial de estudo de coorte no qual as intervenções são especificamente introduzidas pelos investigadores de forma a melhorar a possibilidade de observar efeitos livres de vieses. Estes estudos vêm sendo realizados em seres humanos em todo o mundo, e, mais recentemente, em cães. De fato, a estrutura de Consórcios para a realização de estudos clínicos multicêntricos em animais portadores de neoplasias já existe nos Estados Unidos desde 2003: o *Comparative Oncology Trials Consortium* (COTC), o *Animal Clinical Investigation* (ACI), e o *Canine Comparative Oncology and Genomic Consortium* (CCOGC) (Paoloni; Vail, 2013). Um dos mais ativos consórcios, o COTC é gerenciado pelo *National Institutes of Health – National Cancer Institute Comparative Oncology Program* (NCI-COP), e tem a função de desenhar e executar clinical trials em cães para investigar novas terapias. Este consórcio é composto também por uma unidade de Pesquisa e Desenvolvimento, o COTC-PD, uma rede de laboratórios para a realização de ensaios e serviços incluindo diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímica, imuno-citoquímica, citometria de fluxo, genômica, proteômica, cultivos celulares, e outras técnicas, para dar suporte aos clinical trials, visando a melhor obtenção dos *endpoints* necessários. Segue exemplo recente de como a estrutura de consórcios de Oncologia Comparada auxiliou na aceleração da cadeia de desenvolvimento de novos antineoplásicos. Recentemente um grupo de médicos veterinários oncologistas de Illinois, EUA, realizou ensaios clínicos em cães portadores de osteossarcoma com o agente PAC1. Como os resultados foram positivos,

¹ Available from:
<http://news.illinois.edu/news/13/0717cancer_drug_PaulHergenrother_TimFan.html>.

este antineoplásico entrou em ensaio clínico em humanos em 2014. “*The compound, known as PAC -1, has so far proven safe and has promising anti-cancer effects in cell culture, in mouse models of cancer and in pet dogs with spontaneously occurring lymphomas and osteosarcomas*”.

No Brasil, ensaios clínicos em cães vêm sendo estimulados por diversos grupos internacionais, e a estrutura para o desenvolvimento destes ensaios vem sendo consolidada em nosso País. O presente trabalho, que visa avaliar a eficácia da toxina do *Bacillus anthracis* reengenheirada, produzida e cedida por pesquisadores do NIH, em melanoma bucal canino, é um dos primeiros ensaios clínicos de novos agentes antineoplásicos realizados no Brasil.

Estudos laboratoriais na área de câncer dificilmente chegam até o paciente, pois torna-se difícil testar os resultados na espécie alvo. Desta forma, justificamos a necessidade deste estudo, que certamente contribuirá para que novas terapias saiam da bancada do laboratório e possam, com segurança, chegar até os pacientes portadores de câncer.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ocorrência dos melanomas orais em cães

Os melanomas são uma das mais frequentes neoplasias malignas diagnosticadas na cavidade bucal dos cães. Raças pequenas caninas acima dos 10 anos de idade com mucosa bucal pigmentada estão sob alto risco de desenvolver os melanomas malignos (MM) nessas regiões anatômicas. Um comportamento comum aos MM bucais é a infiltração local, recidiva e metástases para os linfonodos regionais e pulmões. Este comportamento biológico é extremamente semelhante ao MM de mucosa humano (Cohen *et al.*, 1974; Bolon *et al.*, 1990; Sulaimon; Kitchell, 2003; Bergman, 2007; Bronden *et al.*, 2009; Marcus *et al.*, 2012). Num estudo com 384 tumores melanocíticos caninos, 19% foram MM em mucosa bucal e 59% foram MM cutâneos (MMC). As mucosas gengival e labial foram os locais mais acometidos e, metástases ou recidivas ocorreram em 59% dos casos de MM bucais e 12% dos MMC (Spangler; Kass, 2006).

Muitos estudos indicam que a incidência de MMs está aumentando. Uma análise epidemiológica de 2550 tumores em cães, realizada pela Universidade da Pennsylvania demonstrou que 4,27% eram MMs (Cohen *et al.*, 1974). Na Dinamarca, os tumores de cabeça e pescoço em cães ocorriam em 7.2% (128/1768) de todas das neoplasias estudadas e os tipos mais comuns nessas regiões eram os carcinomas de células escamosas (CCE) e os MM (20%) (Bronden *et al.*, 2009). No Brasil, um estudo de 1813 neoplasias, realizado na Universidade de São Paulo de 1993 a 2002, verificou que 3% (58/1813) desses casos eram tumores melanocíticos (Kimura *et al.*, 2012). Em outro estudo com 130 casos de neoplasias bucais, 33,07% eram MM, 9,23% CCE e 2,31% fibrossarcomas (Felizzola *et al.*, 1999); Resultados semelhantes foram observados em 200 casos de tumores orais num serviço de odontologia privado, sendo 26,5% MM, 10,5% CCE e 5,5% fibrossarcomas (Gioso *et al.*, 2004).

Os MM de mucosas são raros e fatais no homem. Estão localizados na cabeça e pescoço e aparentemente não tem a mesma etiologia dos MMC do homem. Em um

estudo com 452 casos de MM de mucosa, a maioria dos pacientes apresentava as neoformações sino-nasais (72,6%), sendo as mulheres brancas, na faixa etária dos 70 anos ou mais, as mais acometidas apresentando comportamento agressivo com altas taxas de recidiva, metástases regionais e distantes (Graviel *et al.*, 2011; Marcus *et al.*, 2012).

2.2 Localização anatômica dos melanomas

Os MM estão localizados em diferentes regiões anatômicas no cão, como a cavidade oral, os lábios, a pele, os olhos e os dígitos (Om *et al.*, Holt *et al.*, 2011; Zaroni *et al.*, 2013; Lyu *et al.*, 2015; Curtin *et al.*, 2005). Estes são uma das poucas neoplasias em animais, para o qual a localização é um indicador prognóstico importante (Esplin *et al.*, 2008).

Os estudos são controversos sobre o local mais comum para esta doença em cães. No entanto, a maioria dos estudos aponta para a cavidade oral (40-62%) e cutânea (27-31%) como os sítios mais comuns (Teixeira *et al.*, 2010; Omholt *et al.*, 2011; Zaroni *et al.*, 2013; Lyu *et al.*, 2015; Curtin *et al.*, 2005; Gillard *et al.*, 2014).

Na cavidade oral as mucosas gengivais e labiais são as áreas mais comumente acometidas (Ramos-Vara *et al.*, 2000), sendo uma doença localmente agressiva, com invasão local em ossos ocorrendo em 57% das lesões, com metástase em linfonodos regionais em 30,3%-74% dos casos e aos pulmões e outros órgãos distantes em 14%-92% dos cães afetados (Ramos-Vara *et al.*, 2000; Liptak *et al.*, 2013; Williams *et al.*, 2003).

Em contraste, os melanomas malignos humanos são mais comuns na pele, ocorrendo frequentemente em áreas expostas ao sol, devido à exposição aos raios ultravioleta (Azoury *et al.*, 2014). No entanto, os melanomas da mucosa em um homem são raros e podem ser difíceis de diagnosticar, sendo muitas vezes amelanóticos e em locais ocultos. A localização genital (glande vaginal e vulvar) é a mais frequente (46,5%), seguida de gastrointestinal (9%), anal (13%), localizações sino nasais (18%) e orais (13%) (Cinotti *et al.*, 2017). Os melanomas mucosos da cabeça e pescoço estão aumentando rapidamente nos Estados Unidos, em um estudo

de 452 casos observados, a maioria dos pacientes apresentava localização sino-nasal (72,6%) (Marcus *et al.*, 2012) e comportamento agressivo com taxas crescentes de recorrência e metástases regionais e distantes (Graviel *et al.*, 2011).

2.3 Diagnóstico

O histórico de crescimento rápido do MM é comum nos cães e macroscopicamente, as formações são arredondadas com superfície irregular, friáveis, hemorrágicas e podem ser pigmentadas, ou não e, muitas vezes, apresentando tecido desvitalizado no tumor (Figuras 1 a 3). O diagnóstico do melanoma em cães pode ser difícil devido aos diferentes graus de pigmentação desses e das características microscópicas, muitas vezes, semelhantes aos carcinomas, sarcomas, linfomas e tumores osteogênicos quando pouco diferenciados. Numa revisão de 122 casos de MM canino, 20,9% eram do tipo epitelióide, 34,1% fusiformes, 41,9% mistos, 2,3% eram do tipo “*clear cells*” e 0,8% de padrão adenóide/papilar. Os tumores melanocíticos são positivamente marcados na imuno-histoquímica para melan-A (92.6%), vimentina (100%), proteína S100a (76%) e enolase neurônio específica (NSE) (89.1%). Melan-A é um marcador específico e sensível para melanomas caninos (Ramos-Vara *et al.*, 2000), mas pode ser instável em linhagens de células cultivadas de melanomas. Assim, nesses casos, Melan-A e S100a, ambos podem ser úteis para confirmação do diagnóstico de melanoma e seu comportamento biológico (Koenig *et al.*, 2001).

A sensibilidade do exame citológico para o diagnóstico do melanoma amelanico é de 66,7%, e quando associado ao exame imuno-citoquímico, a sensibilidade alcança 100% (Przezdziecki *et al.*, 2015). Para diferenciar os linfonodos metastáticos daqueles com a presença dos melanófagos, a imuno-histoquímica para MELAN-A é o exame de escolha, porém a condição do linfonodo, se metastático ou não, não tem demonstrado relação com a progressão e sobrevida da doença, segundo Grimes *et al.* (2017).

Williams e Packer (2003) relataram presença de metástases em 70% das linfonodomegalias presentes em cães com melanomas bucais, e 40% de metástases em linfonodos aparentemente normais, portanto a remoção cirúrgica e avaliação histológica desses é sempre recomendada.

A organização mundial da saúde (*World Health Organization-WHO*) estabelece o estadiamento do melanoma oral para cães de acordo com o tamanho tumoral. O estadiamento I seriam os tumores menores que 2 centímetros de diâmetro, o estadiamento II àqueles entre 2 e 4 centímetros, o estadiamento III para tumores maiores que 4 centímetros e/ou com a presença de metástases em linfonodos e finalmente o estadiamento IV para melanomas com metástases a distância (Quadro 1).

Figura 1 - Melanoma maligno em cavidade bucal de cão. Formação ulcerada de superfície irregular, hemorrágica em região de mucosa gengival e sublingual. Fonte: Nishiya, AT.

Figura 2 - Melanoma maligno em cavidade bucal de cão. Formação arredondada e enegrecida em região de mucosa gengival em maxila. Fonte: Nishiya, AT.

Figura 3 - Melanoma maligno em cavidade bucal de cão. Formação irregular, eritematosa e hemorrágica em região de mucosa gengival de maxila. Fonte: Nishiya, AT.

Quadro 1 - Estadiamento clínico para tumores da cavidade bucal. Classificação TNM “*Tumor, Nodes, Metastasis*”.

Tumor primário (T)		Grupo de estadiamento			
Tis	tumor <i>in situ</i>	0	Tis	N0	M0
T1	tumor < 2 cm de diâmetro	I	T1	N0	M0
a	sem evidencia de invasão óssea	II	T2	N0	M0
b	com evidencia de invasão óssea	III	T1-T2	N1	M0
T2	tumor 2-4 cm de diâmetro		T3	N0, N1	M0
a	sem evidencia de invasão óssea	IVa	T1-3	N2	M0
b	com evidencia de invasão óssea		T4a	N0-2	M0
T3	tumor >4 cm de diâmetro	IVb	T1-3	N3	M0
a	sem evidencia de invasão óssea		T4b	N0-3	M0
b	com evidencia de invasão óssea	IVc	T1-3	N0-3	M1
T4 a	tumor invadindo cortical óssea, língua, nervo, seio maxilar e pele				
T4b	tumor invadindo espaço mastigatório, placas pterigoides, base do crânio ou artéria carótida				
Linfonodo regional (N)					
N0	sem metástases em linfonodos regionais				
N1	linfonodo <i>ipsilateral</i> com mobilidade				
a	sem evidencia de metástases				
b	com evidencia de metástases				
N2	linfonodo contralateral com mobilidade				
a	sem evidencia de metástases				
b	com evidencia de metástases				
N3	linfonodo sem mobilidade, fixo				
Metástases (M)					
M0	sem metástases a distancia				
M1	com metástases a distancia				

2

² World Health Organization WHO, 1980.

2.4 Tratamento e prognóstico

As opções de tratamento local para o MM canino incluem a cirurgia (Brockley *et al.*, 2013; Boston *et al.*, 2014) e a radioterapia (Freeman *et al.*, 2003), entretanto a recidiva e as metástases a distância são frequentes e a terapia sistêmica, como a quimioterapia e a imunoterapia devem ser consideradas (Liptak; Withrow, 2012; Mcentee, 2012).

A progressão clínica dos melanomas malignos da mucosa é semelhante nos cães e no homem, sendo invasivos localmente e muitas vezes, metastáticos por via linfática. O prognóstico dos melanomas então é reservado, mesmo utilizando-se de terapia multimodal, incluindo cirurgia, radioterapia e quimioterapia (Schiffman *et al.*, 2015).

Fatores prognósticos negativos incluem o estadiamento avançado, o tamanho maior que 4 centímetros, a evidência de metástases a distancia nos exames de imagem e as características histológicas do tumor. Tratamentos padrões como a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia têm benefícios clínicos mínimos a modestos e a morte ocorre geralmente por metástases sistêmicas (Bergman, 2007). Harvey *et al.* (1981) observaram que cães com melanoma e não submetidos a nenhum tipo de tratamento apresentaram tempo médio de vida de 65 dias.

O tempo médio de sobrevida para cães com melanomas orais tratados com cirurgia é de aproximadamente 17-18 meses para estadiamento I, 5-6 meses para estadiamento II e 3 meses para estadiamento III (Macewen *et al.*, 1986).

Tuohy *et al.* (2014) estudaram 70 casos de melanomas malignos bucais caninos tratados com cirurgia radical. As ressecções cirúrgicas foram realizadas com amplas margens, incluindo 2 a 3 cm de margens ósseas e 1cm de margens dos tecidos moles. A análise histopatológica mostrou que 72,9% dos tumores foram completamente excisados, e mesmo assim, dentre esses, 10% desenvolveram recidiva tumoral. Neste estudo, os cães submetidos à cirurgia como única opção de tratamento tiveram um tempo livre da doença (TLD) superior a 567 dias e um tempo médio de sobrevida (TMS) de 874 dias. Em uma pesquisa realizada por Boston *et al.* (2014), entre as cirurgias com margens amplas, 79,3% (73/92) foram completamente excisadas com base na avaliação histológica e, mesmo nesses houve recidiva em 8,3% dos animais (6/73) e o TMS desses cães foi de 354 dias. Esplin (2008) estudou 61 cães

diagnosticados com melanomas bucais bem diferenciados, que foram excisados e apresentaram um TMS de 1020 dias, com 3,2% de recidiva no local.

A ressecção do linfonodo regional foi estudada em tumores maxilofaciais. A análise dos linfonodos sentinelas forneceram informações essenciais sobre o estágio clínico da doença e também ajudaram a determinar o plano de tratamento mais adequado (Smith *et al.*, 1995; Hering *et al.*, 2002). Conforme demonstrado anteriormente, em uma pesquisa de 100 cães com melanoma oral, 53% apresentaram evidência citológica ou histopatológica de metástase em linfonodos mandibulares de tamanho e consistência normais (Willians *et al.*, 2003), portanto, a remoção regional dos linfonodos sempre é justificada nos casos de melanoma. Por outro lado, Grimes *et al.* (2017) verificou que a presença ou não de metástases em linfonodos, mantem a sobrevida dos animais acometidos em média de 422 dias e 669 dias, respectivamente.

A radioterapia é considerada eficaz para o tratamento local dos MM em cães (Proulx *et al.*, 2003), porém os protocolos hipofracionados ainda não estão muito bem estabelecidos (Bergman *et al.*, 2013). As taxas de resposta objetiva (RO) variaram de 82- 94,4%, as de resposta completa (RC) e parcial (RP) variaram entre 51-69% e 25-31% dos casos, respectivamente (Theon *et al.*, 1997; Bateman *et al.*, 1994; Murphy *et al.*, 2005; Cancedda *et al.*, 2014). O tempo mediano para a progressão da doença (TMPD) variou de 108-237 dias e o TMS de 159-357 dias (Tabela 1) (Bateman *et al.*, 1994; Cancedda *et al.*, 2014; Freeman *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2005; Proulx *et al.*, 2003; Theon *et al.*, 1997. A presença de lise óssea nos melanomas orais indicou um tempo livre da doença mais curto entre os animais tratados com radioterapia (Proulx *et al.*, 2003)

A quimioterapia isolada ou adjuvante ao tratamento cirúrgico oferece pouco benefício ao controle local dos MM caninos, porém a associação com a radioterapia retarda a progressão do tumor e ou melhora a sobrevida desses pacientes. Cancedda *et al.* (2014) compararam a eficácia da radioterapia isolada com a radioterapia com temozolamida em cães. Os cães tratados com temozolamida tiveram um tempo médio para progressão do tumor maior (204 dias), que os cães tratados apenas com radiação (108 dias). Freeman *et al.* (2003) observaram cães com MM tratados com cisplatina ou carboplatina antes da radioterapia e obtiveram o TMS mais longo de 357 dias quando comparado a outros protocolos. Outros estudos que combinam radiação com

agentes de quimioterapia como carboplatina, cisplatina ou melphalan não foram significativos para a progressão ou sobrevida dos animais (Proulx *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2005; Rassnick *et al.*, 2001).

O tratamento com os agentes platinados demonstrou resposta objetiva de 18-28% nos melanomas bucais caninos (Rassnick *et al.*, 2001; Boria *et al.*, 2004). A combinação da cisplatina com piroxicam resultou em 119 dias de TMS (Boria *et al.*, 2004).

Brockley *et al.* (2013) avaliaram o efeito da carboplatina na sobrevida de 63 pacientes caninos diagnosticados com o melanoma bucal, cutâneo ou digital após a terapia local. A adição da carboplatina não resultou no aumento significativo do TMS do MM bucal (389 dias). Num outro estudo, Dank *et al.* (2012) observaram recidiva em 41% dos casos, assim como as metástases em 41% dos cães com melanomas bucais tratados com cirurgia, carboplatina adjuvante e com ou sem radioterapia. O TMS foi de 387 dias para o grupo tratado com radioterapia e 440 dias para o grupo sem a adição de radioterapia.

Em um estudo comparativo, a cirurgia isolada ou associada a qualquer terapia adjuvante quimioterápica (carboplatina, ciclofosfamida metronômica), radioterápica ou com vacina xenogênea não melhorou o TMS em cães com melanoma oral, sendo de 874 e 396 dias, respectivamente (Tuohy *et al.*, 2014).

Boston *et al.* (2014) trataram 151 cães com melanoma oral e também concluíram que não haviam benefícios nos TMS entre cães que foram tratados somente com cirurgia radical (354 dias) e cirurgia associada a terapia adjuvante (352 dias).

A imunoterapia com o uso de vacinas representa um potencial terapêutico para os melanomas, modulando a sua progressão e metástases (Gyorffy *et al.*, 2005; Modiano *et al.*, 1999).

Em um estudo realizado por Bergman *et al.* (2003), um cão com melanoma oral e múltiplos nódulos metastáticos em pulmão (estadiamento IV) teve uma resposta completa por 329 dias e a media de sobrevida do grupo foi de 389 dias com o uso da vacina xenogênica de tirosinase humana.

Em outro estudo, a tirosinase humana foi codificada em plasmídeos, assim como a tirosinase murina, e aplicada em cães por via intramuscular por 4 aplicações, obtendo-se 389 dias e até 224 dias de sobrevida, respectivamente. Além disso, a vacina

foi segura com relação aos poucos efeitos colaterais e estimulou a produção de anticorpos (Bergman *et al.*, 2006).

Em outro estudo, o TMS para todos os cães com melanoma, porém em dígito, tratados com cirurgia e vacina de tirosinase de DNA murino, foi de 476 dias com 63% dos pacientes vivos no primeiro ano. O TMS para os estadiamentos I-IV foram, respectivamente, maiores que 952 dias, maior que 1093 dias, 321 dias e 76 dias (Manley *et al.*, 2011).

Em 2013, Ottnod e colaboradores verificaram que a vacina de tirosinase humana, não modificava a sobrevida dos cães tratados (485 dias) em comparação com os não tratados (585 dias).

2.5 Metaloproteinases de Matriz (MMP) e uroquinases (UPA)

As metaloproteinases e uroquinases são proteases superexpressas em diferentes tipos de tecidos tumorais e linhagens de células neoplásicas, sendo restritas em tecidos normais. Essa característica despertou a atenção dos cientistas para novas terapias contra o câncer, direcionadas a um alvo molecular. As MMPs fazem parte de uma família de enzimas capazes de degradar a maioria dos componentes da matriz extracelular (ECM), como o colágeno, laminina, fibronectina, elastina e proteoglicanos. A progressão tumoral num tecido tende a aumentar os níveis de diferentes tipos de MMPs. Os mais frequentemente encontrados são MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-11, MMP-13 e MMP-14. Evidências do papel das MMPs no processo de metástases, progressão tumoral e angiogênese têm sido relatadas por meio de experimentos utilizando modelos animais (Hoekstra *et al.*, 2001). Além das MMPs, o sistema ativador de uroquinase plasminogênio está relacionado com etapas da progressão do câncer como a gênese tumoral proliferação, migração, adesão celular e angiogênese do tumor. A degradação da ECM também faz parte da função desempenhada pelas uroquinases. Este sistema consiste na UPA, no receptor de UPA e seu inibidor primário, o inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1) (Duffy, 2004).

As amostras de tecidos de melanomas e carcinomas de células escamosas apresentaram elevada atividade de MMP-2, mas o gene que codifica para a MMP-2 não foi superexpresso nestes tumores segundo Nakaichi *et al.* (2007).

Hofmann *et al.* (2000) observaram que a metaloproteinase tipo I de membrana (MT1-MMP) foi superexpressa em pacientes humanos com melanoma e Lida *et al.* (2004) descreveram que MT1-MMP facilitou a invasão tumoral.

Em tumores melanocíticos verificou-se que todos estes expressavam a MMP-2 e MT1-MMP, mas somente os melanomas malignos superexpressavam MMP-9. Em linhagens celulares de melanoma canino (CML-1, CML-10C2, e CML-6M) e fibroblastos da derme, somente a linhagem de melanoma expressou MMP-9 (Docampo *et al.*, 2011).

Segundo Bailey *et al.* (2006), expressão de UPA e UPAR ocorre em todo o trato urinário dos cães. Em tumores mamários malignos de cães a expressão de UPA pode ser considerada um fator prognóstico. A superexpressão da UPA foi relacionada ao maior tamanho do tumor, à superexpressão do Ki-67 e ao crescimento invasivo. Também foi relacionado ao maior grau histológico do tumor, à presença de metástases em linfonodos regionais, ao desenvolvimento de metástases à distância, à menor sobrevida global e à menor sobrevida livre da doença (Santos *et al.*, 2011). As UPA não foram ainda avaliadas em melanomas caninos.

Em vista da presença de MMPs e UPAs mais frequentemente nos tecidos tumorais, a partir do ano de 2000, Liu, Bugge, Leppla e colaboradores iniciaram os estudos da toxina do *Bacillus anthracis* reengenheirada para o tratamento do câncer. Essas toxinas modificadas foram chamadas de PAL1-I210A e PAU2-R200A e seriam ativadas especificamente pela presença de MMPs e UPAs ativas e superexpressas nos tumores.

2.6 A toxina do *Bacillus anthracis*

Em 1955, Smith e colaboradores obtiveram a toxina do *Bacillus anthracis* a partir do plasma de cobaias contaminadas e mortas pelo bacilo. A partir de então, identificou-se as três partes da toxina chamada “edema fator” (EF), “protective

antigen” (PA) e “*lethal factor*” (LF). Isolamente as tres partes da toxina do *B. anthracis* não geraram nenhum efeito biológico nos animais estudados, mas quando a PA foi combinada com EF ou LF causaram edema de pele ou morte, respectivamente, dos animais estudados. Em 1963, Puziss e colaboradores purificaram a PA, que atualmente é utilizada como vacina para pessoas predispostas ao contato e infecção com a toxina do *Bacillus anthracis* (Leppla, 1982).

O PA liga-se aos receptores da superfície da célula endotelial, chamados “*tumor endothelium marker 8*” (TEM8 ou ANT XR1) ou “*capillary morphogenesis gene 2*” (CMG2 ou ANT XR2) (Bradley *et al.*, 2001; Scobie *et al.*, 2003), onde é clivado por uma protease do grupo das furinas na membrana celular. Esta interação resulta na formação de um complexo ativo heptamérico (PA₆₃) ligado ao receptor da toxina do *Bacillus anthracis* pelo terminal carboxila do fragmento de 63-kDa da PA. Por sua vez, a PA₆₃ é um canal para translocar EF e LF para o citosol, favorecendo a ação dessas, causando morte celular (Klimpel *et al.*, 1992). Estas três partes da toxina são individualmente atóxicas para as células, exceto quando o complexo PA, EF e LF são associados (Ezzell *et al.*, 1984; Leppla, 1982; Liu; Leppla, 2003; Liu *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2013) (Figura 4)

A citotoxicidade ocorre pela ação de EF, uma adenilato ciclase que aumenta os níveis de AMPc ou pela ação de LF, uma metaloprotease de zinco, que cliva e inativa a via MAPK (“*mitogen activated protein kinase*”). Assim, ocorre os bloqueios da ERK (“*extracellular regulated kinase*”) e da via de sinalização, que é essencial para muitos tipos celulares (Leppla, 1982; Ezzell *et al.*, 1984).

A alta citotoxicidade da toxina do *B. anthracis*, aliada à superexpressão da UPA e MMP em vários tipos tumorais e raramente presentes em células normais, levou Liu e colaboradores a reengenheirar parte da toxina do *Bacillus anthracis* a PA para ser ativada somente na presença da UPA e MMP na membrana celular.

Versões mutadas de PA foram construídas substituindo o sitio de ligação e clivagem das furinas, pelas MMPs. Esta PA mutada (PAL1) quando ativada por MMPs superexpressas na superfície de células tumorais, conduzem a internalização da porção LF ou FP59 (uma versão modificada LF), resultando em citotoxicidade direta para diversas células tumorais (Liu *et al.*, 2000) (Figura 5).

Outro estudo foi realizado com a substituição do mesmo local de clivagem da protease furina com PA, pela sequência da área de clivagem preferida da uroquinase, chamando-a de PAU2. Essa PAU2 para ser ativa e demonstrar citotoxicidade é dependente, além da UPA, da integridade da superfície da célula tumoral associada ao sistema de ativação do plasminogênio. Linhagens de células de melanoma murino (B16 - BL6) foram sensíveis a esta toxina modificada *in vitro* e *in vivo* (Liu *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2003) (Figura 6).

Para aumentar ainda mais a especificidade ao tumor, a toxina do *Bacillus anthracis* foi novamente reengenheirada para ser dependente da ativação de ambas as proteases, UPA e MMPs. De todas as combinações, a PAU2-R200A e PAL1-I210A administrada em combinação com LF pareceu ter o melhor índice terapêutico para os estudos *in vivo*, diferentemente da associação com FP (Liu *et al.*, 2005; Schafer *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013).

A FP construída a partir da exotoxina A da *Pseudomonas aeruginosa* fusionada com a porção LF foi utilizada somente no ensaio *in vitro*, pela sua maior toxicidade relatada em camundongos (50 vezes mais potente que a LF) (Liu *et al.*, 2003; Arora; Leppla, 1993; Liu *et al.*, 2013).

A toxina do *Bacillus anthracis* reengenheirada, ativada por UPA e MMP na superfície celular tem demonstrado ação tóxica quando associado a FP para uma ampla gama de células tumorais humanas, incluindo o câncer de pulmão (Su *et al.*, 2007), o de pâncreas, o de mama (Abi-Habibi *et al.*, 2006), o carcinoma de cabeça e pescoço (Schafer *et al.*, 2011), o carcinoma mamário (Khandia *et al.*, 2017) e o de melanoma (Rono *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2005).

Posteriormente sintetizada, a combinação PAU2-R200A e a variante PAL1-I1207R causou menor toxicidade aos camundongos tratados e maior citotoxicidade às células de melanoma humano *in vitro* (Wein *et al.*, 2015), justificando a combinação escolhida, PAU2-R200A e PAL1-I1207R, associada à LF para os estudos aqui apresentados. A versão reengenheirada de LF (FP) foi utilizada somente nos experimentos *in vitro* (Figura 4).

Atualmente, Liu *et al* (2017) observaram que a variante de PA, PAU2-K397Q, com a troca de resíduo 397 de lisina por glutamina, e a outra variante PAL1-D426K com a troca do resíduo 426 de aspartato por lisina, isoladamente não formam “poros”

funcionais *in vitro* e *in vivo*, exceto quando utilizados combinados, formando um heptamero funcional.

O câncer espontâneo em cão compartilha muita semelhança com o do homem, e é difícil de ser replicado em modelos laboratoriais de camundongos e pode responder às perguntas cruciais no desenvolvimento de novas drogas contra o câncer, assim pretende-se estudar o potencial terapêutico da toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* em melanomas bucais espontâneos num estudo piloto em cães (Vail *et al.*, 2012; Khanna *et al.*, 2009; Porrello *et al.*, 2006; London *et al.*, 2003).

Figura 4 - Modo de ação da toxina do *Bacillus anthracis*. Após a secreção pelo *Bacillus anthracis*, os componentes nativos da toxina (PA, EF e LF) distribuem-se para vários tecidos. Após ligação aos receptores de superfície celular (CMG2 e TEM8), a PA é clivada por uma furina ou protease do tipo furina, obtendo-se a PA₆₃, que forma espontaneamente 19ligômeros capazes de se ligar a LF e EF. A PA também pode ser clivada por outras proteases não identificadas e resultar em um PA₆₃ oligomerizada e ligar-se a LF e EF antes mesmo da ligação com CMG2 e TEM8. CMG2 é o principal receptor da toxina *in vivo*. O complexo da toxina é então internalizado por endocitose mediada pelo receptor. Uma vez dentro de endossomas, o complexo da toxina encontra um ambiente ácido, o que induz a formação do canal na membrana, permitindo que

LF e EF exercem o seu efeito citotóxico no citosol (Leppla *et al.*, 2014). Fonte: Starnbach e Collier (2003)³

Figura 5 - Modo de ação da toxina reengenheirada do B anthracis. O componente PA da toxina ativa foi substituído por PAU2-R200A (marrom), distribuindo-se para vários tecidos. Após ligação aos receptores de superfície celular (pink), são clivadas por uma UPA (verde) da célula, ao invés da furina, obtendo-se a PA63, que forma espontaneamente oligômeros (marrom) capazes de se ligar a LF (roxo) ou FP reengenheirada. LF ou FP são liberados no citoplasma da célula para agir inibindo a via MAPK ou a síntese proteica, respectivamente, causando morte celular. O mesmo ocorre com a PAL1-I207R e MMP. Fonte: ³modificado por Nishiya AT.

³ Starnbach e Collier, 2003.

Figura 6 - Modo de ação da toxina reengenheirada do antrax combinada, PAL1-I207R associada ao PAU2-R200A, e juntamente com a LF, dependentes da clivagem pela MMP e UPA, respectivamente. Fonte: ³modificado por Nishiya, AT.

3 JUSTIICATIVA

3 JUSTIFICATIVA

A toxina do *Bacillus anthracis* reengenheirada, ativada por UPA e MMP na superfície celular, tem demonstrado ação citotóxica para uma ampla gama de células tumorais humanas e murinas, incluindo o câncer de cólon, pulmão, pâncreas, mama e o melanoma. Isso gerou o interesse em iniciar testes para verificar a ação dessa toxina em melanomas bucais caninos, cujo tratamento é pouco efetivo e o prognóstico reservado.

3.1 Hipótese

A toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* tem ação antineoplásica em melanomas caninos *in vitro* e *in vivo*.

4 OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

4.1 Primário

O objetivo deste estudo é avaliar o potencial terapêutico da toxina do *Bacillus anthracis*, LF nativa, PAL1-I207R e PAU2-R200A reengenheirada, em ensaios pré-clínicos *in vitro* e clínico piloto em cães com melanoma espontâneos na cavidade bucal.

4.2 Secundário

Avaliar a sensibilidade das diferentes linhagens de melanoma canino submetidas a diferentes concentrações da toxina reengenheirada do *B. anthracis*.

Estudar a expressão *in situ* das proteases UPA e MMP em amostras de melanoma bucal canino usando *Tissue Microarrays* (TMA)

Avaliar os efeitos locais e as alterações clínicas dos cães portadores de melanoma bucal tratados com a toxina reengenheirada

5 MÉTODOS

5 MÉTODOS

5.1 Cultivo celular

Foram cultivadas as linhagens estabelecidas TLM1 e GMGD2 e GMGD5 de melanoma canino, gentilmente cedidas pelo professor Dr Jaime J Modiano do *College of Veterinary Medicine and the Masonic Cancer Center* da Universidade de Minnesota em Minneapolis-USA.

Yan e Theo foram linhagens oriundas de cultivos primários de melanomas orais caninos, desenvolvidas em projeto de iniciação científica da graduanda Andreia Caringi, sob orientação da professora Dra Maria Lucia Zaidan Dagli, no laboratório de oncologia experimental da FMVZ-USP. As células cultivadas foram extraídas de fragmentos (0,5cm de diametro) de melanomas orais de cães submetidos ao tratamento cirúrgico excisional do tumor, realizados no centro cirúrgico do Hospital Veterinario da Universidade Anhembi Morumbi. A obtenção das amostras ocorreu de modo asséptico em ambiente cirúrgico e transportados em meio Dulbecco's modified medium (DMEM) alta glicose (Sigma) acrescido de 200U/mL de penicilina, 200µg/mL de estreptomicina e 50µg/mL de anfotericina B (Sigma).

A fragmentação, desagregação e passagens das amostras do melanoma ocorreu também em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 unidades/ml) e estreptomicina (100µg/ml) em estufa a 5% de CO₂ e atmosfera umidificada a 37°C. A marcação imunocitoquímica revelou positividade para Citoqueratina, S-100 e Melan-A nas células Yan; e positividade para Melan-A e Vimentina nas células Theo (Ramos-Vara *et al.*, 2000; Koenig *et al.*, 2001).

As células de adenocarcinoma de cólon humana HT-29 foram adquiridas do Banco de células do Rio de Janeiro e denominadas neste estudo como HT29RJ. Estas foram utilizadas como controle positivo da ação citotóxica da toxina modificada do *B anthracis* (Schafer *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2001).

Todas as linhagens aqui cultivadas foram mantidas em DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina (100 unidades/ml) e estreptomicina (100µg/ml) em estufa a 5% de CO₂ e atmosfera umidificada a 37°C (figura 7,8)

Uma suspensão de $0,7 \times 10^4$ células/ml (150µl/poço em confluência de 70%) foi utilizada para plaquear 96 poços, 24 horas antes do tratamento com a toxina do *B anthracis*. Após 48 horas incubadas com a toxina modificada, foram submetidas ao teste colorimétrico para avaliar a citotoxicidade celular ocorrida. A leitura da densidade óptica foi realizada em espectrofotômetro Multi Skan Therm Scientific 570nm de absorvância com o MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H-brometo de tetrazolio Sigma) (Vega-Avila; Pugsley, 2011; Schafer *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2003).

Figura 7 - Células de melanoma bucal canino oriundas de cultivo celular primário.THEO.

Figura 8 - Células de melanoma bucal canino oriundas de cultivo celular primário. TLM1.

5.2 Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

Partes da toxina do *B anthracis*, PA e LF nativas, PAL1-I207R, PAU2-R200 e FP reengenheiradas, foram cedidas pelo laboratório de Doenças parasitárias do *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* do Instituto Nacional de Saúde (NIH) em Bethesda-EUA. A toxina modificada recebeu autorização dos órgãos do ministério da agricultura (MAPA) e da saúde (ANVISA) para ser adquirida pelo Laboratório de oncologia experimental do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi mantida em freezer em temperatura à -80°C. A toxina foi diluída em solução tampão fosfato (PBS) para a utilização no ensaio de citotoxicidade e também para o tratamento dos cães.

A parte da toxina que forma o heptamero, PA nativa ou PAL1-I210/PAU2-R200A (PAL1/PAU2) reengenheirada, foi associada a porção efetora da citotoxicidade, LF nativa ou LF reengenheirada (FP).

A FP construída a partir da exotoxina A da *Pseudomonas aeruginosa* fusionada com a porção LF foi utilizada somente no ensaio *in vitro*, pela sua maior toxicidade em camundongos (Liu *et al.*, 2003; Arora; Leppla, 1993).

Neste estudo *in vitro* foram utilizadas as associações:

- a) FP (100ng/ml) + PA nativa (0-5000ng/ml);
- b) FP (100ng/ml) + PAL1/PAU2 (0-5000ng/ml);
- c) LF nativa (500ng/ml) + PA nativa (0-5000ng/ml);
- d) LF nativa (500ng/ml) + PAL1/PAU2 (0-5000ng/ml).

A associação de LF nativa com PAL1/PAU2 reengenheirada foi a principal a ser avaliada em nosso trabalho, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, já que é a toxina do *Bacillus anthracis* modificada com citotoxicidade seletiva e maior índice terapêutico em estudos para fins terapêuticos.

O tratamento das células neoplásicas foi realizado em sextuplicata para cada concentração de 0 a 5000 ng/ml de PA ou PAL1/PAU2, associada tanto ao FP quanto ao LF em concentrações fixas.

Em todos os três momentos diferentes do experimento, foram avaliadas duas placas para cada linhagem. As células plaqueadas receberam, nas colunas 1 a 6, a associação de LF com PA e LF com PAL1/PAU2 nas colunas 7-12, assim como, nas placas associadas à FP (Figura 9). Utilizou-se a diluição seriada para o preparo das concentrações de 0, 5, 15, 49, 155, 494, 1571 e 5000ng/ml de PA ou PAL1/PAU2.

A linhagem de células de carcinoma da cólon humano (HT29RJ) foi utilizada como controle positivo para ação da toxina do *Bacillus anthracis* na presença da UPA e MMP celular (Schafer *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2005; Liu; Bugge; Leppla, 2001).

Figura 9 - Modelo de placa de 96 poços para o tratamento com LF (500 ng/ml) associada à PA (colunas 1-6) e PAL1/PAU2 (colunas 7-12) nas células. B. mesmo esquema foi utilizado para a placa FP 100ng/ml. Controle negativo (linha H colunas 1-6) e controle branco (linha H colunas 7-12). Fonte: Nishiya, AT

Os testes ANOVA de uma via e Dunnett foram utilizados para verificar se existe uma diferença de toxicidade entre as diferentes concentrações das associações da toxina, quando comparadas ao controle, sem tratamento, em cada tipo celular estudado. Estudos de análise estatística descritiva e cálculo da concentração inibitória (IC50) alcançada, por cada tipo celular, foram utilizados para determinar a sensibilidade das linhagens à toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis*.

5.3 Análise imuno-histoquímica dos melanomas

As amostras oriundas das biopsias de melanoma oral dos 5 cães atendidos e tratados com a toxina reengenheirada foram submetidas à revisão histopatológica e

imuno-histoquímica para os anticorpos UPA (*Urokinase plasminogen activator*), UPAR (receptor de UPA), MMP-2 (metaloproteinase 2), MT1-MMP (MMP de membrana), TIMP-2 (inibidor de metaloproteinases) e Ki-67 (índice de proliferação celular) (Quadro 2) (Abi-habibi *et al.*, 2006a; Bayley *et al.*, 2006; Bergin *et al.*, 2011; Faleiro *et al.*, 2013; Ramos–Vara *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000; Hofmman *et al.*, 2000).

Outras 31 amostras parafinadas de melanoma oral canino resultantes de estudo retrospectivo, de casos já atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Anhembi Morumbi, foram submetidos à confecção do TMA (*tissue microarray*) e técnica de imuno-histoquímica para avaliação qualitativa positiva ou negativa de UPA, UPAR, MMP-2, MT1-MMP e TIMP-2 (Ramos-Vara *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000; Hofmman *et al.*, 2000; Aresu *et al.*, 2011; Faleiro *et al.*, 2013; Nakaichi *et al.*, 2007).

A técnica de imuno-histoquímica, iniciou-se a partir do corte de 4 µm das amostras parafinadas, desparafinização com xilol, hidratação em álcool e recuperação antigênica com citrato em pH 6,0 em panela Pascal (S2800, Dako Cytomation-Carpinteria, CA). Resfriamento até a temperatura ambiente, lavagem em água deionizada, bloqueio da peroxidase endógena, lavagem novamente em água deionizada e solução tampão PBS. O bloqueio de proteínas inespecíficas, a incubação com os anticorpos primários por 12-18 horas a 4 °C e a lavagem com solução tampão PBS antecederam a utilização do sistema de detecção por polímero (Histofine Simple Stain Max Po 414154F) e o cromógeno (Dako AEC Substrate Chromogen Ready-to-Use K3464). Contracolorou-se as lâminas com Hematoxilina de Harris e montagem em meio aquoso (Faramount; Dako, S3025).

Todas as amostras do melanoma oral canino, submetidas a imuno-histoquímica, foram analisadas qualitativamente, por dois patologistas, somente quanto a positividade das marcações nas células neoplásicas e não estromais ou endoteliais (Ramos-Vara *et al.*, 2000; Faleiro *et al.*, 2013; Abi-Habibi *et al.*, 2006a).

Os controles positivos utilizados foram amostras teciduais de rim e intestino normais caninos para UPA e UPAR, de fígado normal canino para MMP-2, TIMP-2 e MT1-MMP (Bergin *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2000; Hofmman *et al.*, 2000; Aresu *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2011; Bailey *et al.*, 2006; Faleiro *et al.*, 2013a; Faleiro *et al.*, 2013b). O marcador de proliferação celular Ki-67 foi utilizado nas amostras colhidas dos melanomas caninos antes e depois do tratamento com a toxina reengenheirada. A

análise quantitativa foi calculada pela média da contagem das marcações positivas em 5 campos com aumento de 400 vezes em microscopia (Schafer *et al.*, 2011; Bergin *et al.*, 2011).

Quadro 2 - Anticorpos utilizados para o exame imuno-histoquímico das amostras de melanoma oral canino. UPA (*uroquinase plaminogen activator*), UPAR (receptor para UPA), MMP-2 (matriz metaloproteinase-2), MT1-MMP (metaloproteinase de membrana tipo 1), TIMP-2 (inibidor de metaloproteinase-2) e Ki-67 (índice de proliferação celular).

Anticorpo	Código	Mono/ Policlonal	Origem	Diluição	Localização
UPA H140 St Cruz	Sc14019	Policlonal	Coelho	1:200	Citoplasma
UPAR Dako	M7294	Monoclonal	Camundongo	1:200	Membrana, Citoplasma
MMP-2 Abcam	Ab86607	Monoclonal	Camundongo	1:200	Membrana, Citoplasma, Núcleo, Matriz Extracelular
MT1-MMP Abcam	Ab53712	Policlonal	Coelho	1:200	Membrana, Melanossoma, Matriz extracelular
TIMP-2 Abcam	b1828	Monoclonal	Camundongo	1:200	Membrana
Ki-67 Dako	clone MIB- 1, M7240	Monoclonal	Camundongo	1:50	Membrana, Citoplasma

Fonte: Datasheet.

5.4 Ensaio clínico piloto em cães

Para o tratamento dos cães, cada dose da toxina continha 250 µg de LF, 375 µg de PAL1 e 375 µg PAU2 diluídas em 2 ml de PBS.

O ensaio em cães com melanoma oral, submetidos à terapia com a toxina do *Bacillus anthracis* reengenheirada, foi realizado em animais atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Anhembi Morumbi, sob aprovação dos comitês de ética

(CEUA) do Hospital Veterinário da Universidade Anhembi Morumbi e Faculdades de Medicina e Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (Anexo A, B, C).

Esses animais foram admitidos para o estudo, sob o consentimento do proprietário (Anexo D), e tiveram acompanhamento, à distancia, ao longo de um ano. Os critérios para inclusão dos pacientes caninos basearam-se na confirmação citológica ou histopatológica do melanoma, no bom estado geral e na ausência de metástases a distancia em pulmões, fígado e baço (Quadro 3).

Quadro 3 - Critérios para inclusão do paciente canino com melanoma na cavidade bucal.

Diagnóstico histopatológico ou citológico	melanoma maligno
Localização do tumor	mandíbula ou maxila (formação mensurável com paquímetro)
Exame radiográfico torácico	ausência de metástases em pulmões
Exame ultrassonográfico abdominal	ausência de metástases em fígado e baço
Hemograma, bioquímico renal e hepático	indicando bom estado geral

Nesse estudo, foram utilizados 5 cães no total. Os animais receberam 3 ou 6 aplicações da associação de 375 ug PAL1I207R + 375 ug PAU2-R200A + 250 ug LF num volume total de 1 ou 2ml, por via intratumoral (Figura 10), nos dias 0, 02, 04 ou 0, 02, 04, 07, 09 e 11. A mensuração do comprimento, largura e espessura do tumor foram realizados com paquimetria digital (Figura 11) nos mesmos dias 0, 02, 04, 07, 09, 11 e 14, sob anestesia geral, assim como, a avaliação do estado geral do paciente nesses dias (Quadro 4). A cirurgia de excisão tumoral foi realizada nos dias 07 ou 14 na dependência do numero de aplicações realizadas. Nos dias 0 e 07 ou 14 foram colhidos fragmentos para avaliação histopatológica e imuno-histoquímica.

Quadro 4 - Protocolo para aplicação intratumoral da toxina reengenheirada em cães com melanoma oral.

1. Pesagem, confirmação de jejum hídrico e alimentar
2. Assinatura dos termos de consentimento do projeto e de anestesia geral
3. Medicação pré-anestésica: cloridrato de tramadol intramuscular 2mg/kg
4. Acesso venoso: solução fisiológica
5. Antibioticoterapia: enrofloxacin subcutânea 5mg/kg
6. Antiinflamatório: dexametasona intravenosa 0,1mg/kg
7. Anestesia geral: propofol intravenoso 5mg/kg
8. Anti-sepsia do tumor com clorexidina aquosa
9. Mensuração do tumor: comprimento e largura com paquímetro digital
10. Biopsia com punch (2 fragmentos de 5mm) no dia 0, antes da primeira aplicação intratumoral da toxina (Figura 6A)
11. Documentação fotográfica
12. Mensuração do tumor com paquímetro nos dias 0, 02, 04 e 07 ou 0, 02, 04, 07, 09, 11 e 14
13. Aplicação de 1-2ml da toxina intratumoral nos dias 0, 02 e 04 ou 0, 02, 04, 07, 09 e 11
14. Cirurgia de mandibulectomia ou maxilectomia e excisão do linfonodo regional no dia 07 ou 14.

Figura 10 - Aplicação intratumoral da toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* em melanoma bucal. As áreas circulares representam as regiões da biopsia por punch. A. Mensuração do tumor com paquímetro digital. B. Fonte: Nishiya, AT

Figura 11 - Mensuração do tumor com paquímetro digital. Fonte: Nishiya, AT.

6 RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 Ensaio de citotoxicidade in vitro

O teste colorimétrico de espectrofotometria com MTT, foi utilizado para verificar a citotoxicidade de 5 tipos de melanomas caninos à toxina do *Bacillus anthracis*. A densidade óptica mensurada foi utilizada como parâmetro para interpretação da citotoxicidade, segundo Sieuwerts *et al.* (1995) e Vega-Avila e Pugsley (2011), e quanto menor a densidade optica, maior a citotoxicidade alcançada. Considerou-se a linhagem celular sensível ao tratamento, quando a densidade óptica alcançada por essa, comparada às células sem tratamento, foram estatisticamente significativas, com $p < 0,001$ nos testes de Anova de uma via e Dunnett com auxílio do aplicativo Prisma 7.0 (Figuras 8A-E); e quando a viabilidade calculada for semelhante ao controle positivo (HT29RJ), em porcentagem, de cada linhagem celular tratada, em análise estatística descritiva. Para estimar a IC50, apenas as linhagens que atingiram a viabilidade de 50% foram consideradas no modelo de efeitos aleatórios com interação entre linhagem e concentração. A análise foi realizada com auxílio do software R (R Core Team, 2017; Bussab; Morettin, 2006).

A combinação de partes da toxina do *Bacillus anthracis* foram utilizadas para avaliar a capacidade de internalização da toxina pela célula (PA nativa ou PAL1/PAU2 reengenheirada) e a consequente ação citotóxica de bloqueio da via MAPK pelo “*letal fator*” (LF nativa) ou “*fusion protein*” (FP reengenheirada).

Os estudos foram realizados em sextuplicata para cada combinação e concentração; e em três experimentos em tempos diferentes.

As concentrações de LF foram fixadas em 500ng/ml, de FP em 100ng/ml e as de PA e PAL1/PAU2 variando de 0 a 5000ng/ml, segundo estudos anteriores de Liu *et al.* (2003, 2017) e Schafer *et al.* (2011).

As combinações estudadas foram FP+PA, FP+PAL1/PAU2, LF+PA, LF+PAL1/PAU2, cada uma em oito concentrações diferentes (0, 5, 15, 49, 155, 494, 1571 e 5000ng/ml) resultantes da diluição seriada de PA ou PAL1/PAU2 na placa de

cultivo de 96 poços. O controle negativo para cada combinação foi o próprio cultivo da célula sem o tratamento com a toxina do *Bacillus anthracis* e sob as mesmas condições de temperatura, CO₂ e umidade.

A linhagem HT29RJ foi utilizada como controle positivo entre as linhagens nesse estudo, sofrendo a ação da toxina do *Bacillus anthracis* (Liu *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2013; Schafer *et al.*, 2011), demonstrando sensibilidade em todas as combinações e concentrações quando comparadas às mesmas células não tratadas (Figura 12); e também apresentando as menores IC₅₀, variando de 1,73; 3,0; 4,39 e 179,4ng/ml, respectivamente às FP+PA, FP+PAL1/PAU2, LF+PA e LF+PAL1/PAU2 (Tabela 1).

A linhagem GMGD2 foi também sensível a todas as associações e combinações estudadas da toxina do *Bacillus anthracis*, quando comparadas às mesmas células não tratadas (Figura 13). A IC₅₀ variou de 3,0; 7,92; 12,93 e 4964,1ng/ml, respectivamente nas associações FP+PA, FP+PAL1/PAU2, LF+PA e LF+PAL1/PAU2. Somente a associação LF+PAL1/PAU2 apresentou valor alto (4964,1ng/ml) para a inibição de 50% das células em comparação ao valor de 179,4 da HT29-RJ (Tabela 2, Figura 8D).

A linhagem GMGD5 foi sensível somente às associações da FP, combinada com a PA nativa ou PAL1/PAU2, e não demonstrou toxicidade para nenhuma das associações com LF (Figura 14 e Tabela 1). A IC₅₀ para FP+PA foi de 1,73ng/ml e para FP+PAL1/PAU2 foi de 2,34ng/ml. As associações com LF+PA ou LF+PAL1/PAU2 não causaram citotoxicidade à GMGD5 e também não alcançaram IC₅₀.

A linhagem THEO foi sensível somente às associações da FP com a PA nativa ou PAL1/PAU2, e não demonstrou toxicidade para nenhuma das associações com LF (Figura 15). A IC₅₀ para FP+PA foi de 1,82ng/ml e para FP+PAL1/PAU2 foi de 4,06ng/ml (Tabela 1). As associações com LF+PA ou LF+PAL1/PAU2 não causaram citotoxicidade a esta linhagem que também não alcançou a IC₅₀.

A linhagem TLM1 foi sensível somente às associações da FP com a PA nativa ou PAL1/PAU2 (Figura 12). A IC₅₀ para FP+PA foi de 1,99ng/ml e para FP+PAL1/PAU2 foi de 7,92ng/ml (Tabela 1). Nas associações com LF não houve citotoxicidade a esta linhagem, exceto nas concentrações de 494 (**) e 1571ng/ml (*) de LF+PA (Figura 16).

A linhagem YAN foi sensível tanto a associação FP+PA quanto à FP+PAL1/PAU2, porém, nesta última, as concentrações menores de 5 e 15ng/ml não causaram citotoxicidade significativa, assim como, nas associações com LF (Figura 13). A linhagem YAN não alcançou a IC50 em nenhuma das associações e concentrações estudadas (Figura 17, Tabela 1).

Tabela 1 - Presença ou ausência de citotoxicidade e IC50 (ng/ml) alcançada nas linhagens de melanoma oral canino, submetidas às quatro associações da toxina reengenheirada do *B anthracis*. A associação principal para fins terapêuticos é a LF+PAL1/PA2.

Linhagem celular	FP+PA		FP+PAL1/PAU2		LF+PA		1.1.1.1.1.1	LF+ PA L1/ PA2
	Citotoxicidade IC50		Citotoxicidade IC50		Citotoxicidade IC50			Citotoxicidade IC50
GMGD2	(+)	3,00	(+)	7,92	(+)	12,93	(+)	4964,1
GMGD5	(+)	1,73	(+)	2,34	(-)	NA	(-)	NA
HT29RJ controle positivo	(+)	1,73	(+)	3,00	(+)	4,39	(+)	179,4
THEO	(+)	1,82	(+)	4,06	(-)	NA	(-)	NA
TLM1	(+)	1,99	(+)	7,92	(-)*	NA	(-)	NA
YAN	(+)	NA	(+)□	NA	(-)	NA	(-)	NA

NA=não alcançou a IC50 nas concentrações estudadas. Presença (+) ou ausência (-) de citotoxicidade estatisticamente significativa. *Citotoxicidade significativa somente em 494 e 1571ng/ml. □ Citotoxicidade não significativa somente em 5 e 15ng/ml.

Figura 12 - Densidade óptica mensurada por espectrofotometria em cada tratamento (barra) com a toxina do *Bacillus anthracis* por 48 horas na linhagem HT29RJ. Todas as associações em concentrações de 0-5000ng/ml de PA ou PAL1/PAU2 causaram citotoxicidade significativa à HT29-RJ em relação ao grupo sem tratamento (controle) ($p < 0,0001$ ****).

Figura 13 - Densidade óptica mensurada por espectrofotometria em cada tratamento com a toxina do *Bacillus anthracis* por 48 horas na linhagem GMGD2. Todas as associações em concentrações de 0-5000ng/ml de PA ou PAL1/PAU2 causaram citotoxicidade significativa à GMGD2 em relação ao grupo controle sem tratamento ($p < 0,0001$ ****).

Figura 14 - Densidade óptica mensurada por espectrofotometria em cada tratamento com a toxina do *Bacillus anthracis* por 48 horas na linhagem GMGD5. Toxicidade significativa com o uso da FP+PA ou PAL1/PAU2 em relação ao grupo controle sem tratamento ($p < 0,0001$ ****), porém não houve citotoxicidade após o tratamento com LF+PA ou PAL1/PAU2 .

Figura 15 - Densidade óptica mensurada por espectrofotometria em cada tratamento com a toxina do *Bacillus anthracis* por 48 horas na linhagem THEO. Toxicidade celular significativa com o uso da FP+PA ou PAL1/PAU2 em relação ao grupo controle foi observada ($p < 0,0001$ ****), porém não houve citotoxicidade após o tratamento com LF+PA ou PAL1/PAU2 .

Figura 16 - Densidade óptica mensurada por espectrofotometria em cada tratamento com a toxina do *Bacillus anthracis* por 48 horas na linhagem TLM1. Toxicidade significativa foi observada com o uso da FP+PA ou PAL1/PAU2 em relação ao grupo sem tratamento ($p < 0,0001$ ****). A linhagem não demonstrou citotoxicidade após o tratamento com LF+PA ou PAL1/PAU2 em relação ao grupo sem tratamento, exceto nas concentrações de 494 (**) e 1571ng/ml (*) de LF+PA .

Figura 17 - Densidade óptica mensurada por espectrofotometria em cada tratamento com a toxina do *Bacillus anthracis* por 48 horas na linhagem YAN. Toxicidade significativa foi observada com o uso da FP+PA ou PAL1/PAU2 em relação ao grupo sem tratamento ($p < 0,0001$ ****), exceto nas concentrações menores de FP+PAL1/PAU2 (5 e 15ng/ml). A linhagem não demonstrou citotoxicidade após o tratamento com LF+PA ou PAL1/PAU2 em relação ao grupo sem tratamento. □citotoxicidade não significativa somente em 5 e 15ng/ml.

A viabilidade celular das linhagens estudadas GMGD2, GMGD5, THEO, TLM1 e YAN, em percentual dos controles negativos corrigidos pelo controle branco, foram calculadas após o tratamento com FP+PA (Figura 18 A), FP+PAL1/PAU2 (Figura 18 B), LF+PA (Figura 18 C) e LF +PAL1/PAU2 (Figura 18D).

Em relação aos cultivos celulares tratados com FP associadas à PA ou PAL1/PAU2, a linhagem YAN foi a que apresentou maior viabilidade celular mesmo com aumento da concentração da toxina, não atingindo a IC50. As linhagens GMGD2, GMGD5, THEO e TLM1 apresentaram viabilidade semelhante ao controle positivo HT29RJ após o tratamento (Figura 18A-D).

Em relação aos cultivos celulares tratados com LF associadas à PA ou PAL1/PAU2, a linhagem mais sensível foi a GMGD2 semelhante ao controle positivo HT29RJ (Figura 19). As demais linhagens não alcançaram 50% de viabilidade com o aumento da concentração da toxina nessa associação.

Figura 18 - Média da viabilidade celular em diferentes concentrações das associações da toxina do *Bacillus anthracis* A. (FP+PA), B. (FP+PAL1/PAU2), C. (LF+PA) e D. (LF+PAL1/PAU2) nas linhagens celulares de melanoma bucal canino. Nos tratamentos com FP, somente a linhagem YAN não atingiu 50% de viabilidade. Nos tratamentos com LF somente a GMD2 demonstrou citotoxicidade tendo comportamento semelhante ao controle positivo (HT29-RJ)

6.2 Análise imuno-histoquímica dos melanomas

Amostras parafinadas de melanoma oral canino, oriundas do estudo retrospectivo de casos atendidos no hospital veterinário da Universidade Anhembi Morumbi, foram utilizadas para a confecção de bloco de “tissue microarray” (TMA). Cortes histológicos foram obtidos submetidos à marcação, por imuno-histoquímica, para os anticorpos UPA, UPAR, MMP-2, MT1-MMP e TIMP-2.

Um total de 31 melanomas da cavidade oral e 5 amostras de tecidos normais do cão (rim, intestino, fígado, mucosa jugal e gengival) foram analisados, em triplicata, quanto a positividade ou negatividade das marcações em citoplasma, membrana e/ou núcleo.

Os tecidos normais foram utilizados como controle positivo, sendo o renal e o intestinal para os anticorpos UPA e UPAR (Bailey *et al.*, 2011) e o hepático para MMP-2, MT1-MMP e TIMP-2 (Nakaichi *et al.*, 2007) e as mucosas jugal e gengival normais para aspecto comparativo. Todos apresentaram expressão das proteases, exceto o tecido renal, que não demonstrou a presença de UPAR.

Somente a amostra CG1767F foi desconsiderada por perda do corte histológico no TMA, totalizando 30 amostras de melanoma bucal canino.

Dentre a amostragem total dos 30 melanomas, 76,6% (23/30) demonstraram positividade para todos os anticorpos estudados (UPA, UPAR, MMP-2, MT1-MMP e TIMP-2).

A UPA foi identificada em 83,3% (25/30) dos melanomas orais, assim como o UPAR. A presença de MMP-2 ocorreu em 93,3% (28/30) e a de TIMP-2 em 86,6% (26/30) das amostras (Tabela 2) (Figura 19).

As marcações imuno-histoquímicas foram classificadas em positivas, negativas ou inconclusivas para UPA, UPAR, MMP-2, MT1-MMP e TIMP-2 nas 30 amostras dos melanomas bucais caninos. Somente MT1-MMP demonstrou expressão em 100% dos melanomas estudados.

Tabela 2 - Estudo qualitativo imuno-histoquímico dos anticorpos UPA, UPAR, MMP-2, MT1-MMP e TIMP-2 em 30 amostras de melanoma bucal canino e 5 tecidos normais controles (intestino, mucosa jugal, mucosa gengival, rim e fígado).

Amostra		UPA	UPAR	MMP-2	MT1-MMP	TIMP-2
Tecidos normais	intestino normal	P	P	P	P	P
	mucosa jugal normal	P	P	P	P	P
	mucosa gengival normal	P	P	P	P	P
	rim normal	P	(N)	P	P	P
	fígado normal	P	P	P	P	P
1.	44544A	P	P	P	P	P
2.	76794C	P	P	P	P	P
3.	1072H35	(N)	(N)	P	P	(N)
4.	40113	P	P	P	P	P
5.	1072H33	P	P	P	P	P
6.	50029B	P	P	P	P	P
7.	39225B	P	P	P	P	P
8.	KA509	(?)	(?)	(?)	P	P
9.	CG1467A	P	P	P	P	P
10.	35820	P	P	P	P	P
11.	1072H30	(N)	P	P	P	(N)
12.	KA474	P	P	P	P	P
13.	39225A	P	P	P	P	P
14.	43879	P	P	P	P	P
15.	1072H41	P	P	P	P	P
16.	KA161	P	P	P	P	P
17.	1072H9	(N)	(N)	P	P	(N)
18.	KA270	P	P	P	P	P
19.	43578	P	P	P	P	P
20.	1072H29	P	P	P	P	P
21.	1072H25	P	(N)	P	P	P
22.	1072H26	P	P	P	P	P
23.	CG1767F	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)
24.	81939B	(N)	P	P	P	P
25.	YANmeta	P	P	P	P	P
26.	81939	P	P	P	P	P
27.	45800	P	P	P	P	P
28.	YANoral	P	P	P	P	P
29.	57164	P	P	P	P	P
30.	53331	P	P	P	P	P
31.	CG1799A	P	P	(?)	P	(N)
Total de positivos		25/30	26/30	28/30	30/30	26/30

(N) negativo, (P) positivo, (?) inconclusivo, (X) perda da amostra, (tecidos normais) controles positivos

Figura 19 - Porcentagem de marcações imuno-histoquímicas positivas, negativas e inconclusivas para a uroquinase UPA, receptor da uroquinase UPAR, MMP-2, MT1-MMP e TIMP-2 em 30 amostras de melanomas bucais caninos.

6.3 Ensaio clínico piloto em cães

Foram utilizados 5 animais com melanoma oral espontâneo atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Anhembi Morumbi diagnosticados por citologia ou histopatologia. Todos os animais eram da espécie canina, 4 machos e 1 fêmea, entre 11 e 16 anos de idade com peso vivo entre 5 a 33 quilogramas (Quadro 5).

Quadro 5 - Resenha dos 5 cães tratados com a toxina reengenheirada do *B anthracis*.

Identificação	Raça	Idade (anos)	Sexo	Peso vivo (Kg)
1	Yorkshire terrier	11	macho	5,4
2	Daschund	14	macho	7,3
3	Sem raça definida	16	fêmea	5,7
4	Labrador	14	macho	33,3
5	Lhasa apso	12	macho	5

O estadiamento para melanomas nesses cães variou de I (cão 5) ou III (cão 1,2,3 e 4) e a localização em sua maioria na maxila (3/5), seguida de mandíbula (1/5) e palato duro (1/5) (Tabela 3).

Os melanomas melânicos foram mais frequentes (4/5) que amelânicos (1/5). O subtipo epitelióide (1/5), de células balonosas (1/5), desmoplásico (1/5) e fusiforme (2/5) foram diagnosticados por histopatologia nesses animais. Quatro cães apresentaram metástases em linfonodos mandibulares no momento da cirurgia, o cão 1, 2, 3 e 4, exceto cão 5 (Tabela 3).

O volume tumoral foi calculado pela formula $\text{volume} = (\text{comprimento} \times \text{largura}^2) / 2$ (Sugiura *et al.*, 1955). O maior volume foi o do cão numero 1 (18602 mm³), seguidos do numero 3 (8875 mm³), do numero 4 (7613 mm³), do numero 2 (2509 mm³) e do numero 5 (228 mm³) (Tabela 3).

A resposta clínica ao tratamento com a toxina reengenheirada foi avaliada por meio do maior comprimento e da variação do volume tumoral ao longo dos 7 ou 14 primeiros dias, sendo dia 0 o da primeira aplicação e as mensurações do tumor, sob anestesia geral, pelo menos nos dias 0, 2, 4 e 7 em cada um dos cães. As respostas foram classificadas segundo o RECIST (“*Response Evaluation Criteria in Solid Tumours*”, 2015) em completa (RC) quando há 100% de redução do tumor, em parcial (RP) quando a redução se apresentou maior que 30% e menor que 100% do volume do tumor, em doença estável (DE) quando a redução é menor que 30% ou quando

existe até 20% de aumento do tumor e finalmente doença progressiva (DP) quando o volume tumoral aumenta mais que 20% do inicial (Nguyen *et al.*, 2015) (Quadro 6).

O único animal que apresentou aumento do volume tumoral (20%) durante o tratamento com a toxina reengenheirada foi o de numero 3, porém, sendo o aumento menor que 20% considera-se uma DE. O cão 1 apresentou 12% de redução tumoral, sendo o valor menor que 30%, caracterizou também a DE. Os cães 2, 4 e 5, respectivamente com reduções de e 47%, 37% e 34%, apresentaram RP (tabela 4) (Figura 20).

Considerando-se o maior comprimento do tumor, todos os cães apresentaram de 0,85 (cão 3); 11(cão 1); 12 (cão 2); 13 (cão 5) e 14% (cão 4) de redução, caracterizando a doença estável (DE), segundo Nguyen *et al* (2015) (Tabela 4).

Os 2 primeiros cães tratados receberam 6 aplicações da toxina num intervalo de 14 dias. Nesse intervalo de tempo, foi observado um aumento do volume tumoral a partir do dia 07 do tratamento, que nos levou a diminuir o número de aplicações para 3, a fim de não degradar o estado geral do paciente.

Todos os cães apresentaram clinicamente aumento de volume do linfonodo regional após a primeira aplicação da toxina. Processo inflamatório, áreas de necrose e de hiperplasia dos folículos linfoides foram observadas ao exame histopatológico nos dias finais 07 ou 14 do tratamento.

Os parâmetros como: hematócrito (Ht), leucócitos totais (Leuco) e dosagens séricas de alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), ureia e creatinina (Creat) foram avaliados uma semana antes da aplicação da toxina reengenheirada e de 5 a 22 semanas após finalização do experimento, este último de forma aleatória (Tabela 5). Observou-se que os animais 1, 2 e 3 apresentaram leucocitose antes do início do tratamento, persistindo no cão 1 no período pós toxina de 5 semanas. A FA encontrou-se em níveis altos nos cães 2, 3, 4 e 5 antes e após a toxina, exceto no cão 4, que voltou a normalidade. O número de plaquetas dos animais 2 e 5 aumentaram e os níveis de ureia aumentaram nos cães 1 e 5, porém sem o acompanhamento do aumento da creatinina.

O marcador para proliferação celular Ki-67 (anticorpo monoclonal de camundongo Ki-67, clone MIB-1 Dako) foi utilizado, por imuno-histoquímica, nos fragmentos de biopsia pré e pós aplicação da toxina. Os animais 1, 2 e 3 apresentaram

Ki-67 elevado maior que 19 em marcações positivas (média em contagem de 5 campos em aumento de 400 vezes) nos fragmentos pré aplicação da toxina. Três animais apresentaram diminuição do Ki-67 após a aplicação da toxina, o animal 2, 3 e 4. Somente o animal 5 apresentou ki-67 maior após tratamento e o animal 1 com Ki-67 inalterado (Tabela 6).

O estudo imuno-histoquímico qualitativo para os anticorpos UPA, UPAR, MMP-2, TIMP-2 e MT1-MMP foi positivo para todas as amostras dos cinco cães. Somente o cão 1 apresentou ausência de marcação para MMP-2 nas amostras colhidas antes do tratamento intratumoral (Tabela 6)

As alterações histológicas pós tratamento com a toxina foram o processo inflamatório com predomínio de linfócitos nos melanomas dos cães 1, 2, 3 e 4 e de neutrófilos no cão 5 e as áreas de necrose em todos os melanomas. Os cães 1, 2 e 3 apresentaram heterogeneidade celular na avaliação de seus melanomas após o tratamento com a toxina e os tumores dos animais 2 e 3 não apresentaram melanina, como antes do tratamento (Tabela 7).

Tabela 3 - Características dos melanomas bucais malignos dos cães tratados com a toxina reengenheirada.

Cão	Tipo histológico ¹	Estadiamento ² I-IV	Volume tumoral inicial ³ (mm ³)	Maior diâmetro tumoral ⁴ (mm)	Localização
1	Melanoma amelanico epitelióide	III (T2bN1bM0)	18602	50,6	mandíbula esquerda
2	Melanoma melânico fusiforme	III (T2bN1bM0)	2509	36,5	maxila esquerda
3	Melanoma melânico de células balonosas	III (T2bN1bM0)	8875	35,4	maxila direita
4	Melanoma melânico desmoplásico	III (T2bN1bM0)	7613	37,5	pré maxila
5	Melanoma melânico fusiforme	I (T1aN0M0)	228,3	7,7	palato duro

1 Classificação segundo Spangler & Kass, 2006.
2011

2 Estadiamento segundo WHO

3 Volume =(comprimento x largura²) /2

4 Nguyen *et al* 2015

Quadro 6 - Classificação da resposta clínica segundo RECIST para tumores sólidos (Nguyen *et al.*, 2015).

Tipo de resposta	% de Redução tumoral
Resposta completa (RC)	100%
Resposta parcial (RP)	>30% e <100%
Doença estável (DE)	<30% ou <20% de aumento
Doença progressiva (DP)	>20% de aumento

Tabela 4 - Porcentagem de redução do maior diâmetro (mm) e do volume (mm³) nos dias 07 e 14, após o tratamento com a toxina reengenheirada nos 5 cães com melanoma bucal.

Cão	diâmetr o dia 0 (mm)	diâmetr o final (mm)	% de redução final	tipo de resposta clínica	volume dia 0 (mm ³)	volume final (mm ³)	% de redução final	tipo de resposta clínica
1	50,6	45	11	DE	18602	16402	12	DE
2	36,5	32,1	12	DE	2509	1341	47	RP
3	35,4	35,1	0,85	DE	8875	10754	+20	DE
4	37,5	32,3	14	DE	7613	2847	37	RP
5	7,7	6,7	13	DE	228,3	150,4	34	RP

Figura 20 - Variação do volume tumoral ao longo das aplicações da toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis*. Considerando-se o volume inicial e final de cada tumor, verificou-se que, os cães 1 e 3 apresentaram doença estável (DE) e os cães 2, 4 e 5 respostas parcial (RP).

Tabela 5 - Resultados dos exames laboratoriais uma semana antes da aplicação da toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* nos 5 cães com melanoma bucal.

Cão	Hematócrito (%)	Leucócitos (cels/ μ l)	ALT (U/L)	FA (U/L)	Ureia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	plaquetas (mil/ml)
1	46	19900*	43	29	43	1,0	366
2	50	34000*	31	248*	58*	0,7	569*
3	34*	29600*	99*	395*	64*	1,3	678*
4	43,7	13700	57	110	25	0,8	392
5	47	6300	56	131	43	1,2	438

* valores alterados nos cães antes do tratamento. Valores de Referencia Kirk & Bistner, 2013

Tabela 6 - Resultados dos exames laboratoriais de 5 a 22 semanas após aplicação da toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* nos 5 cães com melanoma bucal.

Cão	Hematócrito (%)	Leucócitos (cels/ μ l)	ALT (U/L)	FA (U/L)	Ureia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	Plaquetas (mil/ml)	Tempo (semanas após aplicação)
1	40	28400*	12	69	47*	0,8	285	5
2	43	12900	56	655*	34	0,9	407	9
3	25*	14100	264*	691*	94*	1,32	474*	14
4	41,8	6100	60,4	92	35,4	0,84	312	21
5	44	8690	52	138	155*	1,0	553*	22

* valores alterados nos cães após o tratamento. Valores de referencia Kirk & Bistner, 2013

Tabela 7 - Imunomacação de UPA, UPAR, MMP-2, MT1-MMP e TIMP-2 nas amostras teciduais dos 5 animais com melanoma bucal tratados com a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis*.

Cão	UPA	UPAR	MMP-2	MTI-MMP	TIMP-2
1	+	+	-	+	+
2	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+

(+) positivo, (-) negativo

Tabela 8 - Alterações histológicas e marcação para proliferação celular Ki-67 antes e após o tratamento com a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis*.

Cão	Ki-67 pré toxina	Ki-67 pós toxina	Tipo histológico	Exame histopatológico após o tratamento com a toxina reengenheirada
1	≥ 19	≥ 19	Melanoma amelanico tipo epitelióide.	Ausência de pigmento melânico Presença de infiltrado linfocítico em meio às células neoplásicas Heterogeneidade das células neoplásicas com ou sem pigmento melanina Presença de áreas de necrose Presença de corpúsculos apoptóticos e mitoses atípicas
2	≥ 19	12,2	Melanoma melânico do tipo células fusiformes.	Ausência de pigmento melanico Presença de infiltrado linfocítico Heterogeneidade das células neoplásicas Presença de áreas de necrose
3	≥ 19	7	Melanoma de células balonosas. Pouco melânico.	Ausência de pigmento melânico Presença de infiltrado linfocítico Presença de extensas áreas de necrose Presença de células vivas internamente às áreas de necrose Presença de alteração de vênulas (necrose)
4	8,2	4,6	Melanoma pouco melânico desmoplásico.	Presença de pouco pigmento melânico Altamente vascularizado, Presença de congestão Presença de áreas de necrose Presença de alteração na parede do vaso sanguíneo
5	3,6	16	Melanoma melânico de células fusiformes.	Presença de pigmento melânico Presença de infiltrado neutrofilico Presença de áreas de necrose Presença de alteração na parede do vaso sanguíneo

6.3.1 Cão número 1 (estadiamento III)

O cão 1, espécie canina, da raça Yorkshire terrier, macho, 11 anos de idade apresentou formação ulcerada, friável e hemorrágica em ramo horizontal de mandíbula esquerda (Figura 21A) com aumento de volume e consistência firme do linfonodo mandibular *ipsilateral* no momento do diagnóstico. No histórico, relatou-se hiporexia e 3 episódios eméticos há 1 dia pelo tutor e peso vivo de 5,4 kg. Nos exames laboratoriais, identificou-se um hematócrito de 46% e uma leucocitose de 19900 leucocitos/ μ l e sem mais alterações na função renal ou hepática.

Errata

- ✓ Desconsiderar a numeração das figuras a partir da figura 21.

- ✓ Considerar a partir do cão 1 (pagina 57), a seguinte sequência de apresentação das figuras:
 1. Fotos do cão
 2. Gráfico da evolução do tumor
 3. Imagens do Histopatológico
 4. Imagens da imuno-histoquímica
 5. Sequencia de A, B, C, D, E, F sempre da figura esquerda para direita,

As aplicações iniciaram-se após analgesia com cloridrato de tramadol (2mg/kg/intramuscular) e anestesia geral ambulatorial com propofol (5mg/kg) intravenoso. Nota-se que não houve variação do peso e o animal se manteve em bom estado geral ao longo do tratamento, alcançando o peso mínimo de 5,3kg. Observou-se diminuição do volume tumoral em 27% até o dia 07 do experimento (Figura 18), posterior aumento e diminuição, finalizando no dia 14 com 12% de redução tumoral total. O sangramento tumoral cessou no dia 02, porém houve o aparecimento de secreção purulenta e necrose nos dias 04 a 14 (Tabela 9, Figura 21B-G). Observou-se o aumento gradativo do tumor e reaparecimento de hemorragia após o dia 07 de tratamento (Figura 22) (Anexo E).

No dia 14 do experimento, a cirurgia de mandibulectomia unilateral e excisão do linfonodo foi realizada. O exame histopatológico pré tratamento com a toxina demonstrou infiltrado inflamatório misto intenso por polimorfonucleares e mononucleares, vasos, congestão e pontos de necrose (Figura 23 A-B). No pós-tratamento, observou-se ausência de pigmento melânico, presença de infiltrado linfocítico em meio às células neoplásicas, heterogeneidade das células neoplásicas, presença de áreas de necrose dissociadas e a presença de corpúsculos apoptóticos e mitoses atípicas (Figura 23 C-F). A avaliação do linfonodo regional demonstrou positividade para metástases.

Realizou-se o estudo das marcações imuno-histoquímicas para os anticorpos UPA, UPAR, MMP-2, TIMP-2 e MT1-MMP nas amostras colhidas antes do tratamento do cão 1. Todos apresentaram marcações positivas, exceto a protease MMP2 não foi evidenciada.

Fragmentos do melanoma, pré e pós tratamento com a toxina do *Bacillus anthracis*, foram analisados quantitativamente pela contagem do Ki-67 em cinco campos com aumento de 400x em microscopia. Observou-se marcação positiva para proliferação celular com o Ki-67 em ambas as amostras. O índice foi elevado e maior que 19 na contagem antes do tratamento e após a aplicação da toxina (Figura 24A-B).

As marcações imuno-histoquímicas foram positivas para UPA, UPAR, TIMP-2 e MT1-MMP nas células neoplásicas. Somente MMP-2 não foi evidenciada nessas amostras que antecederam o tratamento.

Cinco semanas após as aplicações, a leucocitose persistia e em maior número de 28400 leucócitos/ μ l, além da diminuição do hematócrito para 40%, mas dentro da normalidade. Nos demais exames de função hepática (alanina aminotransferase-ALT e fosfatase alcalina-FA) e renal (ureia e creatinina) nenhuma alteração foi identificada. A partir do dia 0, o animal manteve-se livre da doença por 58 dias, quando apresentou recidiva e metástase em linfonodo retrofaríngeo esquerdo, optando-se por eutanásia.

Tabela 9 - Resultados obtidos das mensurações do tumor, peso vivo do animal, sintomas locais e condição dos linfonodos mandibulares nos dias 0, 02, 04, 07, 09, 11 e 14 da aplicação da toxina modificada no cão numero 1.

Cão 1	Peso (kg)	Comprimento (mm)	Largura (mm)	volume (mm^3)	Sinais locais	Linfonodo mandibular ipsilateral
Dia 0	5,4	50,6	27,1	18601,6	hemorragia	aumento do tamanho e consistência
Dia 02	5,6	47,8	28,0	18664,6	sem hemorragia	aumento do tamanho e consistência
Dia 04	5,5	44,2	25,6	14498,1	secreção purulenta, tecido desvitalizado e odor fétido	aumento do tamanho e consistência
Dia 07	5,3	43,7	25,0	13654,7	tecido desvitalizado	aumento do tamanho e consistência
Dia 09	5,5	45,4	27,7	17368,3	tecido desvitalizado hemorragia discreta	aumento do tamanho e consistência
Dia 11	5,5	45,2	27,5	17032,9	tecido desvitalizado hemorragia discreta	aumento do tamanho e consistência
Dia 14 cirurgia	5,4	45,0	27,0	16402,5	tecido desvitalizado discreto, hemorragia discreta	aumento do tamanho e consistência

Figura 21 - Aspecto macroscópico do melanoma do cão 1, ao longo do tratamento intratumoral com a toxina reagenheirada do *Bacillus anthracis*. **A.** Formação ulcerada, friável e hemorrágica em ramo horizontal de mandíbula esquerda no dia 0. **B.** Diminuição da hemorragia no dia 02. **C.** Necrose e secreção purulenta nos **D.** Dias 04 e **E.** 07. **F.** Retorno do aumento de volume, presença de necrose e hemorragia discretas nos dias 09 e 11. **G.** Formação eritematosa e hemorragia discreta no dia 14 da cirurgia. (Fonte: Nishiya, AT)

Figura 22 - Variação do volume tumoral ao longo das 6 aplicações da toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* no cão 1. No final do tratamento houve redução de 12% do volume tumoral.

Figura 23 - Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 1. **A.** Melanoma melânico desmoplásico, cujas células arranjam-se em ninhos entremeados por tecido conjuntivo, constituído por matriz extracelular, células fusiformes e redondas e numerosos vasos sanguíneos. H&E, objetiva 1,25x. **B.** objetiva 5,6x. **C.** Após o tratamento com a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis*. observa-se a presença de linfócitos em meio às células neoplásicas em. Área de necrose de coagulação contígua à massa tumoral, com congestão e edema e hemorragia. Notas infiltrado inflamatório de mononucleares. H&E, objetiva 1,25x. **D.** Objetiva 5,6x.

Figura 24 - Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 1. **E.** Detalhe da área de necrose, mostrando fibrina, edema e hemorragia. H&E, objetiva 20x. **F.** Detalhe da massa tumoral, mostrando célula em mitose atípica (seta maior) e corpúsculo apoptótico (seta menor). H&E, objetiva 40x.

Figura 25 - Fotomicrografia da imuno-histoquímica em aumento de 400x evidenciando a marcação para o ki-67, **A.** antes ≥ 19 e **B.** após ≥ 19 o tratamento com a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* no animal 1.

6.3.2 Cão número 2 (estadiamento III)

O cão 2, espécie canina, raça Teckel, macho, 14 anos de idade apresentou formação enegrecida, friável e circunscrita em maxila esquerda (Figura 25A) e nenhum sinal sistêmico durante a avaliação do estado geral. Nos exames laboratoriais, leucocitose de 34000/ μ l e FA de 264 U/l foram observados. Nota-se que houve variação do peso do animal de 7,3 a 6,9 kg ao longo do tratamento. As aplicações da toxina reengenheiradas foram precedidas de analgesia e anestesia geral como no protocolo descrito. Houve diminuição do volume tumoral em 53% e 47% até o dia 07 e 14 do tratamento, respectivamente. A redução do volume tumoral de 2509 para

1177,5 mm³ ocorreu até do dia 0 ao 09 do tratamento, apresentando uma discreta progressão para 1340,8 no dia 14 (Tabela 10) (Figura 26).

A hemorragia cessou a partir do dia 02, assim como, houve o aparecimento de ulceração da mucosa jugal nos dias 02 e 04 (Figura 25B) e edema de face (Figura 25 C-D), aumento de linfonodo mandibular, apatia, febre de 39,3°C e perda de peso (7,3 para 6,9kg) após a primeira aplicação da toxina modificada. O animal foi tratado com anti-histamínico prometazina (0,2mg/kg) durante 5 dias e os sinais de edema e ulceração persistiram até o dia 09 do tratamento (Tabela 10) (Anexo F).

No dia 14, realizou-se o procedimento de paquimetria e maxilectomia parcial (Figura 21E-F) com excisão do linfonodo regional.

O linfonodo mandibular ipsilateral apresentou-se com consistência firme, porém de tamanho normal antes do início do tratamento. No dia 02, houve também o aumento expressivo do linfonodo regional, para aproximadamente 3,9cm de comprimento por 2,4cm de largura, seguido de 3,3cm por 2,7cm no dia 04; 3,7cm por 1,96cm no dia 07; 2,5cm por 1,4cm no dia 09; 2,7cm por 1,3cm no dia 11 e finalmente, 2,4cm por 0,9cm no dia 14 (Tabela 10).

O exame histopatológico pré tratamento com a toxina demonstrou áreas de necrose de coagulação, (Figura 27A-B). No pós-tratamento, observou-se heterogeneidade das células neoplásicas (Figura 27E), além das intensas áreas de necrose de coagulação. Presença de infiltrado linfocítico, áreas hemorrágicas, necrose de vênulas, células vivas internamente às áreas de necrose e heterogeneidade celular (Figura 27C-D). A avaliação do linfonodo regional demonstrou positividade para metástases.

O estudo das marcações imuno-histoquímicas realizadas qualitativamente para os anticorpos UPA, MMP-2, UPAR, TIMP-2 e MT1-MMP demonstraram positividade em todas as amostras colhidas deste cão antes do tratamento.

Os fragmentos da biopsia do melanoma, pré e pós tratamento com a toxina do *Bacillus anthracis*, foram analisados qualitativamente e quantitativamente pela contagem do Ki-67 em cinco campos com aumento de 400 vezes em microscopia. Observou-se marcação positiva para proliferação celular com o Ki-67 em ambas as amostras. O índice foi elevado e maior que 19 na contagem antes do tratamento e após a aplicação da toxina houve índice menor de 12,2 (Figura 28 A-B).

Nove semanas após as aplicações, a leucocitose não mais ocorria (12900 leucocitos/ μ l), identificou-se diminuição do hematócrito para 43%, porém dentro da normalidade e aumento da FA pra 655U/L. Nos demais exames de função hepática (ALT) e renal (ureia e creatinina) nenhuma alteração foi identificada. Atualmente, o animal encontra-se vivo em bom estado geral e livre da doença há 562 dias.

Figura 26 - A. Aspecto macroscópico do melanoma do cão 2, ao longo do tratamento intratumoral com a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis*. Formação enegrecida, friável e circunscrita em maxila esquerda no dia 0. B. Ulceração em mucosa jugal no dia 04 (B). C. Face normal e D. com edema no dia 07. E. Diminuição da hemorragia e do volume no dia 14 e F. maxilectomia parcial no dia 14. Fonte: Nishiya, AT

Tabela 10 - Resultados obtidos das mensurações do tumor, peso vivo do animal, sintomas locais apresentados e condição dos linfonodos mandibulares nos dias 0, 02, 04, 07, 09, 11 e 14 da aplicação da toxina modificada no cão numero 2.

Cão 2	Peso (kg)	Comprimento (mm)	Largura (mm)	volume (mm ³)	Sintomas locais/sistêmicos	Linfonodo mandibular ipsilateral
Dia 0	7,3	36,5	11,7	2509,0	hemorragia	consistência firme
Dia 02	6,9	31,6	12,6	2497,3	edema de face/ apatia, febre e perda de peso	umento do tamanho (3,9cmx2,4cm) e consistência firme
Dia 04	7,1	31,0	10,1	1573,8	edema de face, ulceração da mucosa jugal/ apatia	aumento do tamanho (3,3cmx2,7cm) e consistência firme
Dia 07	7,2	29,9	8,9	1187,2	Edema de face e ulceração da mucosa jugal	aumento do tamanho (3,7cmx1,9cm) e consistência firme
Dia 09	7,2	29,3	9,0	1177,5	-	aumento do tamanho (2,5cmx1,4cm) e consistência firme
Dia 11	7,0	29,6	9,3	1267,6	-	aumento do tamanho (2,7cmx1,3cm) e consistência firme
Dia 14 cirurgia	7,0	32,1	9,1	1340,8	-	normal 2,4cmx0,9cm e consistência firme

Figura 27 - Variação do volume tumoral ao longo das 6 aplicações da toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* no cão 2. No final do experimento houve uma redução de 47% do volume tumoral inicial.

Figura 28 - Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 2. **A.** Melanoma melânico, cujas células arranjam-se em ninhos entremeados por tecido conjuntivo antes do tratamento com a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis*. H&E, objetiva 1,25x. **B.** H&E, objetiva 5,6x. **C.** Presença de infiltrado linfocítico após o tratamento. H&E, objetiva 1,2x. **D.** Presença de infiltrado linfocítico após o tratamento. H&E, objetiva 5,6x.

Figura 29 - Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 2. **E.** Detalhe da área de necrose. H&E, objetiva 40x. **F.** Detalhe dos melanócitos neoplásicos organizados em ninhos. H&E, objetiva 40x.

Figura 30 - Fotomicrografia da imuno-histoquímica em aumento de 400x. **A.** marcação para o Ki-67, antes ≥ 19 . **B.** após 12,2 o tratamento com a toxina reengenheirada no animal 2.

6.3.3 Cão número 3 (estadiamento III)

O animal de número 3, espécie canina, sem raça definida, fêmea, 16 anos de idade apresentou o melanoma maligno na maxila direita de tamanho 35,4mm de comprimento por 22,4mm de largura, bastante ulcerado, friável, enegrecido e excessivamente hemorrágico (Figura 30A) no atendimento hospitalar. O linfonodo mandibular direito apresentava-se palpável com consistência firme, porém sem aumento de volume. O animal pesou 5,7kg variando até 5,5kg ao longo dos 7 dias do experimento. Nos exames laboratoriais as seguintes alterações foram observadas: hematócrito de 34%, leucocitose de 29600/ μ l, ALT de 99U/L, FA de 395 U/L e ureia de 64mg/dl foram alterações observadas.

As aplicações da toxina reengenheirada foram precedidas de analgesia e anestesia geral como no protocolo descrito anteriormente. Modificou-se o número de aplicações intratumorais de 6 para 3 aplicações em decorrência do crescimento tumoral observado nos cães 1 e 2 após o dia 07 do tratamento. Observou-se um aumento do linfonodo mandibular esquerdo nos dias 02 e 04 da aplicação. A hemorragia cessou (Figura 30B) e houve aumento do volume tumoral em 20% observado no dia 07 do tratamento (Figura 31), assim como os sinais sistêmicos de apatia e hiporexia no dia do procedimento de maxilectomia parcial (Tabela 11, Anexo G).

O exame histopatológico pré tratamento com a toxina demonstrou pouca melanina e vacuolização citoplasmática indicando um melanoma melânico de células

balonosas (Figura 32 A e B). No pós-tratamento, observou-se intensas áreas de necrose dos vasos, pouco pigmento melânico e altamente vascularizado. Presença de congestão e alteração na parede do vaso sanguíneo (Figura 33 A-B). A avaliação do linfonodo regional demonstrou positividade para metástases.

Todas as marcações imuno-histoquímicas realizadas para os anticorpos UPA, MMP2, UPAR, TIMP2 e MT1-MMP demonstraram positividade para o melanoma do cão 3.

O exame imunohistoquímico dos fragmentos da biopsia pré e pós tratamento com a toxina revelou marcação positiva para proliferação celular com o Ki-67. O índice foi elevado e maior que 19 (média da contagem de 5 campos em aumento de 400X nos fragmentos pré tratamento e após a aplicação da toxina houve índice menor de 7 (Figura 34 A-B).

Quatorze semanas após as aplicações, a leucocitose não mais ocorria (14100 leucocitos/ μ l), identificou-se diminuição do hematócrito para 25%, aumento da FA para 691U/L, além da ALT para 264U/L e ureia sérica para 99mg/dl. O animal manteve-se livre da doença por 114 dias a partir do dia 0, quando apresentou recidiva invadindo a cavidade nasal, metástase cutânea e também em linfonodo retrofaríngeo, optando-se por eutanásia.

Figura 31 - A. Aspecto macroscópico do melanoma do cão 3 em maxila direita. formação enegrecida, ulcerada, friável e excessivamente hemorrágica no dia 0. **B.** Formação enegrecida e pouco hemorrágica no dia 07 para remoção cirúrgica. Fonte: Nishiya, AT

Tabela 11 - Resultados obtidos das mensurações do tumor, peso vivo do animal, sintomas locais apresentados e condição dos linfonodos mandibulares nos dias 0, 02, 04 e 07 da aplicação do cão numero 3.

Cão 3	Peso (kg)	Comprimento (mm)	Largura (mm)	volume (mm ³)	Sintomas locais/sistêmicos	Linfonodo mandibular ipsilateral
Dia 0	5,7	35,4	22,4	8875,7	hemorragia	consistência firme
Dia 02	5,6	34,9	22,8	9071,2	hemorragia	aumento do tamanho e consistência firme
Dia 04	5,5	33,5	23,1	8924,6	hemorragia	aumento do tamanho e consistência firme
Dia 07 cirurgia	5,5	35,1	24,7	9043,3	apatia e hiporexia	consistência firme

Figura 32 - Variação do volume tumoral ao longo das aplicações da toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* no cão 3. Houve aumento em 20% do volume tumoral no final do experimento.

Figura 33 - Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 3. **A.** Melanoma melânico antes do tratamento. H&E, objetiva 1,25x. **B.** H&E, objetiva 5,6x. **C.** Presença de extensas áreas de necrose após o tratamento com a toxina. H&E, objetiva 1,25x. **D.** Presença de vênulas em necrose. H&E, objetiva 5,6x.

Figura 34 - Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 3. **A.** Melanoma melânico, cujas células arranjam-se em ninhos entremeados por tecido conjuntivo. Observar vasos sanguíneos apresentando necrose e infiltrado inflamatório após o tratamento com a toxina. H&E, objetiva 4x. **B.** Detalhe de vaso sanguíneo mostrando necrose, fibrina e trombo (seta). H&E, objetiva 40x

Figura 35 - Fotomicrografia da imuno-histoquímica em aumento de 400x. **A.** marcação para o Ki-67, antes ≥ 19 . **B.** Ki-67 após 7 o tratamento com a toxina reengenheirada no animal 3.

6.3.4 Cão número 4 (estadiamento III)

O animal numero 4 espécie canina, sem raça definida, macho 14 anos de idade apresentou formação ulcerada, enegrecida e discretamente hemorrágica, de aproximadamente 37,5 mm de comprimento e 35,9mm de largura, em região de pré-maxila (Figura 35A-B) com alteração de consistência dos linfonodos regionais. O animal pesou 33,3kg variando até 33kg ao longo dos 7 dias do experimento. Nos exames laboratoriais nenhuma alteração foi observada antes ou depois das 3 aplicações da toxina reengenheirada.

As aplicações da toxina modificada do *Bacillus anthracis* (figura 35C) foram precedidas de analgesia com cloridrato de tramadol e anestesia geral com propofol. Observou-se um aumento do linfonodo mandibular esquerdo nos dias 02 e 04 da aplicação. A hemorragia cessou (Figura 35D) e houve diminuição do volume tumoral em 19% no dia 07 do tratamento (Tabela 10 e Figura 36). Não houveram alterações no local da aplicação ou sistêmicas nesse cão de numero 4. A cirurgia de maxilectomia rostral foi realizada no dia 07 com a confecção de um retalho de mucosa labial (Anexo H).

O exame histopatológico pré tratamento com a toxina demonstrou um melanoma melânico desmoplásico apresentando agregados em ninhos de células melanocíticas com moderada granulação citoplasmática, anisocariose e necrose (Figura 37A-B). No pós-tratamento, intensas áreas de congestão, necrose e vascularização foram

observadas. Presença de pouco pigmento melânico e alteração na parede do vaso sanguíneo também foi evidenciada (Figura 38 A-B). A avaliação do linfonodo regional demonstrou positividade para metástases

O estudo qualitativo das marcações imuno-histoquímicas realizadas para os anticorpos UPA, MMP-2, UPAR, TIMP-2 e MT1-MMP apresentaram positividade nas amostras de melanoma colhidas do animal 4.

O exame imunohistoquímico das amostras da biopsia pré e pós tratamento com a toxina revelou marcação positiva para proliferação celular com o ki-67. O índice foi de 8,2 (média da contagem de 5 campos em aumento de 400 vezes em microscopia) nos fragmentos pré tratamento e após a aplicação da toxina houve índice de 4,6 (Figura 39A-B).

O animal manteve-se livre da doença por 288 dias a partir do dia 0 do tratamento, não apresentou metástases ou recidivas nesse período, porém houve a morte súbita de causa desconhecida do paciente.

Figura 36 - Aspecto macroscópico do melanoma do cão 4 em pré-maxila direita. **A.** Formação ulcerada, enegrecida e hemorrágica no dia 0. **B.** Formação sem hemorragia no dia 02. **C.** Aplicação intratumoral da toxina reengenheirada, **D.** Formação de dimensões menores e sem hemorragia no dia 07 da cirurgia. **E.** Remoção e confecção de retalho de mucosa labial para o defeito. Fonte: Nishiya, AT

Tabela 12 - Resultados obtidos das mensurações do tumor, peso vivo do animal, sintomas locais apresentados e condição dos linfonodos mandibulares nos dias 0, 02, 04 e 07 da aplicação da toxina modificada no cão numero 4 .

Cão 4	Peso (kg)	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Volume (mm ³)	Sintomas locais/sistêmicos	Linfonodo mandibular ipsilateral
Dia 0	33,3	37,5	35,9	24165,2	hemorragia discreta	consistência firme
Dia 02	33,0	34,5	36,4	22855,5	-	aumento do tamanho e consistência firme
Dia 04	33,0	34,0	34,7	20469,5	-	aumento do tamanho e consistência firme
Dia 07 cirurgia	33,0	32,3	34,8	19558,2	-	consistência firme

Figura 37 - Variação do volume tumoral ao longo das 3 aplicações da toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* no cão 4. No final do tratamento houve 37% de diminuição do volume tumoral inicial.

Figura 38 - Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 4. **A.** Melanoma melânico desmoplásico antes do tratamento. H&E, objetiva 1,25x. **B.** H&E, objetiva 5,6x. **C.** Após o tratamento com a toxina, presença de intensa vascularização, congestão e necrose. H&E, objetiva 1,25x. **D.** H&E, objetiva 5,6x.

Figura 39 - Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 4. **A.** Detalhe da área de necrose, mostrando edema e hemorragia. H&E, objetiva 20x. **B.** Detalhe de vaso sanguíneo mostrando congestão, infiltrado inflamatório de polimorfonucleares e edema. H&E, objetiva 40x.

Figura 40 - Fotomicrografia da imuno-histoquímica em aumento de 400x. **A.** marcação para o Ki-67, antes 8,2. **B.** marcação Ki-67 de 4,6 depois do tratamento no animal 4.

6.3.5 Cão número 5 (estadiamento I)

Cão número 5, espécie canina, da raça Lhasa apso, macho, 12 anos de idade apresentou formação enegrecida, plana e circular de 7,74 mm de diâmetro em região de palato duro esquerdo (Figura 40 A-B). O linfonodo mandibular *ipsilateral* no momento do diagnóstico não apresentava nenhuma alteração de volume ou consistência. O animal pesou 5kg no dia 0; 4,9kg no dia 02; 4,8kg no dia 04 e 5,4kg no dia 07.

Nos exames laboratoriais, a única alteração observada pré aplicação da toxina foi FA de 131U/L, persistindo ainda discretamente aumentada (138U/L) e também o aumento da ureia para 155mg/dl 22 semanas depois do tratamento.

As aplicações de 1ml, excepcionalmente neste animal, iniciaram-se após analgesia com cloridrato de tramadol 2mg/kg/intramuscular) e anestesia geral ambulatorial com propofol (5mg/kg) intravenoso (Figura 40 C). Nota-se que o animal se manteve em bom estado geral ao longo do tratamento, apresentando somente no dia 04, apatia, febre e aumento e consistência firme do linfonodo mandibular esquerdo (Tabela 13). Observou-se diminuição do volume tumoral em 35% até o dia 07 do experimento, sendo o menor volume no dia 04 (Figura 41). A cirurgia de excisão tumoral por eletrocautério (Figura 40 D) foi seguida da confecção de um enxerto de mucosa palatina, que após 17 dias desenvolveu uma fistula oro-nasal (Figura 40 E) (Anexo I).

O exame histopatológico pré tratamento com a toxina identificou o melanoma melânico fusiforme bem diferenciado apresentando população melanocítica densamente pigmentada com crescimento expansivo (Figura 42 A-B). No pós tratamento, observaram-se presença de células inflamatórias, principalmente polimorfonucleares neutrófilos, alteração na parede do vaso sanguíneo e necrose (Figura 43 A-B). A avaliação do linfonodo regional demonstrou negatividade para metástases.

Todos os anticorpos: UPA, MMP2, UPAR, TIMP2 e MT1-MMP marcaram positivamente as amostras do melanoma oral do cão 5. O exame imuno-histoquímico dos fragmentos da biopsia pré e pós tratamento com a toxina revelou marcação positiva para proliferação celular com o ki-67. O índice foi de 3,6 (média da contagem de 5 campos em aumento de 400 vezes em microscopia) nos fragmentos pré tratamento (Figura 44A) e após a aplicação da toxina houve um aumento do índice para 16 (Figura 44 B).

O animal mantém-se livre da doença e em bom estado geral há 366 dias a partir do dia 0 do tratamento e não apresentou metástases ou recidivas nesse período.

Figura 41 - Aspecto macroscópico do melanoma do cão 5 em maxila na região de mucosa de palato duro. **A.** Formação plana de coloração negra e bordos róseos, discretamente ulcerada no dia 0. **B.** Formação plana de coloração negra e bordos róseos sem ulceração no dia 07. **C.** Aplicação intratumoral da toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis*. **D.** Cirurgia de remoção do melanoma e enxerto. **E** Formação de fistula oro-nasal 17 dias após a cirurgia. Fonte: Nishiya, AT.

Tabela 13 - Resultados obtidos das mensurações do tumor, peso vivo do animal, sintomas locais apresentados e condição dos linfonodos mandibulares nos dias 0, 02, 04 e 07 da aplicação do cão número 5.

Cão 5	Peso (kg)	Diametro (mm)	Volume (mm ³)	Sintomas locais/sistemicos	Linfonodo mandibular
Dia 0	5,0	7,7	231,8	-	normal
Dia 02	4,9	7,4	199,3	-	normal
Dia 04	4,8	6,7	151,1	febre, apatia	aumento do tamanho e consistência firme
Dia 07 cirurgia	5,4	6,7	151,1	-	aumento do tamanho e consistência firme

Figura 42 - Variação do volume tumoral ao longo das 3 aplicações da toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* no cão 5. No final do tratamento, o tumor diminuiu em 34% do seu volume inicial.

Figura 43 - Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 5. **A.** Melanoma melânico antes do tratamento com a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis*. H&E, objetiva 1,25x. **B.** células arranjam-se em ninhos entremeados por tecido conjuntivo. Nota-se necrose superficial. H&E, objetiva 5,6x. **C.** Outra área de necrose superficial. H&E, objetiva 1,25x. **D.** Detalhe da área de necrose de coagulação. H&E, objetiva 5,6x.

Figura 44 - Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 5. **A.** Necrose e alteração do vaso sanguíneo próximo a área de necrose. H&E, objetiva 4x. **B.** Outra área de necrose superficial. H&E, objetiva 4x.

Figura 45 - Fotomicrografia da imuno-histoquímica em aumento de 400x, A. marcação para o Ki-67, antes 3,6. B. Ki-67 no valor de 16 depois do tratamento no animal 5.

7 DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

Os estudos da toxina do *Bacillus anthracis* iniciaram-se a partir de 1955 pela evidência de uma alta letalidade em camundongos e porquinhos da índia. Logo em seguida isolaram-se as três partes constituintes da toxina, PA, LF e EF, que separadamente eram biologicamente inativas, porém quando combinadas em PA e LF ou PA e EF causavam morte rápida em camundongos e edema de pele em coelhos ou porquinhos da índia, respectivamente (Leppla, 1982; Ezzel *et al.*, 1984).

A síntese em laboratório da toxina do *Bacillus anthracis* em 1962 e o conhecimento do seu mecanismo de citotoxicidade favoreceram o estudo *in vitro* da toxina em várias linhagens celulares. (Ezzell *et al.*, 1984; Liu; Leppla, 2003; Liu *et al.*, 2008).

A formação de um “poro” na membrana celular ocorre pela ligação da PA aos receptores fisiológicos (TEM8 e/ou CMG2) presentes na membrana celular, que então, é clivada pelas proteases ali existentes, chamadas furinas (Ezzell *et al.*, 1984; Liu; Leppla, 2003; Liu *et al.*, 2013).

O poro, então, formado por um heptâmero da PA clivada (PA63) permite a entrada da LF nativa, EF nativa ou FP reengenheirada para o meio intracelular, causando bloqueio de proteínas participantes da via de sinalização MAPK, aumentando os níveis de AMPc intracelular ou inibindo a síntese proteica, respectivamente, causando a morte celular (Duesbery *et al.*, 1998; Moayeri *et al.*, 2007).

A evidência de metaloproteinases e uroquinases principalmente nas células neoplásicas (Kurscha *et al.*, 1999; Lida *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2012; Dufy *et al.*, 2004), levou a possibilidade de reengenheirar PAs específicas da toxina do *B anthracis* para serem ativadas por essas duas proteases UPA e MMP. E por volta dos anos 2000, Liu e colaboradores, sintetizaram a PAL1 e PAU2 modificando os sítios de ação das furinas, especificamente, para serem clivadas pela MMP e UPA, respectivamente, presentes na membrana celular (Liu *et al.*, 2000, 2003, 2005).

A ação da toxina modificada do *Bacillus anthracis* tornou-se seletiva àquelas células que expressariam ambas as proteases em sua membrana celular. Dessa

maneira, testes de citotoxicidade por MTT e tratamentos em camundongos xenotransplantados já foram estudados em linhagens humanas de carcinomas de cabeça, pescoço, de melanomas e carcinomas pulmonares, uterinos e intestinais (Schafer *et al.*, 2011; Abi-Habibi *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2005). Tumores murinos como os fibrossarcomas, carcinomas de Lewis e melanomas responderam ao tratamento *in vivo* com a toxina (Rono *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008).

A evidencia da ação antineoplásica da toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* impulsionou-nos a iniciar os testes em melanomas bucais caninos, a partir de linhagens celulares, amostras parafinadas de melanoma e cães com a doença espontânea.

No cultivo celular, a citotoxicidade significativa da associação PA nativa e FP ou “*fusion protein*”, demonstrada por MTT, em 4 linhagens celulares de melanoma bucal canino (GMGD2, GMGD5, THEO e TLM1), confirmaram a presença de receptores TEM8 e CMG2 para a toxina do *Bacillus anthracis*. A única exceção foi a linhagem YAN, que apesar de apresentar citotoxicidade, não alcançou a IC50 (>5000ng/ml) e assim, considerada resistente quando comparada as demais células com IC50 variando de 1,73-3ng/ml. As presenças desses receptores proporcionam a formação do “poro” na membrana celular juntamente com a PA nativa, permitindo a entrada de FP para o citosol. A FP, por sua vez, que é uma parte da LF fusionada à exotoxina A da *Pseudomonas*, é bastante tóxica para todos os tipos celulares, agindo sobre os ribossomos e retículo endoplasmático, inibindo a síntese proteica. Assim, a integridade da membrana celular é ameaçada e a citotoxicidade é alta na maioria das células tumorais murinas e humanas estudadas, como observado nas células do melanoma bucal canino (Arora *et al.*, 1992; Arora; Leppla, 1994; Liu *et al.*, 2009; Schafer *et al.*, 2011).

A maioria das linhagens estabelecidas humanas estudadas por Liu *et al.* (2001, 2005), Rono *et al.* (2006), Su *et al.* (2007) e Schafer *et al.* (2011) também foram sensíveis a FP como no nosso estudo.

Os ensaios *in vitro* com a FP, fizeram e, até hoje, fazem parte dos estudos de sensibilidade de diferentes tipos tumorais à toxina, de afinidade da toxina aos receptores e da ação de novas variantes reengenheiradas das PAs, juntamente às

técnicas de “*Western blot*”, RT-PCR, xenotransplantes e ensaios *in vivo* (Liu *et al.*, 2000, 2001, 2005, 2017; Su *et al.*, 2007).

As mesmas cinco linhagens de melanoma oral canino foram também submetidas à associação da toxina reengenheirada dependente de UPA e MMP (PAU2 e PAL1) juntamente com a FP.

As linhagens GMGD2, GMGD5, THEO e TLM1 apresentaram toxicidade significativa e IC50 variando entre 2,34 a 7,92ng/ml, semelhante ao do controle positivo da HT29 (3ng/ml). A linhagem YAN não foi sensível a esta associação, já que apresentou citotoxicidade apenas nas concentrações mais altas da PAL1 e PAU2 e não alcançou uma concentração para inibir 50% das células.

Todas as linhagens de melanoma bucal canino apresentaram CMG2, TEM8, UPA e MMP importantes para a ação da toxina reengenheirada, exceto a linhagem YAN que se mostrou resistente neste estudo.

A expressão desses receptores ocorre fisiologicamente na membrana celular de vários tecidos, possuem um domínio extracelular para o fator de von Willebrand, uma região transmembrana e uma “cauda” no citosol. Segundo Liu, Crown *et al* (2009) o receptor CMG2 apresenta 11 vezes mais afinidade à toxina que o TEM8, além disso, os camundongos com os genes deletados para esses dois receptores desenvolveram-se normalmente e são resistentes à infecção pelo *B anthracis*. Segundo Reeves *et al.* (2010), os CMG2 são principalmente expressos pelas células endoteliais da pele, do cólon, do pulmão e dos tumores de mama, e sua função ainda não é muito bem esclarecida, mas está relacionada a duas doenças humanas raras recessivas chamadas fibromatose hialina juvenil e hialinose sistêmica infantil.

A linhagem primaria YAN demonstrou resistencia à toxina reengenheirada e não expressão dos receptores, da UPA e da MMP, mas se transplantado em camundongos, haveria a possibilidade da resposta positiva ao mesmo tratamento, pela ação tóxica sobre as células endoteliais nesses modelos *in vivo*, como observado por Schafer *et al* (2011) nas células de carcinoma HEP2.

Esses elementos foram importantes para prosseguir a análise do melanoma, sob ação da associação com LF, que faz parte do alvo terapêutico deste estudo.

Os mesmos cinco tipos celulares de melanoma canino foram, então, submetidos *in vitro* à LF, que se utiliza dos mesmos mecanismos para a internalização de FP.

Embora as linhagens GMGD2, GMGD5, THEO e TLM1 tenham confirmado a presença de receptores para a toxina do *B anthracis*, UPA e MMP, somente a linhagem GMGD2 apresentou citotoxicidade à LF. A GMGD2 quando submetida à LF apresentou IC50 de 12,93 e 4964,1ng/ml, respectivamente para associação com PA e PAL1 e PAU2. A HT29RJ (controle positivo) alcançou IC50 de 4,39 e 179,4ng/ml, para as mesmas associações. As demais linhagens não alcançaram a concentração para inibir 50% das células e foram consideradas resistentes a todas as associações com LF.

O mecanismo da ação da LF no citosol consiste em inibir as proteínas quinases da via de sinalização MAPK, causando a morte celular principalmente em tumores sólidos como o adenocarcinoma de colon, os melanomas humanos ou os tumores com mutação do BRAF V600E (Liu *et al.*, 2008). Segundo revisão de Simpson *et al.* (2014), a mutação do exon 15 do BRAF não foi encontrada em cães, que também é raro no melanoma de mucosa humano. Já aproximadamente 50% dos melanomas cutâneos humanos tem mutação do do BRAF V600E (Ascierto *et al.*, 2012), importante para a síntese de proteínas cinases que participariam do crescimento, proliferação, diferenciação e apoptose celular (Mochizuki *et al.*, 2015). As linhagens de melanoma bucal canino que não sofreram citotoxicidade com a LF, podem não apresentar a mutação do BRAF e, conseqüentemente serem resistentes a inibição dessa via.

Nos carcinomas de cabeça e pescoço por Schafer *et al.*, 2011, a maioria das linhagens celulares foram sensíveis à associação de PA nativa ou PAL1 e PAU2 com FP, porém todas resistentes às combinações com LF quando *in vitro*, semelhante ao apresentado no nosso estudo. Porém as linhagens de carcinomas resistentes, quando xenotransplantadas em camundongos e tratadas com a toxina reengenheirada LF, PAL1 e PAU2 apresentaram redução de volume tumoral de 94%, quando comparado ao grupo sem tratamento. Os resultados *in vitro*, podem diferir e serem inferiores aos do *in vivo*, pelo alvo da toxina serem as células endoteliais e, não somente as células neoplásicas (Liu *et al.*, 2016), o que pode ter ocorrido em nosso estudo *in vitro*. Dessa forma, a continuidade dos estudos *in vivo* seria importante aos melanomas bucais caninos, assim como o estudo da mutação do BRAF e da via de sinalização MAPK, ambas envolvidas no mecanismo de citotoxicidade da LF.

Sabendo-se da importância da UPA e MMP para a ação tóxica da toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* contra as células tumorais, buscamos a partir do estudo populacional de 30 amostras de melanoma bucal canino, verificar a expressão *in situ* dessas proteases em blocos parafinados do tumor.

Verificou-se que 76,6% das amostras expressavam concomitantemente todas as proteases, uroquinases (UPA e UPAR) e metaloproteinases (MMP-2, MT1-MMP e TIMP-2).

Ainda em nosso estudo, a MMP-2 teve imunomarcção positiva em 93,3% dos melanomas bucais, a MT1-MMP em 100% e a TIMP-2 em 86,3% dos casos, resultados semelhantes aos observados por Nakaichi *et al.* (2007) em que 100% dos melanomas bucais caninos expressavam a MMP-2 e, por Do Campo *et al.* (2011) em 92,8% dos casos. Existe a expressão de RNAm de MMP-2, TIMP-2 e MT1-MMP nos melanomas caninos, porém sem diferença significativa quando comparados ao tecido normal da cavidade bucal do cão (Nakaichi *et al.*, 2007).

A expressão da UPA e UPAR foi observada em 83,3% dos melanomas bucais em nosso estudo, porém ainda não há relatos sobre a expressão da UPA em melanomas caninos na literatura. Nos tecidos prostáticos dos cães, a frequência e intensidade das marcações para UPAR nas células epiteliais é significativamente maior nas lesões neoplásicas e displásicas da próstata, que nos tecidos normais (Faleiro *et al.*, 2013a). Segundo Santos *et al.* (2011), nos tecidos neoplásicos mamários de cães, 87,4% das neoplasias malignas apresentaram marcação positiva para UPA, e esta em mais de 10% das células neoplásicas do tumor. As células estromais da glândula mamária também apresentaram imunomarcção em 72,6% das amostras.

Nas células endoteliais dos hemangiossarcomas em humanos, a marcação positiva para UPAR ocorreu em 100% das células e da UPA em 73,2 a 75% das amostras, já os hemangiomas apresentaram positividade para UPA somente em 3,8% dos casos e para UPAR em 30,7% (Anwar *et al.*, 2015).

A presença dessas proteases na maioria das células neoplásicas malignas e também no melanoma canino, nos impulsionou a iniciar o tratamento com a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis*, ativada por UPA e MMP, em cães portadores do melanoma bucal. É necessário evidenciar, que utilizamos somente a associação da LF com as PAs reengenheiradas (PAL1 e PAU2), por via intratumoral, no estudo com

os cães, devido a maior toxicidade apresentada pelos camundongos, quando do tratamento com a FP, por via intraperitoneal ou sistêmica (Liu *et al.*, 2003; Arora; Leppla, 1993; Liu *et al.*, 2013; Peters *et al.*, 2014).

A terapia de alvo molecular com a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* ainda não foi descrita em melanomas espontâneos caninos, e todos os cinco cães avaliados neste estudo apresentaram resposta clínica considerada como doença estável, segundo o “*Recist*” (Nguyen *et al.*, 2015).

Quando o volume inicial e final foram calculados, baseados na fórmula, “volume (mm³) = 1/2(length in mm × width in mm²)” (Liu *et al.*, 2000, 2016), houve redução tumoral entre 12 a 47% em 4 cães e somente um único cão (numero 3) com aumento de 20% do tumor, sendo o próprio animal o seu controle.

Isso significa que que nossos 4 cães apresentaram, ao fim do tratamento, 88 a 53% de volume tumoral residual, resposta pouco expressiva se comparado aos camundongos xenotransplantados com carcinoma de células escamosas humano, que apresentaram tumores de 0,6 a 26% do tamanho tumoral do grupo controle, após o tratamento com a mesma combinação da toxina (Schafer *et al.*, 2011). Peters *et al* (2014), também verificaram que os melanomas B16-BL6 transplantados em camundongos apresentaram tumores com 32% a 87% de redução, este último com o uso de 4 aplicações de PAL1, PAU2 e LF. A dose máxima tolerada da combinação PAL1, PAU2 e LF foi superior a dos tratamentos isolados com PAL1 e LF ou PAU2 e LF, caracterizando a combinação com o melhor índice terapêutico.

Poucos testes *in vivo* foram realizados com a associação concomitante das duas variantes da PA reengenheiradas, PAL1 e PAU2, com a LF. A maioria dos estudos realizados por Liu e colaboradores associava a FP em seus protocolos *in vitro* e *in vivo* com excelentes resultados, porém com maior citotoxicidade (Peters *et al.*, 2014).

Alguns fatores poderiam ter contribuído para a discreta redução alcançada pelos melanomas bucais caninos. O modo de ação da toxina do *Bacillus anthracis*, a distribuição da toxina no tecido tumoral e a resposta imunológica provocada por ela.

O efeito citotóxico e consequente redução do volume tumoral poderia ocorrer pela ação direta da toxina nas células neoplásicas e/ou também por meio da ação indireta nas células endoteliais dos vasos sanguíneos (Liu *et al.*, 2000, 2003, 2005, 2013, 2016). O cenário ideal, para que os tumores apresentassem respostas completas

ou parciais de redução, seria que os dois modos de ação da toxina pudessem ocorrer e se somar (Liu *et al.*, 2013).

Os melanomas bucais caninos descritos na literatura não apresentam mutação do BRAF (Mochizuki *et al.*, 2015) e essa mutação foi relacionada à sensibilidade à toxina do *B anthracis* (Liu *et al.*, 2008). Segundo Duesbery *et al.* (1998), a LF, quando atinge o citosol, inativa, por proteólise, as quinases da via MAPK e assim, ocorre a morte das células que dependem dessa via de sinalização, principalmente àquelas que possuem a mutação do BRAFVE600. Os melanomas cutâneos humanos apresentam até 60% de mutação do BRAF e são extremamente sensíveis *in vitro* e *in vivo* à ação da LF, segundo estudo realizado por Abi-Habibi (2006). Alguns tipos celulares, em minoria, são sensíveis a LF, sem a presença da mutação do BRAF como por exemplo as células de carcinoma de colo retal (Liu *et al.*, 2008). Mais estudos sobre a frequência da mutação do BRAF seriam de grande importância para esclarecer, se a provável falta de sensibilidade das células neoplásicas à LF apresentada, está, ou não, relacionada com a ausência desse tipo de mutação nos melanomas caninos.

Em estudos realizados em 2016, Liu e colaboradores observaram que, as células endoteliais dos tumores sólidos são os principais alvos da toxina do *B anthracis* e poderiam contribuir com grande parte da resposta ao tratamento. Os receptores CMG2 fisiológicos para a toxina do *B anthracis* expressos pelas células endoteliais dos vasos são os principais a sofrer a ação tóxica da LF, e não as células neoplásicas ou estromais (fibroblastos e células inflamatórias) do tumor (Liu *et al.*, 2009, 2013). Neste estudo também, camundongos com deleção do gene para CMG2 foram insensíveis à toxina e àqueles com expressão somente de CMG2SM exclusiva da musculatura lisa dos vasos, apresentaram expressiva resposta à toxina nos melanomas B16BL6 transplantados. A inibição da via MAPK pela LF nas células endoteliais não promove a apoptose imediatamente, mas inibe a proliferação dessas células, observadas pela citometria de fluxo com a marcação para anexina V e por meio da marcação com Ki-67, respectivamente, dentro das 72 horas observadas neste estudo (Liu *et al.*, 2016).

A diminuição da proliferação das células endoteliais devido à ação da toxina, reduz a angiogênese do tumor, supomos, então que possa ocorrer uma hipóxia tecidual favorecendo a necrose. Essas alterações vasculares explicam a presença de áreas de necrose, de hemorragia, de um infiltrado inflamatório de polimorfonucleares e de

alterações na estrutura da parede dos vasos, observados na análise histopatológica dos melanomas bucais. Dessa mesma forma, justifica-se o menor ou igual índice de proliferação (Ki-67) avaliado na maioria dos nossos melanomas após o tratamento. Clinicamente, a presença de tecido desvitalizado e hemorragia em menor intensidade de todos os melanomas bucais após a primeira aplicação da toxina, poderiam sugerir a diminuição da angiogênese tumoral provocada pela toxina. Os estudos de Schafer *et al.* (2011), Peters *et al.* (2014) e Liu *et al.* (2016) também demonstraram áreas de necrose, diminuição da vascularização avaliada pelo CD 31 e da proliferação celular por meio do Ki-67, além da observação do aumento da apoptose pela técnica do TUNEL nos tumores submetidos ao tratamento com a toxina.

Outro fator provável devido à menor resposta de redução tumoral apresentada pelos melanomas dos cães, pode ser atribuída ao estímulo provocado pela toxina do *B. anthracis* ao sistema imunológico do cão. Edema facial e congestão das mucosas no animal 2 do nosso estudo, além do aumento dos linfonodos locais de todos os cães a partir do dia 02 do tratamento, poderiam ser também um indicativo de que o sistema imunológico do animal foi acionado em resposta à primeira aplicação da toxina.

Essa proteína bacteriana desperta a produção de anticorpos monoclonais ao longo do tratamento, que neutralizariam a toxina e diminuiriam sua ação antitumoral. Em estudo realizado por Brossier *et al.* (2004), tanto *in vivo* quanto *in vitro* houve uma menor citotoxicidade, quando houve a utilização de anticorpos, juntamente à toxina, em macrófagos em cultivo, assim como diminuiu a letalidade em camundongos infectados com a toxina do *B anthracis*.

Outro estudo realizado por Liu *et al.* (2016), utilizou pentostatina e ciclofosfamida associados ao tratamento com a PAL1, PAU2 e LF em camundongos com carcinoma metastático. A resposta antitumoral foi igual ao grupo tratado sem os dois imunossupressores, mas conferiu efeito antitumoral prolongado, bloqueando a produção de anticorpos neutralizantes.

Provavelmente, nos cães com melanoma, o sistema imunológico foi acionado, mas não interferiu na resposta de redução tumoral apresentada. Porém o tempo de duração do efeito antitumoral alcançado nesses animais, considerados com a doença estável, diminuiu. Isso foi observado com um discreto aumento do volume tumoral, a partir do dia 07 até o 14 do tratamento, nos 2 primeiros cães tratados, e o que nos

moveu a diminuir o número de aplicações de 6 para 3 nos demais cães a serem tratados. Segundo Liu *et al.* (2016), a produção de anticorpos monoclonais neutralizantes ocorreu 10 dias depois da primeira aplicação da toxina, nos camundongos não tratados com os imunossupressores, podendo sugerir o aumento dos melanomas bucais nos cães a partir do dia 07, pelo início da ação dos anticorpos neutralizantes produzidos também nesta espécie.

A via sistêmica intravenosa ou intraperitoneal, utilizada nos estudos da toxina do *B anthracis* nos camundongos, quando comparada à intratumoral, pode ser outro fator que contribuiu para a menor resposta alcançada em nossos pacientes. A via parenteral sistêmica permite a distribuição da toxina por todo o tecido tumoral alcançando, principalmente, as células endoteliais dos capilares, vênulas e arteríolas do tumor e seus importantes receptores CMG2 para toxina do *B anthracis*. A administração por via intratumoral⁴, por sua vez, tem distribuição irregular por difusão passiva ou facilitada, gerando a possibilidade da toxina não alcançar as células do endotélio tumoral, principal local de ação da toxina.

A suspeita da ausência da mutação do BRAF e a consequente falta de efeito citotóxico direto nas células do melanoma, aliada à provável má distribuição da toxina pelo tecido tumoral, adicionada à resposta imunológica do cão, a partir da produção de anticorpos neutralizantes, são fatores que podem ter interferido na menor resposta dos melanomas bucais ao tratamento com a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis*.

⁴ Robbins Patologia Básica, 2013.

8 CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

Todas as linhagens de melanoma canino estudadas apresentam receptores para a toxina do *Bacillus anthracis*, uroquinases e metaloproteinases, porém somente uma linhagem demonstrou sensibilidade à toxina reengenheirada.

A maioria dos melanomas bucais dos cães expressam uroquinases e metaloproteinases observadas por imuno-histoquímica nos 30 casos retrospectivos estudados.

Todos os melanomas demonstraram doença estável, quando tratados com a toxina reengenheirada. Não houve efeitos sistêmicos importantes nesses cães, somente reação alérgica local em um animal e resposta inflamatória dos linfonodos locais em todos os cães.

Conclui-se que, existe potencial terapêutico da toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* para o tratamento dos melanomas bucais caninos pela expressão de receptores para a toxina do *Bacillus anthracis*, das uroquinases e também das metaloproteinases, aliada à ausência de efeitos sistêmicos graves.

9 ANEXOS

9.1 Anexo A - Parecer do Comitê de Ética no uso de animais – Faculdade Medicina da Universidade de São Paulo.

Ampliar documento

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 17/07/2014, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **052/14** intitulado: **“Administração sistêmica de uma toxina engenheirada ativada por uroquinase (UPA) e metaloproteinase (MMP) para o tratamento de melanoma oral canino: estudo piloto”** que utilizará **18** animais da espécie (**9 camundongos e 9 cães**), apresentado pelo Departamento de Radiologia e Oncologia.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Maria Lúcia Zaidan Dagli

Pesquisador (a) Executante: Adriana Tomoko Nishiya

CEUA-FMUSP, 17 de Julho de 2014.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

9.2 Anexo B - Parecer do Comitê de Ética no uso de animais – Faculdade Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo.

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 14 de maio de 2014
CEUA N 8798100314

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a): Maria Lucia Zaidan Dagli
Executante: Adriana Tomoko Nishiya
Depto/Disc: Departamento De Patologia
Maria Lucia Zaidan Dagli (orientador)

[Ampliar documento](#)

Título do projeto: "ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE UMA TOXINA ENGENHEIRADA ATIVADA POR UROKINASE (UPA) E METALOPROTEINASE (MMP) PARA O TRATAMENTO DE MELANOMA ORAL CANINO: ESTUDO PILOTO".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

As uroquinasas (uPA) e metaloproteinases (MMPs) são proteases superexpressas em uma variedade de células tumorais e raramente estão presentes em células fisiologicamente normais. A toxina do *Bacillus anthracis* modificada engenheirada é ativada por uPA e MMPs da superfície da célula demonstrando citotoxicidade para uma série de linhagens tumorais malignas humanas (neoplasias pulmonares, pancreáticas, mamárias e melanomas). Três grupos de 3 cães serão avaliados pela qualidade de vida através de um questionário sobre eventos adversos como perda de peso, perda de apetite, diarreia, vômitos e fraqueza nos dias 0, 7 e 14.

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 07/05/2014, **ANALISOU** e **APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

9.3 Anexo C - Parecer do Comitê de Ética no uso de animais – Faculdade Medicina Veterinária da Universidade Anhembi Morumbi.

Uma universidade
de fronteiras
e mentes abertas.

CÂMPUS CENTRO (MOOCA)
R. Dr. Almeida Lima, 1.134
CÂMPUS MORUMBI
Av. Roque Petroni Jr., 630
CÂMPUS PAULISTA 1
Av. Paulista, 2.000

CÂMPUS PAULISTA 2
R. Treze de Maio, 1.266
CÂMPUS VALE DO ANHANGABAÚ
R. Líbero Baduró, 487
CÂMPUS VILA OLÍMPIA
R. Casa do Ator, 275

4007-1192
(Regiões Metropolitanas)
0800 015 9020
(Demais Localidades)
www.anhembi.br

São Paulo, 27 de Junho de 2014

CEUA N 00720141

PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS - CEUA

A Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade Anhembi Morumbi, em sua Reunião realizada no dia **26/06/2014**, analisou a pesquisa intitulada *“Administração sistêmica da toxina do Bacillus anthracis reengenheirada ativada pela urokinase (upa) e metaloproteinases (mmps) para o tratamento do melanoma oral canino: estudo piloto dos (as) pesquisadores (as) Adriana Tomoko Nishiya sob responsabilidade do (a) Prof.(a) Dra Maria Lucia Zaidan Dagli do Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e do Departamento de Oncologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo emitindo o seguinte parecer:*

☒ **Aprovado**

☐ Com pendência

☐ Reprovado

Laureate International Universities®

Carlos Jorge Rocha Oliveira

Coordenador da Comissão de Ética para Uso de Animais - CEUA

Secretaria da Comissão de Ética para Uso

9.4 Anexo D – Termo de consentimento livre e esclarecido TCLE.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa/Aula: **ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE UMA TOXINA ENGENHEIRADA ATIVADA POR UPA E MMP PARA O TRATAMENTO DE MELANOMA ORAL CANINO: ESTUDO PILOTO**

Nome do (a) Pesquisador (a) Responsável/Professor (a) Responsável: **ADRIANA TOMOKO NISHIYA**

Nome dos demais participantes da equipe: **PROFA MARIA LUCIA ZAIDAN DAGLI**

1. NATUREZA DA PESQUISA/AULA: Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa avaliar o potencial terapêutico da toxina modificada do *Bacillus anthracis* chamada PA-U2-R200A/PA-L1-I210A em cães com melanomas orais espontâneos. A toxina modificada é ativada por enzimas chamadas uPA e MMPs da superfície da célula tumoral causando a morte dessas. Isso já foi demonstrado, em laboratório, em tumores malignos pulmonares, pancreáticos, mamários e melanomas humanos. A natureza agressiva do melanoma oral nos cães e nos seres humanos e o prognóstico reservado com baixa sobrevida para os pacientes após a cirurgia demonstram a importância do desenvolvimento de uma nova terapia para o tratamento dessa doença.

2. IDENTIFICAÇÃO:

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL

NOME DO ANIMAL E/OU NÚMERO DE REGISTRO

.....
ESPÉCIE:..... RAÇA:.....

PELAGEM:.....EXO:..... DATA DE NASCIMENTO:

3. ENVOLVIMENTO NA PESQUISA/AULA: ao participar deste estudo o Senhor (a) permitirá que o (a) pesquisador ADRIANA TOMOKO NISHIYA contribua com o estudo de novas terapias contra o câncer chamado melanoma.

O Senhor (a) tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa/aula, sem qualquer prejuízo para o seu animal. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone do (a) pesquisador (a)/professor(a). Se necessário, poderá entrar em contato com Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a médica veterinária ADRIANA TOMOKO NISHIYA que pode ser encontrada no endereço HOSPITAL VETERINÁRIO ANHEMBI MORUMBI, Telefone(s) 11 27904642, 11 31012800 e 11 991245121 e email adrianishiya@usp.br ou adriananishiya@hotmail.com

4. SOBRE OS DADOS NECESSÁRIOS:

4a) Procedimento de Rotina: O cão será avaliado clinicamente através do histórico, exame físico, exames laboratoriais, eletrocardiograma e exames de imagem para avaliação do estado geral do paciente e a presença ou não de metastases. Será colhido sangue pela veia periférica jugular do pescoço ou cefálica do antebraço para análise de hemograma, ureia, creatinina, fosfatase alcalina, albumina, alanina transferase. A radiografia de tórax em 3 posições e o ultrassonografia de abdômen serão previamente

agendados para avaliação de metástases e o eletrocardiograma será realizado pela colocação de 5 eletrodos para avaliar uma cardiopatia.

4b) Procedimento de Rotina: O cão, se estiver em boas condições de saúde, será submetido à anestesia geral intravenosa e analgésico para exame tomográfico de crânio para avaliar o tamanho e infiltração do tumor e para a colheita de dois fragmentos de 5mm para diagnosticar o tipo de tumor oral. O 1º exame tomográfico de crânio será agendado e o local a ser realizado confirmado. O exame será realizado sob anestesia geral intravenosa, para tanto será canulada uma veia periférica do antebraço (cefálica) com a administração de analgésico e anestésico geral. A tomografia computadorizada consiste num exame de imagem que demonstra tridimensionalmente o tumor e dura cerca de 30 minutos. O tumor será medido em seu comprimento, largura e altura por paquímetro digital e 2 fragmentos de 5mm serão colhidos por um instrumento chamado punch.

4c) Procedimento de Rotina: Será prescrito ao cão antibióticos (metronidazol e enrofloxacin) para combate à infecção, que esses tumores causam na cavidade oral, anti-inflamatórios (prednisona) contra a inflamação do tumor, analgésico (dipirona) para controle da dor e antisséptico (clorexidina) para limpeza oral.

4d) Procedimento experimental: O cão com diagnóstico de melanoma receberá 3 doses da toxina modificada (segunda, quarta e sexta), por via subcutânea, para avaliar a diminuição do volume tumoral.

4e) Procedimento de Rotina: Será colhido sangue para análise da concentração plasmática da toxina modificada em 0, 2 e 4 horas após a primeira aplicação, assim como nos dias 7 e 14 através de punção da veia cefálica no antebraço ou jugular no pescoço.

4f) Procedimento de Rotina: O cão será submetido a analgesia e anestesia geral após 7 dias da última aplicação da toxina para nova tomografia computadorizada, mensuração do tamanho do tumor e também para a cirurgia de remoção total do tumor, que é a terapia usual para casos de tumores orais. O 2º exame tomográfico será realizado sob anestesia geral intravenosa, para tanto será canulada uma veia periférica do antebraço (cefálica) com a administração de analgésico e anestésico geral. A cirurgia de remoção do tumor será realizada nesse mesmo procedimento anestésico, que consiste na retirada total do tumor com ou sem a remoção de parte do osso mandibular ou maxilar, dependendo da localização e infiltração tumoral, e também na retirada dos linfonodos mandibulares uni ou bilaterais.

4g) Procedimento de rotina: O cão receberá todo o acompanhamento veterinário desde o início do projeto até a remoção total dos pontos de sutura da cirurgia e será encaminhado para o serviço de quimioterapia com carboplatina para a continuidade da terapia convencional.

5. RISCOS E DESCONFORTO: a participação nesta pesquisa não traz complicações legais. Nos procedimentos podem ocorrer sinais de inflamação como vermelhidão, inchaço, dor e calor nos locais puncionados como as veias cefálicas e jugulares, assim como nas regiões de aplicação subcutânea da toxina modificada e também nos locais cirurgiados.

6. CONFIDENCIALIDADE: todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente os pesquisadores terão conhecimento dos dados.

7. BENEFÍCIOS: esperamos que este estudo traga informações importantes sobre o tratamento antitumoral com toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* em melanomas caninos de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa auxiliar muitos outros cães com essa doença tão ameaçadora.

8. PAGAMENTO: os custos que ficarão por conta da pesquisa serão: exame de biópsia incisional e análise histopatológica e imunohistoquímica, exame eletrocardiográfico, exame tomográfico, colheita de sangue após aplicação da toxina reengenheirada e cirurgia de remoção total do tumor com posterior análise histopatológica. Os custos do período pós-operatório em diante, que são procedimentos rotineiros, incluindo a quimioterapia para o tratamento do melanoma, ficarão a cargo do proprietário.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para a participação de seu(s) animal (is) nesta pesquisa. Preencher, por favor, os itens que se seguem:

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu

consentimento em participar da pesquisa.

Nome Do Proprietário: _____

Cpf/Rg: _____

Endereço: _____ Nº _____ Apto: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

Cep: + _____ Telefone: (____) _____ Celular: _____

Assinatura do Proprietário

Assinatura do Pesquisador

Data: ____/____/____

TELEFONES

Pesquisador: ADRIANA TOMOKO NISHIYA

Orientador: MARIA LUCIA ZAIDAN DAGLI

CONTATOS: (11) 27904642, (11) 31012800 e (11) 991245121 e email
adnishiya@usp.br ou adriananishiya@hotmail.com

9.5 Anexo E – Sequencia de fotos do cão 1 ao longo do tratamento com a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis*.

Cão 1

Dia 0

Dia 0

Dia 02

Dia 04

Dia 06

Dia 09

Dia 11

Dia 14

Mandibulectomia **Recidiva e metástase em linfonodo**

9.6 Anexo F – Sequencia de fotos do cão 2 ao longo do tratamento com a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis*.

Cão 2

Dia 0

Dia 02

Dia 02 (edema) **Dia 04 (ulceração mucosa)** **Dia 04** **Dia 06**

Dia 09 **Dia 11** **Dia 14 (cirurgia)** **maxilectomia**

9.7 Anexo G – Sequencia de fotos do cão 3 ao longo do tratamento com a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis*.

Paciente 3

Dia 0

Dia 02

Dia 02

Dia 04

Dia 07

maxilectomia

9.8 Anexo H – Sequencia de fotos do cão 4 ao longo do tratamento com a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis*.

Paciente 4

Dia 0

Dia 0

Dia 02

Dia 02

Dia 04

Dia 04

Dia 07

maxilectomia

9.9 Anexo I – Sequencia de fotos do cão 5 ao longo do tratamento com a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis*.

Paciente 5

Dia 0

Dia 02

Dia 04 **Dia 04** **Dia 07** **Pós operatorio (fistula)** **Cirurgia (retalho em rotação)**

9.10 Anexo J - Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 1

Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 1. **A.** Melanoma melânico desmoplásico, cujas células arranjam-se em ninhos entremeados por tecido conjuntivo, constituído por matriz extracelular, células fusiformes e redondas e numerosos vasos sanguíneos. H&E, objetiva 4x. **B.** Área de necrose de coagulação contígua à massa tumoral, com congestão e edema e hemorragia. Notas infiltrado inflamatório de mononucleares. H&E, objetiva 4x. **C.** Detalhada área de necrose, mostrando fibrina, edema e hemorragia. H&E, objetiva 20x. **D.** Detalhe da massa tumoral, mostrando célula em mitose atípica (seta maior) e corpúsculo apoptótico (seta menor). H&E, objetiva 40x.

9.11 Anexo L – Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 2

Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 2. **A.** Melanoma melânico, cujas células arranjam-se em ninhos entremeados por tecido conjuntivo. Nota-se diferentes padrões de pigmentação melânica. H&E, objetiva 4x. **B.** Área de necrose de coagulação, com congestão e edema. H&E, objetiva 20x. **C.** Detalhe da área de necrose. H&E, objetiva 40x. **D.** Detalhe dos melanócitos neoplásicos organizados em ninhos. H&E, objetiva 40x.

9.12 Anexo M – Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 3

Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 3. **A.** Melanoma melânico, cujas células arranjam-se em ninhos entremeados por tecido conjuntivo. Observar vasos sanguíneos apresentando necrose e infiltrado inflamatório. H&E, objetiva 4x. **B.** Área de necrose de coagulação com congestão, edema e hemorragia. Observar vasos necrosados. H&E, objetiva 4x. **C.** Detalhe da área de necrose, mostrando edema, hemorragia e fibrina. H&E, objetiva 20x. **D.** Detalhe de vaso sanguíneo mostrando necrose, fibrina, e trombo (seta). H&E, objetiva 40x.

9.13 Anexo N – Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 4

Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 4. A. Melanoma melânico desmoplásico, cujas células arranjam-se em ninhos entremeados por tecido conjuntivo, constituído por matriz extracelular, células fusiformes e redondas e numerosos vasos sanguíneos. H&E, objetiva 4x. B. Área de necrose de coagulação com congestão, edema e hemorragia. H&E, objetiva 4x. C. Detalhe da área de necrose, mostrando edema e hemorragia. H&E, objetiva 20x. D. Detalhe de vaso sanguíneo mostrando congestão, infiltrado inflamatório de polimorfonucleares e edema. H&E, objetiva 40x.

9.14 Anexo O – Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal 5

Fotomicrografia de corte histológico de melanoma bucal, cão 5. A. Melanoma melânico, cujas células arranjam-se em ninhos entremeados por tecido conjuntivo. Nota-se necrose superficial. H&E, objetiva 4x. B. Área de necrose de coagulação, com congestão e edema. H&E, objetiva 4x. C. Outra área de necrose superficial. H&E, objetiva 4x. D. Detalhe da área de necrose de coagulação. H&E, objetiva 10x.

10 REFERÊNCIAS

10 REFERÊNCIAS

Abi-Habib RJ, Singh R, Leppla SH, Greene JJ, Ding Y, Berghuis B, *et al.* Systemic Anthrax Lethal Toxin Therapy Produces Regressions of Subcutaneous Human Melanoma Tumors in Athymic Nude Mice. Bugge TH, Antalis TM, editors. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2006b Dec 15 [cited 2013 Feb 14];12(24):7437–43.

Abi-Habib RJ, Singh R, Liu S, Bugge TH, Leppla SH, Frankel AE. A urokinase-activated recombinant anthrax toxin is selectively cytotoxic to many human tumor cell types. *Mol Cancer Ther* [Internet]. 2006a Oct 1 [cited 2013 Jun 1];5(10):2556–62.

Alfano RW, Leppla SH, Liu S, Bugge TH, Duesbery NS, Frankel AE. Potent inhibition of tumor angiogenesis by the matrix metalloproteinase-activated anthrax lethal toxin: implications for broad anti-tumor efficacy. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* [Internet]. 2008a;7(6):745–9.

Alfano RW, Leppla SH, Liu S, Bugge TH, Herlyn M, Smalley KS, *et al.* Cytotoxicity of the matrix metalloproteinase-activated anthrax lethal toxin is dependent on gelatinase expression and B-RAF status in human melanoma cells. *Mol Cancer Ther* [Internet]. 2008b;7(5):1218–26.

Arora N, Klimpel KR, Singh Y, Leppla SH. Fusions of anthrax toxin lethal factor to the ADP-ribosylation domain of Pseudomonas exotoxin A are potent cytotoxins which are translocated to the cytosol of mammalian cells. *J Biol Chem*. 1992;267(22):15542–8.

Arora N, Leppla SH. Residues 1-254 of anthrax toxin lethal factor are sufficient to cause cellular uptake of fused polypeptides. *J Biol Chem*. 1993;268(5):3334–41.

Ascierto PA, Kirkwood JM, Grob J-J, Simeone E, Grimaldi AM, Maio M, *et al.* The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J Transl Med*. 2012;10(1):85.

Bailey TR, Paulsen DB, Sehgal I, Hosgood G. Immunohistochemical staining of urokinase plasminogen activator-like and urokinase plasminogen activator receptor-like proteins in the urinary tract of healthy dogs. *Am J Vet Res*. 2006;67:1628–34.

Bergin IL, Smedley RC, Esplin DG, Spangler WL, Kiupel M. Prognostic Evaluation of Ki67 Threshold Value in Canine Oral Melanoma. *Vet Pathol*. 2011;48(1):41–53.

Bergman PJ, Camps-Palau MA, McKnight JA, Leibman NF, Craft DM, Leung C, *et al.* Development of a xenogeneic DNA vaccine program for canine malignant melanoma at the Animal Medical Center. *Vaccine*. 2006;24(21):4582–5.

Bergman PJ, Mcknight J, Novosad A, Charney S, Farrelly J, Craft D, *et al.* Long-term survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogeneic human tyrosinase: A Phase I trial advances in brief long-term survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogeneic human. *Clin Cancer Res*. 2003;9(July 2015):1284–90.

Bergman PJ. Canine oral melanoma. *Clin Tech Small Anim Pract*. 2007 May [cited 2013 May 24];22(2):55–60.

Bolon B, Mays MBC, Hall BJ. Characteristics of Canine Melanomas and Comparison of Histology and DNA Ploidy to Their Biologic Behavior. *Vet Pathol*. 1990 Mar 1 [cited 2013 Feb 14];27(2):96–102.

Boria PA, Murry DJ, Bennett PF, Glickman NW, Snyder PW, Merkel BL, *et al.* Evaluation of cisplatin combined with piroxicam for the treatment of oral malignant melanoma and oral squamous cell carcinoma in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 2004 Feb 1;224(3):388–94.

Boston SE, Lu X, Culp WTN, Montinaro V, Romanelli G, Dudley RM, *et al.* Efficacy of systemic adjuvant therapies administered to dogs after excision of oral malignant melanomas: 151 cases (2001–2012). *J Am Vet Med Assoc*. 2014;245(4):401–7.

Brockley L, Cooper M, Bennett P. Malignant melanoma in 63 dogs (2001–2011): the effect of carboplatin chemotherapy on survival. *N Z Vet J*. 2013;61(1):25–31.

Brønden LB, Eriksen T, Kristensen AT. Oral malignant melanomas and other head and neck neoplasms in Danish dogs--data from the Danish Veterinary Cancer Registry. *Acta Vet Scand* [Internet]. 2009 Jan [cited 2013 May 31];51:54.

Brossier F, Le M, Landier A, Lafaye P. Functional Analysis of Bacillus anthracis Protective Antigen by Using Neutralizing Monoclonal Antibodies †. *Society*. 2004;72(11):6313–7.

Bussab WO, Morettin PA. *Estatística Básica*. 7a. ed. São Paulo: Saraiva; 2012.

Cancedda S, Rohrer Bley C, Aresu L, Dacasto M, Leone VF, Pizzoni S, *et al.* Efficacy and side effects of radiation therapy in comparison with radiation therapy and temozolomide in the treatment of measurable canine malignant melanoma. *Vet Comp Oncol* [Internet]. 2016;14(4):e146–57.

Cinotti E, Chevallier J, Labeille B, Cambazard F, Thomas L, Balme B, et al. Mucosal melanoma: clinical, histological and c-kit gene mutational profile of 86 French cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2017 Nov;31(11):1834-1840.

Journal_of_the_European_Academy_of_Dermatology_and_Venereology.

Cohen D, Reif JS, Brodey RS. *Epidemiological analysis of the most prevalent sites and types of canine neoplasia observed in a veterinary hospital epidemiological analysis of the most prevalent sites and types of canine neoplasia observed in a veterinary hospital*. 1974;2859-68.

Curtin J a, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*. 2005;353(20):2135-47.

Dank G, Rassnick KM, Sokolovsky Y, Garrett LD, Post GS, Kitchell BE, et al. Use of adjuvant carboplatin for treatment of dogs with oral malignant melanoma following surgical excision. *Vet Comp Oncol*.. 2012 Jun 28;9999(9999):1-7.

Docampo MJ, Cabrera J, Rabanal RM, Bassols A. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and membrane-type 1 matrix metalloproteinase in melanocytic tumors of dogs and canine melanoma cell lines. *Am J Vet Res*. 2011;72(8):1087-96.

Duffy MJ. The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy. *Curr Pharm Des*. 2004;10(1):39-49.

Esplin DG. Survival of dogs following surgical excision of histologically well-differentiated melanocytic neoplasms of the mucous membranes of the lips and oral cavity. *Vet Pathol*. 2008 Nov [cited 2013 Feb 14];45(6):889-96.

Ezzell JW, Ivins BE, Leppla SH. Immuno-electrophoretic analysis, toxicity, and kinetics of in vitro production of the protective antigen and lethal factor components of *Bacillus anthracis* toxin. *Infect Immun*. 1984 Sep;45(3):761-7.

Faleiro MR, Toledo DC, Rodrigues MMP, Amorim RL, Brito LAB, Damasceno AD, et al. Expressão de upar na próstata canina normal e com lesões proliferativas. *Ciência Anim Bras*. 2013 Jun 27 [cited 2013 Jul

Felizzola CR, Stopiglia AJ, Araújo NS de. Oral tumors in dogs: clinical aspects, exfoliative cytology and histopathology. *Ciência Rural*. 1999;29(3):499-506.

Fowles JS, Denton CL, Gustafson DL. Comparative analysis of MAPK and PI3K/AKT pathway activation and inhibition in human and canine melanoma. *Vet Comp Oncol*. 2013;13(3):288-304.

Freeman KP, Hahn KA, Harris FD, King GK. Treatment of dogs with oral melanoma by hypofractionated radiation therapy and platinum-based chemotherapy (1987-1997). *J Vet Intern Med*. 2003;17(1):96–101.

Gavriel H, McArthur G, Sizeland A, Henderson M. Review: mucosal melanoma of the head and neck. *Melanoma Res*. 2011 Aug;21(4):257–66.

Gillard M, Cadieu E, De Brito C, Abadie JJ, Vergier BBB, Devauchelle P, *et al*. Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2014;27(1):90–102.

Gioso MA. *Prevalência de neoplasias da cavidade oral de cães atendidos no centro odontológico veterinário*. 2004;123–8.

Glikin GC, Finocchiaro LME. Clinical trials of immunogene therapy for spontaneous tumors in companion animals. *Sci World J*. 2014;2014.

Grimes JA, Matz BM, Christopherson PW, Koehler JW, Cappelle KK, Hlusko KC, *et al*. Agreement between cytology and histopathology for regional lymph node metastasis in dogs with melanocytic neoplasms. *Vet Pathol*. 2017;30098581769820.

Hofmann UB, Westphal JR, Zendman AJW, Becker JC, Ruiter DJ, van Muijen GNP. Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its co-localization with membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) correlate with melanoma progression. *J Pathol*. 2000 Jul;191(3):245–256.

Iida J, Wilhelmson KL, Price MA, Wilson CM, Pei D, Furcht LT, *et al*. Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase Promotes Human Melanoma Invasion and Growth. *J Invest Dermatol*. 2004;122(1):167–76.

Inoue K, Ohashi E, Kadosawa T, Hong S-H, Matsunaga S, Mochizuki M, *et al*. Establishment and Characterization of Four Canine Melanoma Cell Lines. *J Vet Med Sci* [Internet]. 2004;66(11):1437–40.

Khanna C, London C, Vail D, Mazcko C, Hirschfeld S. Guiding the optimal translation of new cancer treatments from canine to human cancer patients. *Clinical Cancer Research*. 2009;15:5671–7.

Kimura KC, Gárate AP, Dagli MLZ. Retrospective study of neoplasms in domestic animals: A survey between 1993 and 2002 of the Service of Animal Pathology, Department of Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Sao Paulo, Southeast Brazil. *Brazilian J Vet Pathol*. 2012;5(2):60–9.

Koenig A, Wojcieszyn J, Weeks BR, Modiano JF. Expression of S100a, vimentin, NSE, and melan A/MART-1 in seven canine melanoma cells lines and twenty-nine retrospective cases of canine melanoma. *Vet Pathol*. 2001;38:427–35.

Koenig A, Wojcieszyn J, Weeks BR, Modiano JF. *Vet Pathol Online*. 2001.

Kurschat P, Zigrino P, Nischt R, Breitkopf K, Steurer P, Klein CE, *et al*. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 regulates matrix metalloproteinase-2 activation by modulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase activity in high and low invasive melanoma cell lines. *J Biol Chem*. 1999 Jul 23;274(30):21056–62.

Le Tourneau C, Lee JJ, Siu LL. Dose escalation methods in phase i cancer clinical trials. *J Nat Cancer Inst*. 2009;101:708–20.

Leppla SH. Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(10):3162–6.

Liu S, Aaronson H, Mitola DJ, Leppla SH, Bugge TH. Potent antitumor activity of a urokinase-activated engineered anthrax toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003a Jan 21;100(2):657–62.

Liu S, Bugge TH, Frankel AE, Leppla SH. Dissecting the urokinase activation pathway using urokinase-activated anthrax toxin. *Methods Mol Biol*. 2009a;539:175–90.

Liu S, Bugge TH, Leppla SH. Targeting of tumor cells by cell surface urokinase plasminogen activator-dependent anthrax toxin. *J Biol Chem* [Internet]. 2001 May 25 [cited 2013 May 31];276(21):17976–84.

Liu S, Bugge TH, Leppla SH. Targeting of tumor cells by cell surface urokinase plasminogen activator-dependent anthrax toxin. *J Biol Chem*. 2001 May 25;276(21):17976–84.

Liu S, Crown D, Miller-Randolph S, Moayeri M, Wang H, Hu H, *et al*. Capillary morphogenesis protein-2 is the major receptor mediating lethality of anthrax toxin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009b Jul 28;106(30):12424–9.

Liu S, Leppla SH. Cell surface tumor endothelium marker 8 cytoplasmic tail-independent anthrax toxin binding, proteolytic processing, oligomer formation, and internalization. *J Biol Chem*. 2003b Feb 14 [cited 2013 May 24];278(7):5227–34.

Liu S, Leppla SH. Retroviral insertional mutagenesis identifies a small protein required for synthesis of diphthamide, the target of bacterial ADP-ribosylating toxins. *Mol Cell*. 2003;12(3):603–13.

Liu S, Leung HJ, Leppla SH. Characterization of the interaction between anthrax toxin and its cellular receptors. *Cell Microbiol.* 2007 May;9(4):977–87.

Liu S, Liu J, Ma Q, Cao L, Fattah RJ, Yu Z, *et al.* Solid tumor therapy by selectively targeting stromal endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2016;113(28):E4079–87. 13.

Liu S, Ma Q, Fattah R, Bugge TH, Leppla SH. *Anti-tumor activity of anthrax toxin variants that form a functional translocation pore by intermolecular complementation.* 2017;15–7.

Liu S, Netzel-Arnett S, Birkedal-Hansen H, Leppla SH. Tumor cell-selective cytotoxicity of matrix metalloproteinase-activated anthrax toxin. *Cancer Res.* 2000 Nov;60(21):6061–7.

Liu S, Redeye V, Kuremsky JG, Kuhnen M, Molinolo A, Bugge TH, *et al.* Intermolecular complementation achieves high-specificity tumor targeting by anthrax toxin. *Nat Biotechnol.* 2005;23(6):725–30.

Liu S, Redeye V, Kuremsky JG, Kuhnen M, Molinolo A, Bugge TH, *et al.* *Targeting by anthrax toxin.* 2008a;23(6):725–30.

Liu S, Wang H, Currie BM, Molinolo A, Leung HJ, Basile JR, *et al.* *NIH Public Access.* 2009;283(1):529–40.

Liu S, Wang H, Currie BM, Molinolo A, Leung HJ, Moayeri M, *et al.* Matrix metalloproteinase-activated anthrax lethal toxin demonstrates high potency in targeting tumor vasculature. *J Biol Chem.* 2008b Jan;283(1):529–40.

Liu S, Zhang Y, Hoover B, Leppla SH. The receptors that mediate the direct lethality of anthrax toxin. *Toxins (Basel).* 2013 Jan;5(1):1–8.

London CA, Bear MD, McCleese J, Foley KP, Paalangara R, Inoue T, *et al.* Phase I evaluation of STA-1474, a prodrug of the novel HSP90 inhibitor ganetespib, in dogs with spontaneous cancer. *PLoS One.* 2011;6(11).

London CA, Bernabe LF, Barnard S, Kisseberth WC, Borgatti A, Henson M, *et al.* Preclinical evaluation of the novel, orally bioavailable Selective Inhibitor of Nuclear Export (SINE) KPT-335 in spontaneous canine cancer: Results of a phase i study. *PLoS One.* 2014;9(2).

London CA, Hannah AL, Zadovoskaya R, Malignancies S, Chien MB, Kollias-baker C, *et al.* *Phase I dose-escalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with spontaneous malignancies, phase i dose-escalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with.* 2003;9(July):2755–68.

Loukopoulos P, Mungall BA, Straw RC, Thornton JR, Robinson WF. Matrix Metalloproteinase-2 and-9 Involvement in Canine Tumors. *Vet Pathol*. 2003;40(4):382–94. 2.

Lyu J, Wu Y, Li C, Wang R, Song H, Ren G, *et al*. Mutation scanning of *BRAF*, *NRAS*, *KIT*, and *GNAQ* / *GNA11* in oral mucosal melanoma: a study of 57 cases. *J Oral Pathol Med* [Internet]. 2015;(12):n/a-n/a.

Manley CA, Leibman NF, Wolchok JD, Rivière IC, Bartido S, Craft DM, *et al*. Xenogeneic Murine Tyrosinase DNA Vaccine for Malignant Melanoma of the Digit of Dogs. *J Vet Intern Med*. 2011;25(1):94–9.

Marcus DM, Marcus RP, Prabhu RS, Owonikoko TK, Lawson DH, Switchenko J, *et al*. Rising incidence of mucosal melanoma of the head and neck in the United States. *J Skin Cancer*. 2012;2012:231693.

Moayeri M, Leppla SH, Vrentas C, Pomerantsev AP, Liu S. Anthrax Pathogenesis*. *Annu Rev Microbiol*. 2015;69(1):185–208.

Mochizuki H, Kennedy K, Shapiro SG, Breen MB. BRAF Mutations in Canine Cancers. *PLoS One*. 2015;10(6):231–45.

Modiano JF, Ritt MG, Wojcieszyn J. The molecular basis of canine melanoma: pathogenesis and trends in diagnosis and therapy. *J Vet Intern Med*. 1999;13(3):163–74.

Murphy S, Hayes a M, Blackwood L, Maglennon G, Pattinson H, Sparkes a H. Oral malignant melanoma - the effect of coarse fractionation radiotherapy alone or with adjuvant carboplatin therapy. *Vet Comp Oncol*. 2005;3(4):222–9.

Nakaichi M, Yunuki T, Okuda M, Une S, Taura Y. Activity of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in canine oronasal tumors. *Res Vet Sci*. 2007;82(2):271–9.

Nguyen SM, Thamm DH, Vail DM, London CA. Response evaluation criteria for solid tumours in dogs (v1.0): a Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) consensus document. *Vet Comp Oncol*. 2015;13(3):176–83.

Omholt K, Grafström E, Kanter-Lewensohn L, Hansson J, Ragnarsson-Olding BK. KIT pathway alterations in mucosal melanomas of the vulva and other sites. *Clin Cancer Res*. 2011;17(12):3933–42.

Ottinod JM, Smedley RC, Walshaw R, Hauptman JG, Kiupel M, Obradovich JE. A retrospective analysis of the efficacy of Oncept vaccine for the adjunct treatment of canine oral malignant melanoma. *Vet Comp Oncol*. 2013;11(3):219–29.

Peters DE, Hoover B, Cloud LG, Liu S, Molinolo AA, Leppla SH, *et al.* Comparative toxicity and efficacy of engineered anthrax lethal toxin variants with broad anti-tumor activities. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014;279(1):220-9.

Porrello A, Cardelli P, Spugnini EP. Oncology of companion animals as a model for humans. an overview of tumor histotypes. *J Exp Clin Cancer Res.* 2006 Mar;25(1):97–105.

Przeździecki R, Czopowicz MM, Sapierzyński R. Accuracy of routine cytology and immunocytochemistry in preoperative diagnosis of oral amelanotic melanomas in dogs. *Vet Clin Pathol.* 2015;4:n/a-n/a.

R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing.* R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; 2017. Available from: <https://www.R-project.org/>.

Ramos-Vara JA, Beissenherz ME, Miller MA, Johnson GC, Pace LW, Fard A, *et al.* Retrospective Study of 338 Canine Oral Melanomas with Clinical, Histologic, and Immunohistochemical Review of 129 Cases. *Vet Pathol.* 2000;37(6):597–608.

Rassnick KM, Ruslander DM, Cotter SM, Al-Sarraf R, Bruyette DS, Gamblin RM, *et al.* Use of carboplatin for treatment of dogs with malignant melanoma: 27 cases (1989-2000). *J Am Vet Med Assoc.* 2001 May 1;218(9):1444–8.

Rønø B, Rømer J, Liu S, Bugge TH, Leppla SH, Kristjansen PEG, *et al.* Antitumor efficacy of a urokinase activation-dependent anthrax toxin. *Mol Cancer Ther.* 2006b Jan;5(1):89–96.

Rønø B, Rømer J, Liu S, Bugge TH, Leppla SH, Kristjansen PEG. Antitumor efficacy of a urokinase activation–dependent anthrax toxin. *Mol Cancer Ther.* 2006a;5(1):89–96.

Rossi F, Aresu L, Vignoli M, Buracco P, Bettini G, Ferro S, *et al.* Metastatic cancer of unknown primary in 21 dogs. *Vet Comp Oncol.* 2015;13(1):11–9.

Santos A, Lopes C, Marques RM, Amorim I, Ribeiro J, Frias C, *et al.* Immunohistochemical analysis of urokinase plasminogen activator and its prognostic value in canine mammary tumours. *Vet J.* 2011 Jul;189(1):43–83.

Santos A, Lopes C, Marques RM, Amorim I, Ribeiro J, Frias C, *et al.* Immunohistochemical analysis of urokinase plasminogen activator and its prognostic value in canine mammary tumours. *Vet J.* 2011 Jul;189(1):43–8.

Schafer JM, Peters DE, Morley T, Liu S, Molinolo AA, Leppla SH, *et al.* Efficient targeting of head and neck squamous cell carcinoma by systemic administration of a dual uPA and MMP-activated engineered anthrax toxin. *PLoS One*. 2011;6(5):e20532.

Security H, Dise A. Anti-proliferative role of recombinant lethal toxin of *Bacillus anthracis* on primary mammary ductal carcinoma cells revealing. *Oncotarget*. 2017 May 30; 8(22): 35835–35847.

Sieuwerts AM, Klijn JGM, Peters HA, Foekens JA. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. *Clin Chem Lab Med*. 1995;33(11):813–24.

Simpson RM, Bastian BC, Michael HT, Webster JD, Prasad ML, Conway CM, *et al.* Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2014 Jan;27(1):37–47.

Smedley RC, Lamoureux J, Sledge DG, Kiupel M. Immunohistochemical Diagnosis of Canine Oral Amelanotic Melanocytic Neoplasms. *Vet Pathol*. 2011a;48(1):32–40.

Smedley RC, Spangler WL, Esplin DG, Kitchell BE, Bergman PJ, Ho H-Y, *et al.* Prognostic Markers for Canine Melanocytic Neoplasms. *Vet Pathol*. 2011b;48(1):54–72.

Smith SH, Goldschmidt MH, McManus PM. A comparative review of melanocytic neoplasms. *Vet Pathol*. 2002 Nov 1;39(6):651–78.

Spangler WL, Kass PH. The histologic and epidemiologic bases for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia. *Vet Pathol*. 2006 Mar;43(2):136–49.

Su Y, Ortiz J, Liu S, Bugge TH, Singh R, Leppla SH, *et al.* Systematic urokinase-activated anthrax toxin therapy produces regressions of subcutaneous human non-small cell lung tumor in athymic nude mice. *Cancer Res*. 2007 Apr;67(7):3329–36.

Sugiura K, Chester Stock C, Sugiura M. Studies in a tumor spectrum. II. The growth of a variety of mouse and rat tumors. *Cancer*. 1952;5(5):979–91.

Sulaimon SS, Kitchell BE. The basic biology of malignant melanoma: molecular mechanisms of disease progression and comparative aspects. *J Vet Intern Med*. 2003;17(6):760–72.

Teixeira TF, Silva TC, Cogliati B, Nagamine MK, Dagli MLZ. Retrospective study of melanocytic neoplasms in dogs and cats. *Brazilian J Vet Pathol*. 2010;3(2):100-4.

Thamm DH, Kurzman ID, Clark MA, Ehrhart EJ, Kraft SL, Gustafson DL, *et al.* Preclinical investigation of PEGylated tumor necrosis factor alpha in dogs with spontaneous tumors: phase I evaluation. *Clin Cancer Res.* 2010 Mar 1;16(5):1498–508.

Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, *et al.* New guidelines to evaluate the response to treatment. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(3):205–16.

Tuohy JL, Milgram J, Worley DR, Dernell WS. A review of sentinel lymph node evaluation and the need for its incorporation into veterinary oncology. *Vet Comp Oncol.* 2009 Jun;7(2):81–91.

Vail DM, Husbands BD, Kamerling SG, Simpson H, Kurzman ID, McDonnell A. Phase I study to determine the maximal tolerated dose and dose-limiting toxicities of orally administered idarubicin in dogs with lymphoma. bugge TH, Antalis TM, editors. *J Vet Intern Med.* 2012 May 1;26(3):608–13.

Vail DM. Cancer Clinical Trials: Development and Implementation. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 2007;37(6):1033–57.

Vail DM. Levels of evidence in canine oncology trials-a case in point. *Vet Comp Oncol.* 2013;11:167–8.

Van der Weyden L, Patton EE, Wood GA, Foote AK, Brenn T, Arends MJ, *et al.* Cross-species models of human melanoma. *J Pathol.* 2016;238(2):152–65.

Vega-Avila E, Pugsley MK. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proc West Pharmacol Soc.* 2011 Jan;54:10–4.

Wei BR, Michael HT, Halsey CHC, Peer CJ, Adhikari A, Dwyer JE, *et al.* Synergistic targeted inhibition of MEK and dual PI3K/mTOR diminishes viability and inhibits tumor growth of canine melanoma underscoring its utility as a preclinical model for human mucosal melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2016;29(6):643–55.

Wein AN, Peters DE, Valivullah Z, Hoover BJ, Tatineni A, Ma Q, *et al.* Tumor therapy with a urokinase plasminogen activator-activated anthrax lethal toxin alone and in combination with paclitaxel. *Invest New Drugs.* 2013 Feb;31(1):206–12.

Wein AN, Peters DE, Valivullah Z, Hoover BJ, Tatineni A, Ma Q, *et al.* An anthrax toxin variant with an improved activity in tumor targeting. *Sci Rep.* 2015;5:16267.

Williams LE, Packer RA. Association between lymph node size and metastasis in dogs with oral malignant melanoma: 100 cases (1987-2001). *J Am Vet Med Assoc.* 2003 May;222(9):1234–6.