Gissele Rolemberg Oliveira Silva

**Estabelecimento de linhagens celulares de melanoma canino
e transdução com vetores adenovirais aprimorados**

SÃO PAULO

2019

Gissele Rolemberg Oliveira Silva

**Estabelecimento de linhagens celulares de melanoma canino
e transdução com vetores adenovirais aprimorados**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Bryan Eric Strauss

SÃO PAULO

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Gissele Rolemberg Oliveira
Estabelecimento de linhagens celulares de
melanoma canino e transdução com vetores adenovirais
aprimorados / Gissele Rolemberg Oliveira Silva. --
São Paulo, 2019.
Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.
Orientador: Bryan Eric Strauss.

Descritores: 1.Melanoma 2.Cães 3.Terapia gênica
4.Vetores virais 5.Linhagem celular 6.Gene TP53

USP/FM/DBD-018/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*Aos meus pais Marlene Rolemberg da Silva e
Osmar Oliveira Silva pelo apoio, incentivo
e por serem modelos durante toda a minha encarnação.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Bryan Eric Strauss pelos ensinamentos, discussões, ideias, direcionamentos e por estar SEMPRE presente. Por ter me recebido em seu grupo, concedido essa incrível oportunidade e por ter confiado em mim. Obrigada por ter me tornado a pesquisadora que sou hoje.

Aos alunos e funcionários do ICESP e da Faculdade de Medicina da USP pela incessante colaboração.

À FAPESP pelo financiamento imprescindível para a elaboração e desenvolvimento deste projeto.

Aos professores Roger Chammas e Luisa Villa, por serem exemplos de profissionais que eu desejo alcançar.

Aos pesquisadores e amigos Daniela, Rodrigo, Marlous, Paulo, Samir, Aline, Igor, Otto, Ruan, Nayara, Nadine, Fernanda e Otavio pelo treinamento, apoio, conselhos, discussões e cafés. Sem vocês este projeto não seria possível.

Aos colegas veterinários Cristina Massoco, Maria Lucia Zaidan Dagli, Felipe Sueiro, Aline Zoppa, Renata Sobral, Karine Germano e Leonel Rocha pela colaboração e excelentes discussões e ideias.

À minha amiga e sócia Simone Crestoni, pelo incentivo, apoio, por suportar minhas ausências tantas vezes, por ter sido a responsável por abrir as portas para essa jornada e por continuar me fazendo amar a pesquisa.

À minha família Marlene, Osmar, Alessandra e Rodrigo por todo amor, carinho, apoio incondicionais, sempre.

Ao meu marido Eduardo, pelo amor, compreensão, companheirismo e pela oportunidade maravilhosa de amá-lo.

RESUMO

Silva GRO. *Estabelecimento de linhagens celulares de melanoma canino e transdução com vetores adenovirais aprimorados* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

INTRODUÇÃO: O melanoma é um câncer de alta mortalidade tanto na medicina quanto na veterinária, devido à baixa resposta às terapias utilizadas e à capacidade de evolução metastática da doença. Avanços no campo da oncologia têm mostrado que os agentes que têm como alvo componentes do sistema imunológico, bem como as terapias molecularmente dirigidas, são muito promissores no tratamento do melanoma. Nosso grupo tem desenvolvido vetores virais para a transferência gênica de fatores antitumorais. O aprimoramento no vetor adenoviral inclui a inserção do tripeptídeo RGD, que permite um amplo tropismo de transdução, e o uso de um promotor responsivo a p53 para controlar expressão do gene terapêutico. Visto que o melanoma canino pode ser um modelo experimental por se tratar de um câncer de ocorrência espontânea e de comportamento biológico semelhante ao melanoma humano, procuramos testar nossa abordagem, que chamamos AdRGD-PG, neste modelo. **MÉTODOS:** Para isso foram estabelecidas linhagens celulares de melanoma canino para a determinação da capacidade de transdução pelos vetores adenovirais. Em seguida foi realizado o sequenciamento dos exons 4 - 8 do gene *TP53* e a avaliação da expressão de genes da via de *TP53* induzidos por doxorrubicina e Nutlin-3. **RESULTADOS:** As quatro linhagens de melanoma canino estabelecidas possuem capacidade tumorigênica e de serem transduzidas pelos vetores adenovirais. Não foram identificadas alterações na sequência do *TP53* na região avaliada e a doxorrubicina promoveu aumento da expressão dos transgenes dirigidos pelo promotor PG e a ativação de genes da via de *TP53*. **CONCLUSÕES:** A funcionalidade desta plataforma adenoviral aprimorada abre oportunidades para estudos da transferência gênica, incluindo da combinação p19ARF/IFN β , nas linhagens estabelecidas. Com o sucesso destas análises, teremos um importante

modelo experimental a ser utilizado no desenvolvimento de novas terapias para o melanoma.

Descritores: melanoma; cães; terapia gênica; vetores virais; linhagem celular; gene TP53.

ABSTRACT

Silva GRO. *Establishment of canine melanoma cell lines and transduction with improved adenoviral vectors* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

INTRODUCTION: Melanoma is a cancer of high mortality both in human and veterinary medicine due to the poor response to therapies and the metastatic evolution of the disease. Advances in the field of oncology have shown that agents that target immune system components, as well as molecularly targeted therapies, are very promising for the treatment of melanoma. Our group has developed viral vectors for gene transfer of antitumor factors. The improvement in the adenoviral vector includes the insertion of the RGD tripeptide, which allows a broad transduction tropism, and the use of a p53 responsive promoter to control therapeutic gene expression. Canine melanoma may be considered as an experimental model since it is a spontaneous cancer with biological behavior similar to human melanoma, thus we aim to test our approach, which we call AdRGD-PG, in this model. **METHODS:** For this purpose, canine melanoma cell lines were established before determining the transduction capacity of adenoviral vectors. Next, sequencing of exons 4-8 of the *TP53* gene and evaluation of the expression of genes in the *TP53* pathway upon induction with doxorubicin and Nutlin-3 were performed. **RESULTS:** The four established canine melanoma lines have tumorigenic capacity and are transduced by the adenoviral vectors. No changes were identified in the *TP53* sequence in the assessed region and doxorubicin promoted increased expression of the transgenes directed by the PG promoter as well as activation of the *TP53* pathway genes. **CONCLUSIONS:** The functionality of this improved adenoviral platform opens up opportunities for gene transfer studies, including the p19ARF / IFN β combination, in the established cell lines. With the success of these analyses, we have an important experimental model to be used in the development of new therapies for melanoma.

Descriptors: melanoma; dogs; gene therapy; viral vectors; cell lines; TP53 gene.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARF – *Alternating Reading Frame*

Bax – *Bcl-2 associated X protein*

BBC3 - *Bcl-2 binding component 3*

Bcl-2 – *B-cell leukemia/lymphoma-2*

CAR - *Coxsackie Adenovirus Receptor*

CMV - *Citomegalovirus*

CPNM – *Câncer de pele não melanoma*

CTLA4 - *Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4*

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's medium*

eGFP - *enhanced green fluorescent protein* (proteína verde fluorescente)

FDA – *Food and Drug Administration*

GM-CSF - *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos)

INCA – *Instituto Nacional do Câncer*

INF - *Interferon*

Lac Z – *Beta galactosidase*

Luc – *Luciferase*

LVV – *Laboratório de Vetores Virais*

MDM2 – *Murine double minute 2*

MOI – *Multiplicity of infection* (Multiplicidade de infecção)

NK – *Natural killer*

PBS – *Phosphate Buffered Saline*

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia de polymerase)

PD-1 – *Programmed cell death - 1*

PUMA – *53 up regulated modulator of apoptosis*

RGD – Arginina – Glicina – Ácido Aspártico

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*

SFB – Soro fetal bovino

UV – Ultravioleta

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do delineamento experimental do projeto.....	18
Figura 2 - Esquema demonstrando resultados do delineamento experimental....	33
Figura 3 - Curva de crescimento in vivo de melanoma canino.....	38
Figura 4 - Esferoides formados por cultura primária de melanoma de cavidade oral canino.....	39
Figura 5 - Marcação imunohistoquímica de melanoma canino.....	42
Figura 6 - Marcação imunohistoquímica de cultura celular de melanoma canino.....	43
Figura 7 - Curva de crescimento in vitro das linhagens BAN, TIG e GAB e MEL de melanoma canino.....	45
Figura 8 - Cromatograma do sequenciamento e segmento da sequência consenso do TP53 da linhagem de melanoma canino GAB.....	46
Figura 9 - Alinhamento global do TP53 com as linhagens de melanoma canino.	48
Figura 10 - Transdução de linhagens de melanoma canino com o vetor AdRGDCMVLacZ.....	50
Figura 11 - Transdução de linhagens de melanoma canino com o vetor AdRGD-PGeGFP.....	52
Figura 12 - Ensaio de viabilidade celular por MTT de linhagens de melanoma canino.....	54
Figura 13 - Tratamento com doxorrubicina ou Nutlin-3 para ativar p53 em linhagens de melanoma canino transduzidas com o vetor AdRGD-PGeGFP	56

Figura 14 - Tratamento com doxorubicina ou Nutlin-3 para ativar p53 em linhagens de melanoma canino transduzidas com o vetor AdRGD- PGLuc2 ou AdRGDCMVLuc2.....	58
Figura 15 - Análise por PCR quantitativa da expressão genica de p53, p21, MDM2, Bax, PUMA, Bcl-2 em linhagens de melanoma canino tratadas com doxorubicina ou Nutlin-3.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos utilizados na marcação imunohistoquímica dos tumores extraídos de camundongos nude.....	23
Tabela 2 - Primers para reação de PCR e sequenciamento do gene TP53 canino.....	24
Tabela 3 - Primers para PCR quantitativo utilizados em linhagens de melanoma canino.....	27
Tabela 4 - Características de doadores e de amostras de melanoma canino.....	34
Tabela 5 - Características dos clones celulares estabelecidos a partir de melanoma canino.....	37
Tabela 6 - Resultado da marcação imunohistoquímica dos tumores provenientes de cultura primária de melanoma canino.....	41

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Melanoma.....	2
1.2 Melanoma canino.....	5
1.3 <i>TP53</i>	9
1.4 Terapia Gênica do melanoma	13
1.5 Vetores Adenovirais.....	14
2 OBJETIVO.....	17
2.1 Objetivos Específicos.....	17
3. MÉTODOS.....	18
3.1 Coleta de amostras.....	18
3.2 Caracterização histopatológica e imunohistoquímica.....	19
3.3 Cultivo e crescimento <i>in vitro</i>	20
3.3.1 Análise de cinética de crescimento.....	21
3.4 Crescimento <i>in vivo</i>	22
3.5 Crescimento esferoide.....	23
3.6 Sequenciamento.....	24
3.7 Tratamento com doxorubicina e Nutlin-3.....	26
3.8 Reação de PCR quantitativa.....	27
3.9 Transdução das linhagens com vetores adenovirais <i>in vitro</i>	29
3.10 Ensaios de viabilidade celular por MTT.....	30
3.11 Verificação de contaminação por Micoplasma.....	31
3.12 Análise Estatística.....	32
4 RESULTADOS.....	33
4.1 Coleta de amostras.....	34

4.2	Cultura primária.....	35
4.3	Crescimento tumoral <i>in vivo</i>	36
4.3.1	Crescimento 3D.....	38
4.4	Caracterização molecular.....	40
4.5	Estabelecimento de linhagens tumorais.....	44
4.6	Sequenciamento dos exons 4 – 8 do <i>TP53</i> canino.....	45
4.7	Transdução com vetores adenovirais.....	49
4.8	Ensaio de viabilidade celular por MTT.....	53
4.9	Ensaio funcionais dos vetores adenovirais.....	55
4.10	PCR Quantitativa.....	59
5	DISCUSSÃO.....	61
6	CONCLUSÃO.....	71
7	REFERÊNCIAS.....	72
	ANEXOS.....	80

1 Introdução

O câncer é o nome atribuído a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos [1]. A classificação das neoplasias pode considerar o tecido de origem do tumor, denominadas carcinoma, quando derivam do epitélio de revestimento, e sarcoma quando derivam dos tecidos conjuntivos (mesenquimais). Podem ser classificadas quanto a célula de origem, como o melanoma originado de melanócitos, ou ainda quanto a localização do tumor, como o câncer de pele e câncer de mama [2].

O melanoma é o menos frequente de todos os cânceres de pele, porém tem o pior prognóstico e o mais alto índice de mortalidade nesta localização. Também pode acometer outras regiões como mucosas, olhos e sistema nervoso [3]. A oncologia vem ao longo das décadas aprimorando técnicas diagnósticas e tratamentos de pacientes com esta doença, sendo a imunoterapia bem como os avanços tecnológicos alguns dos principais responsáveis pelo aumento significativo na sobrevida e na qualidade de vida dos pacientes.

O Laboratório de Vetores Virais (LVV) vem desenvolvendo um trabalho com constante empenho no desenho e confecção de vetores virais relevantes para o tratamento antitumoral. A estratégia fundamental é o uso de um promotor responsivo a p53 para dirigir a expressão do transgene contido no vetor viral, e a inserção do tripeptídeo RGD, que permite um amplo tropismo de transdução. Nosso grupo constatou que a transferência gênica mediada por estes vetores adenovirais aprimorados, oferece vantagens para a resposta anti-tumoral em modelo murino de melanoma [4]. Estes resultados obtidos em camundongos, mesmo promissores, podem não ser observados em humanos, portanto novos estudos são necessários para aproximar estas observações com a realidade clínica. Para isso, precisamos estabelecer modelos pré-clínicos que permitem expor o potencial de nossa abordagem.

Estudos indicam que certos aspectos biológicos da espécie humana são mais parecidos com os da espécie canina do que da murina. O câncer de cães e de

humanos possuem aspectos etiológicos, histológicos e clínicos semelhantes [5, 6], Especialmente o melanoma de mucosa canino apresenta comportamento biológico e respostas ao tratamento semelhantes ao melanoma humano, e já vem sendo considerado um modelo clínico e terapêutico relevante [7].

Considerando a grande importância de estudos comparativos de câncer, desenvolvimento de novas drogas e a melhoria de pesquisas translacionais, um Programa de Oncologia Comparativa foi lançado em 2004 pelo U.S. *National Cancer Institute* (NIH), e atualmente engloba 12 multicentros e 20 hospitais veterinários acadêmicos nos Estados Unidos e Canadá, para realização de protocolos clínicos, com objetivo terapêutico, em cães de estimação com tumores espontâneos.

Sendo assim, dentro desta proposta, objetivamos estabelecer linhagens de melanoma canino para a realização da transdução com os vetores adenovirais aprimorados. A conclusão destas etapas abrirá oportunidade para futuros ensaios dentro da abordagem de nosso grupo como modelo de terapia gênica.

1.1 Melanoma

O melanoma surge da ocorrência de mutações genéticas em melanócitos [8], que são células produtoras de melanina. Estas células derivam de melanoblastos da crista neural e são encontradas na epiderme, derme, mucosas, meninges e coróide. Na pele encontram-se na camada basal da epiderme e projetam dendritos entre os queratinócitos. A melanina, proteína produzida a partir da tirosina, tem como função a proteção da pele contra a ação nociva da radiação emitida pelo sol e também é induzida pelo dano no DNA causado pela radiação UV [9].

Houve um aumento da incidência mundial de melanoma cutâneo nas últimas décadas, que varia entre as populações de diferentes etnias, localizações geográficas e com a exposição solar [9]. Além da pele clara e a alta exposição solar, os principais fatores de risco envolvem história prévia de câncer de pele, histórico

familiar de melanoma, nevos congênitos, nevos displásicos e xeroderma pigmentoso [3].

A radiação UV é um dos principais fatores etiológicos do melanoma cutâneo sendo a principal a UVB, que é absorvida pela epiderme gerando moléculas reativas (radicais livres) que podem lesionar os ácidos nucleicos ou proteínas promovendo a iniciação tumoral. Os principais determinantes genéticos são as mutações proto-oncogênicas B-Raf (BRAF), neurofibromina 1 (NF1) e NRAS, cuja alta carga de mutação está associado à exposição crônica à radiação ultravioleta [10].

O melanoma de mucosa é uma doença epidemiológica e geneticamente distinta do cutâneo, refletindo nas diferenças biológicas entre as doenças. Por sua baixa incidência na população, em torno de 0,5% de todos os melanomas, seus fatores etiológicos e de risco não estão bem estabelecidos. É duas vezes mais frequente em mulheres, com idade média ao diagnóstico de 70 anos e sua incidência ao longo das décadas tem sido estável. É mais frequente em cabeça e pescoço, representando 55% dos melanomas de mucosa, e na cavidade oral ocorre principalmente na maxila e palato e em pessoas mais jovens, sendo que 18% dos casos ocorrem antes dos 40 anos [11].

A radiação UV não parece ser um fator etiológico do melanoma de mucosa pela localização anatômica, nenhuma associação com HPV (papiloma vírus humano) foi estabelecido e o papel do tabagismo ainda não foi totalmente esclarecido [11].

A patologia ainda não é totalmente definida, no entanto algumas alterações genéticas são conhecidas. Dados sugerem que o c-kit está superexpresso em 80% dos melanomas de mucosa [12, 13] e mutações no gene BRAF são pouco comuns, detectadas em menos de 10% dos casos, contrário ao observado nos cutâneos, que se apresentam em 50% dos casos [14].

O comportamento biológico é geralmente mais agressivo do que o cutâneo, embora ambas as formas quando diagnosticadas tardiamente podem evoluir para metástases em linfonodos, pulmão, fígado, cérebro e ossos. As taxas de sobrevida em 5 anos são de 0 – 35% e 10 - 20% dos casos de melanoma de mucosa e cutâneo, respectivamente [10].

Dependendo das características do tumor (localização, estágio e perfil genético) as opções terapêuticas podem ser ressecção cirúrgica, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia, terapia alvo ou terapia gênica. Na doença cutânea, ressecções completas oferecem a maior chance de sobrevida livre de doença e cura em estágio I – IIIB [9]

A dacarbazina é um agente alquilante aprovado em 1974 pelo FDA para o tratamento de melanoma em estágio avançado. Estudos demonstraram taxas de reposta completa em menos de 5% dos casos e sobrevida após 5 anos em 2 a 6% dos pacientes tratados com este quimioterápico [14]. Apesar disso ainda é um medicamento utilizado no tratamento como monoterapia ou associada a outros quimioterápicos, imunoterápicos ou a terapia alvo. A resistência a apoptose foi apontada como uma das maiores causas de resistência a quimioterapia em melanoma [15].

A temozolomida (TMZ) é uma pró-droga derivada da dacarbazina, cujo tratamento, comparado a dacarbazina mostrou diminuição da progressão livre de doença, mas nenhuma diferença foi observada na sobrevida global [16].

Altas doses de $INF\alpha$ também demonstraram efeito antitumoral imunomodulador, estimulando a expressão de complexo principal de histocompatibilidade 1 (MHC-I) em melanoma e células do sistema imune, inibindo a proliferação das células tumorais, com efeito apoptótico dose-dependente [17], porém apesar de diminuir a recorrência e aumentar a sobrevida de pacientes, pode provocar efeitos adversos severos [18].

Outra terapia que tem se mostrado promissora no tratamento de melanoma cutâneo e de mucosa é a eletroquimioterapia. É uma técnica que combina a ação de drogas citotóxicas como a bleomicina e a cisplatina com pulsos elétricos de alta intensidade e curta duração, aumentando a permeabilidade da célula ao quimioterápico [19].

Com a aprovação pelo FDA em 2011 de vários agentes terapêuticos para o melanoma avançado, os pacientes tiveram resultados revolucionários. Inibidores de RAF e MEK (cobimetinib and trametinib), inibidores seletivos de BRAF (vemurafenib e dabrafenib) assim como inibidores de *checkpoint* anti-PD1 e anti-CTLA4 (como

nivolumab, pembrolizumab e ipilimumab), tem aumentado significativamente a sobrevida de pacientes com respostas duráveis [20].

Bloqueadores de checkpoint também parecem ter algum grau de eficiência em melanoma de mucosa avançado. Em comparação ao melanoma cutâneo estudos revelam que há menor expressão de PD-L1 em melanoma de mucosa, e menores taxas de resposta às terapias utilizadas [21]. Mesmo com os recentes avanços terapêuticos, o prognóstico ruim dos pacientes com melanoma motiva a continuidade de pesquisas clínicas e em laboratório com esforços para obter maior controle da doença e melhor qualidade de vida aos pacientes.

1.2 Melanoma canino

Dados internacionais sugerem que, em cães, são esperados mais de 4 milhões de novos diagnósticos de câncer por ano [22]. Por viverem no mesmo ambiente que as pessoas, são influenciados pelos mesmos fatores ambientais que podem levar a doenças crônicas e ao câncer. De fato, o cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) possui alta susceptibilidade ao câncer e é relatado como a espécie animal que mais apresenta doenças crônicas hereditárias [23].

O melanoma é um câncer agressivo frequentemente encontrado na espécie canina [24]. A forma mais comum é a cutânea, representando de 4 a 7% de todos os tumores de pele [7], porém pode acometer mucosas, úvea e leptomeninges, dígito e é a principal neoplasia maligna de cavidade oral nesta espécie [25]. O melanoma de mucosa apresenta homologia aos melanomas de mucosa humanos [26].

A doença é comum em cães com pele pigmentada como schnauzers e scottish terriers [27]. Acometem geralmente adultos e cães de raças pequenas e de mucosa oral pigmentada são descritos por apresentarem maior risco de desenvolverem melanoma de cavidade oral, especialmente cocker spaniels, poodles, chow chow e golden retrievers [27] embora possa ocorrer em qualquer

raça. Um estudo relatou que 75% dos dobermans e schnauzers miniaturas apresentaram neoplasias melanocíticas de comportamento menos agressivo do que poodles, cuja agressividade foi observada em 85%, indicando que há diferenças entre o comportamento biológico dos tumores entre as raças [28].

A etiologia do melanoma ainda não está completamente estabelecida, porém estudos indicam que há relação com a exposição a agentes químicos, trauma, hormônios, a microbiota existente, além de mutações em genes supressores de tumor [24, 27, 29, 30].

Em melanomas humanos, a mutação em BRAF está associada a exposição a radiação UV, porém em mucosas a mutação é pouco frequente. Em cães há poucos estudos descrevendo as alterações genéticas do melanoma canino. Os melanomas de mucosa oral são mais frequentes do que em leito ungueal e regiões expostas à radiação UV, além disso, mutações em BRAF não são frequentes. Um estudo demonstrou 6% de mutação no gene BRAF em melanoma canino e 17% em melanocitomas, seu correspondente benigno [31, 32]. Autores também sugerem que a perda ou diminuição significativa da expressão de p16 (CDKN2A) tanto em melanomas quanto em tumores benignos caninos são comuns. A inativação desta via pode estar associada a patogênese do melanoma. A perda ou diminuição da expressão de PTEN também foi identificada em melanomas e linhagens tumorais [33]. Perfis de microRNA foram examinados em linhagens de melanoma canino e humanos e foram identificados como supressores de tumor os microRNAs 145 e 205 [34].

O melanoma apresenta comportamento biológico variável dependendo de uma série de fatores como localização, parâmetros histológicos e marcadores moleculares. Na pele são geralmente benignos e na cavidade oral, dígito e de junções muco-cutâneas podem apresentar comportamento biológico mais agressivo do que em outras localizações [35] infiltrando-se localmente e evoluindo para metástase em linfonodos, pulmão e outros órgãos [36]. São fatores prognósticos da doença o estadiamento clínico, características histopatológicas (como índice mitótico, atipia nuclear, grau de pigmentação, grau de infiltração/invasão, invasão linfática) e necrose [35].

Um dos fatores prognósticos amplamente considerados em oncologia veterinária é a expressão da proteína Ki-67. É uma proteína nuclear expressa em todas as fases do ciclo celular (G1 – M), mas não nas células em repouso (G0). Sua marcação é considerada uma medida da fração de crescimento tumoral e a expressão maior ou igual a 19,5% em melanoma oral canino, associada às características clínicas e histológicas, está relacionada à menor sobrevida [37-39].

Com as semelhanças histológicas entre as espécies canina e humana e os dados de sequenciamento de genes relevantes para a oncologia foi possível definir correspondências da histogenética entre as espécies, tornando os melanomas caninos modelos relevantes para o estudo de genes envolvidos em vias não dependentes de UV, como melanomas mucosos e acrais.

Na medicina veterinária a imunohistoquímica representa especial importância no diagnóstico do melanoma dada a variabilidade na pigmentação e ao pleomorfismo celular. Essa neoplasia pode se assemelhar histologicamente a carcinomas, sarcomas e a neoplasias de células redondas. Uma variedade de anticorpos é utilizada para o diagnóstico de neoplasias melanocíticas em humanos e cães; no entanto, a sensibilidade e a especificidade desses marcadores em cães são controversas [24].

Entre os marcadores imunohistoquímicos melanocíticos utilizados estão S-100, HMB-45, Melan-A, tirosinase [35] e PNL2 [40].

A proteína S-100, um ligante de cálcio, é utilizada como marcador de células com origem em tubo e crista neural e reage com mais de 90% dos melanomas, frequentemente utilizado no diagnóstico desta neoplasia. No entanto, ele também reage com uma série de outras neoplasias não melanocíticas benignas e malignas, incluindo tumores de bainha de nervo periférico e tumores de derivação de adipócitos e condrócitos, limitando sua especificidade [36].

HMB-45 é um marcador mais específico, mas é menos sensível, com a incapacidade de reagir com certos melanomas, especialmente aqueles de células fusiformes e melanomas humanos do subtipo desmoplásico. Orchard (2000) sugere que 25% dos melanomas menos agressivos e 50% dos melanomas metastáticos são negativos para HMB-45, respectivamente [41].

O Melan-A é produto do gene MART-1 e representa uma proteína transmembranar presente em melanossomas expressa em melanócitos maduros. A tirosinase é uma enzima chave na síntese de melanina. Tanto Melan-A quanto a tirosinase são marcadores melanocíticos mais sensíveis do que o HMB-45, embora também possuam sensibilidade reduzida nos melanomas de células fusiformes e melanomas humanos do subtipo desmoplásico [41]. A literatura descreve baixa positividade para Melan-A em melanomas amelanicos caninos, sendo positivos em apenas 47,6% dos casos [42].

PNL2 é um antígeno presente em melanócitos. É utilizado o anticorpo monoclonal como marcador de melanócitos humanos e caninos [43] demonstrando sensibilidade e especificidade superiores ao anticorpo Melan A para a espécie canina [40].

O estadiamento de melanomas de cavidade oral determinado pela Organização Mundial da Saúde (WHO) é baseado no tamanho do tumor e na presença de metástases regionais e a distância. Cães em estágio I possuem tumores menores do que 2 cm de diâmetro, enquanto cães em estágio II e III possuem tumores medindo entre 2 cm e 4 cm, e maiores do que 4 cm, respectivamente. Cães que possuem metástase em linfonodos são classificadas com estágio III, e cães com metástases a distância são classificados como estágio IV [44]

Tanto humanos como cães podem ser tratados inicialmente com cirurgias. Em melanomas cutâneos esta técnica é geralmente curativa e os de mucosa a abordagem cirúrgica deve ser localmente agressivas associada ou não à radioterapia fracionada. A média de sobrevida de cães com melanoma de cavidade oral tratados somente com cirurgia foi de 17 – 18 meses, 5 -6 meses e 3 meses nos estágios I, II e III, respectivamente [45]. Em ambas as espécies são consideradas neoplasias pouco sensíveis à quimioterapia [46, 47]. Além da rápida velocidade de crescimento e alta infiltração local, o que torna o tratamento do melanoma de cavidade oral canino um desafio é o diagnóstico tardio, em estágios avançados, quando a excisão cirúrgica raramente é curativa [24]. Isto se deve, entre outros

fatores, à falta de costume dos tutores e profissionais da área da saúde inspecionar a cavidade oral dos cães.

Dentre os quimioterápicos utilizados para o tratamento melanoma de cavidade oral canino incluem mitoxantrona, melfalan [48] cisplatina [49] e carboplatina [50]. Na maioria dos casos, as taxas de resposta foram baixas e tempo de resposta de curta duração. Para o controle de recidiva local a radioterapia é descrita como uma opção adjuvante a cirurgia [48] e a eletroquimioterapia tem sido cada vez mais utilizada na veterinária por seu custo mais baixo do que a radioterapia [51].

A sobrevida em estágios avançados é baixa. Em humanos, o tempo médio de sobrevida de pacientes com metástase a distância (estágio IV) é menor do que 10 meses e a maioria dos pacientes morrem em decorrência do melanoma [52]. Em cães com doença avançada, o tempo médio de sobrevida é menor do que 5 meses após excisão cirúrgica agressiva [53].

1.3 **TP53**

As alterações encontradas em células cancerosas são tema de inúmeros estudos, e sintetizadas como característica fundamentais do câncer (do inglês, *hallmarks*) nas revisões de Hanahan e Weinberg [54, 55]. Os *hallmarks* do câncer incluem, divisão celular ilimitada, escape de mecanismos de controle (como morte celular, sinais anti-proliferativos), ativação de angiogênese, ganho de capacidade de invadir tecidos e habilidade para escapar da vigilância do sistema imunológico. A célula transformada se beneficia dos mecanismos moleculares já existentes na célula, mas de maneira não controlada, decorrente de alterações genéticas e epigenéticas que além de removerem barreiras contra carcinogênese, também fornecem forte estímulo pró-mitótico. O detalhado entendimento destas alterações pode ser aplicado no desenho de novas terapias direcionadas para alvos específicos (*hallmarks*) da célula tumoral.

O produto do gene *TP53* é um elemento chave da resposta celular contra vários sinais promotores da transformação celular. A proteína p53 impede a proliferação celular dentro de circunstâncias indevidas (estresse), como danos no DNA e ativação de oncogenes. É uma proteína tetramérica que age principalmente como fator de transcrição, coordenando a expressão de genes capazes de regular a progressão do ciclo celular, desde imposição de parada nas fases G1 e G2, indução de senescência, apoptose, autofagia até ação inibitória de angiogênese [56].

Quando as células sofrem agressão, a p53 se acumula no núcleo, onde pode regular os seus alvos de transcrição para induzir os eventos como apoptose e parada do ciclo celular. No entanto, a p53 também pode ter alguma função no citoplasma, promovendo apoptose através de interações proteína-proteína que, como consequência, rompem a membrana mitocondrial [57-59].

A habilidade de p53 de promover morte celular pode estar diretamente ligada a sua função supressora. No início do ciclo mitótico, a proteína p53 ativa transcricionalmente o gene *CDKN1A*, induzindo a síntese da proteína 21 (p21), cuja função é inibir a ação das quinases dependentes de ciclina (CDKs), fazendo com que as células parem na fase G1 do ciclo celular, até que se complete o reparo do DNA [60]. A apoptose dependente de p53 envolve a expressão de genes da via apoptótica mitocondrial, como o PUMA (*p53 up-regulated modulator of apoptosis*) e Bax (*Bcl-2 associated X protein*) [61].

O gene PUMA, também conhecido como BBC3 (*Bcl-2 binding component 3*) é composto de duas regiões transcricionais iniciadoras e codifica quatro RNAs conhecidos: PUMA α , PUMA β , PUMA δ e PUMA γ . Dados da literatura sugerem que PUMA β é transcrito constitutivamente, PUMA α é induzido por *TP53*. As funções de PUMA conhecidas na via de apoptose são antagonizar a função de sobrevivência dos membros da família Bcl-2 e facilitar a translocação de Bax para a mitocôndria desencadeando a cascata de caspases [61, 62].

A proteína p53 mutada foi descoberta em linhagens murinas [63], e a translocação de Bcl-2 (*B-cell leukemia/lymphoma-2*) foi pela primeira vez descrita em linfoma folicular humano [64]. A ativação de *TP53* por estresse pode induzir

diretamente a transcrição de Bax, que por sua vez pode sobrepor os efeitos antiapoptóticos de Bcl-2, além disso, a regulação da razão Bax/Bcl-2 mediada por p53 pode definir a resposta da célula ao estresse.

O equilíbrio intra e extracelular nos eventos de sinalização define se a ativação de *TP53* poupará a célula ou levará à sua morte por apoptose. Quando os sinais de sobrevivência celular estão disponíveis, a ativação de *TP53* levará, provavelmente, à interrupção da progressão do ciclo celular. Na ausência de fatores de sobrevivência adequada, será mais provável que *TP53* conduza à apoptose [65].

Quando o reparo do DNA é finalizado, a proteína p53 é regulada negativamente pelo HDM2 (*human double minute 2*) e mantida em níveis baixos na célula. Em camundongos o gene é denominado MDM2 (*mouse double minute 2*). Na célula normal, a proteína p53 tem sua função supressora de tumor regulada de forma negativa, pelo MDM2 através de três mecanismos: 1) O MDM2 se liga a p53 no seu domínio de transativação N terminal e bloqueia sua capacidade de ativar a transcrição, 2) promove a exportação nuclear de p53 para o citoplasma onde é degradada e 3) o MDM2 funciona como uma ligase E3 de ubiquitina, levando a ubiquitinação e consequente degradação proteossomal de p53 [66, 67]. O estresse fisiológico, como danos no DNA ou hipóxia, sinaliza na direção de preservar e ativar p53. A fosforilação de ambas as proteínas p53 e MDM2, por exemplo, inibe a formação do complexo p53-MDM2 e resulta no acúmulo da proteína p53 [67].

A perda da função da proteína p53 pode ocorrer por alteração genética, interação da proteína p53 com proteínas virais e pela interação da proteína p53 com outras proteínas regulatórias do ciclo celular, como a proteína MDM2.

No câncer, as funções normais de p53 estão bloqueadas devido a mutações genéticas que afetam o próprio gene *TP53* [68] e/ou por alterações no complexo sistema que controla as atividades de p53 [69]. A ação desta proteína depende de interações com outras moléculas (incluindo MDM2, CBP/p300, PTEN, HIF1 α) e também de inúmeras modificações pós-traducionais (fosforilação, acetilação, metilação, entre outras), explicando porque não só a mutação em *TP53*, mas também modificações em moléculas que interagem com p53, podem resultar na

perda da sua função [69]. As formas mutadas da proteína apresentam ainda a capacidade de interagir com a proteína selvagem, impedindo a supressão tumoral.

A mutação mais frequente na p53 do melanoma é a de sentido trocado, na qual a troca de um nucleotídeo por outro resulta em um códon que codifica um aminoácido distinto, e em grande parte, em uma proteína com novas características. Essas mutações ocorrem principalmente entre os codons 120 e 290, situados entre os exons 5 e 9, em humanos, e entre 4 e 8 na espécie canina, e resulta com frequência na transcrição de uma proteína não funcional. Quando a p53 é mutada a estrutura quaternária da proteína p53 é modificada, alterando as posições dos domínios que interagem com MDM2, evitando o processo de degradação. Além disso, a mutação da p53 pode conferir aumento de estabilidade, com consequente aumento de sua meia vida e, ainda, pode determinar ganho de função, geralmente associada ao desenvolvimento do câncer e metástase [29, 33, 70, 71].

Em melanoma, autores sugerem mutação em *TP53* em somente 10% dos casos [72, 73]. Dessa forma, infere-se que outros eventos estão relacionados à inativação da p53 no melanoma, como modificações nos componentes epigenéticos e no perfil de expressão dos miRNAs, uma vez que ambos encontram-se alterados na progressão do melanoma [74]. Além disso, a superexpressão de MDM2 é encontrada em 56% dos casos, criando um desequilíbrio no sistema favorecendo a degradação de p53 [72, 75] e a deleção de ARF (*Alternative reading frame*) em aproximadamente 50% dos casos [76].

1.4 Terapia gênica do melanoma

A ideia de se utilizar patógenos para eliminar células tumorais não é nova. Um dos primeiros relatos é de William B. Coley, em 1891, que obteve sucesso na redução de um tumor inoperável com a inoculação de bactérias do gênero *Streptococcus* [77]. E no início do século 20 com um relato de remissão de leucemia de uma mulher que contraiu uma infecção respiratória (como influenza) [78]. A terapia gênica é o uso de um vetor viral ou não viral para transferir informações

genéticas para uma célula alvo, com objetivo de induzir respostas biológicas benéficas. São muitas as estratégias de terapia gênica para o câncer, que possuem o objetivo comum de inibir e destruir as células tumorais, e podem ser através da utilização de genes pró-apoptóticos, supressores tumorais, ou imuno-moduladores.

A transferência de antígenos tumor específicos/associados e/ou genes imunomoduladores podem contribuir para a geração de uma resposta imunológica contra as células tumorais, atuando como imunoterapia. Um exemplo é a transferência de interferon-beta (IFN β) realizada clinicamente para o tratamento de glioma e melanoma que gerou resultados promissores com menor indução de efeitos adversos [79-82].

Os vírus oncolíticos também representam uma alternativa para imunoterapia a base de vetores virais. Neste caso, a engenharia do vetor adenoviral limita a replicação das células tumorais. A lise destas libera a progênie viral que repete o ciclo. O processo lítico ativa o sistema imunológico adaptativo promovendo a resposta imune anti-tumoral. Além disso, o vetor oncolítico poderia codificar um gene imunomodulador, como o GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) [83, 84]. Recentemente, a associação de vírus oncolítico com inibidores de *checkpoint* tem sido explorada, demonstrando maior ativação de linfócitos citotóxicos e aumento da resposta anti-tumoral [85].

O FDA aprovou em 2015 o primeiro vírus oncolítico para o tratamento de melanomas, o T-VEC, um herpes simplex vírus tipo1 geneticamente modificado. Através da injeção intratumoral, transduz células normais e tumorais, porém só se replica nas células de melanoma produzindo GM-CSF, levando a lise tumoral e liberação de antígenos específicos. Estes são reconhecidos por células apresentadoras de antígenos que ativam as células T levando a resposta imunológica do paciente contra o melanoma [86].

Em trabalhos publicados, temos constatado que a transferência gênica combinando p19ARF e IFN β oferece vantagens para a resposta imune anti-tumoral em modelo murino de melanoma. O uso de IFN β confere uma resposta de perfil citotóxico (TH1), porém somente sua combinação com p19ARF induz uma resposta de células NK (*natural killers*), aumenta sobrevida em modelo de vacina profilática

e reduz progressão tumoral em modelo de vacina terapêutica [3]. Outro trabalho destacou que o tratamento com p19ARF e IFN β promove necroptose incluindo sinais de morte imunogênica, revelando assim, em parte, o mecanismo por trás da resposta promovida pela imunoterapia [87, 88].

Mesmo sendo considerado um tumor imunogênico, ou seja, possui a capacidade de produzir respostas imunológicas adaptativas [89], a biologia do melanoma confere desafios para o seu tratamento através de terapia gênica. Em particular, o elevado potencial metastático do melanoma em fase tardia representa um desses desafios.

1.5. Vetores adenovirais

A administração eficaz de genes terapêuticos a alvos de células tumorais requer um veículo de entrega eficiente. A abordagem atualmente estudada no Laboratório de Vetores Virais (LVV) do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) visa utilizar vetores adenovirais não replicativos para a indução simultânea de morte celular e resposta imune adaptativa.

Os vetores adenovirais são bem conhecidos e amplamente utilizados clinicamente na medicina (utilizados em 547 de 2670 protocolos clínicos em 2017 [90]) devido à facilidade de sua manipulação, alto título viral (10^{11} a 10^{12} partículas virais por mililitro), alta eficiência em realizar transferência gênica intratumoral e não integração no genoma do hospedeiro [91]. A forma mais usual da utilização do transgene (gene terapêutico) é a inserção do gene no vetor na forma de cDNA. O vetor deve conter as sequências regulatórias necessárias para a expressão do material genético, incluindo um promotor (que direciona a transcrição) e um sinal de poliadenilação (que define o sinal do transcrito e encaminha a tradução) [91].

Os vetores virais derivados do adenovirus 5 (Ad5), o mais utilizado na terapia gênica do câncer, interagem com a superfície da célula alvo por ligação ao Receptor Coxsackie e Adenovirus (CAR). O CAR é uma proteína transmembrana expressa

em várias células epiteliais e endoteliais e que media a infecção adenoviral. Células tumorais com diminuição da expressão de CAR têm sido relatadas como resistentes à infecção viral e à terapia gênica mediada por adenovírus e células sem este receptor não são transduzidas por vetores derivados do adenovírus 5 [91].

Estratégias possíveis para aumentar a eficiência da transferência do transgene pelo adenovírus podem ser a utilização de MOIs (do inglês, *multiplicity of infection*) mais altos para alcançar taxas de transdução mais altas, ou seja, maior número de vírus por células. No entanto, o uso de uma alta dose aumenta o risco de efeitos adversos, como reações imunes alérgicas ou reações a componentes do adenovírus [92]. Outra estratégia inclui a modificação do vírus com a inclusão do tripeptídeo RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) que amplia o tropismo do vetor permitindo a transdução de grande grupo de células alvos que expressam integrinas [93]. Estudos demonstram que a inserção do RGD aumentou a transdução gênica mediada por adenovírus em células negativas para CAR, através da ligação do RGD com as integrinas da célula [94].

A estratégia fundamental que foi desenvolvida no LVV é o uso de um vetor adenoviral aprimorado controlado por um promotor responsivo a p53 para dirigir a expressão do transgene contido no vetor viral. Começando com vetores retrovirais, foi mostrado que o promotor responsivo a p53, denominado PG, oferece níveis de expressão do transgene que são até 7 vezes maiores do que visto com o vetor parental (não modificado) [95]. Quando o cDNA para p53 foi inserido neste vetor, um mecanismo de retroalimentação positiva foi estabelecido, o que promove altos níveis de expressão de p53 e proporciona maior inibição de proliferação de células tumorais do que visto com o vetor parental [96]. O conceito do vetor com expressão controlada por p53 foi adaptado para vetores adenovirais. Para isto, foi montado um novo promotor responsivo a p53, denominado PGTx β (ou simplesmente PG) que foi inserido no vetor adenoviral, gerando os vetores AdPG. Foi mostrado que este promotor foi até 5 vezes mais forte do que o promotor do CMV e que podia ser ativado na presença de p53 funcional [97].

Dentro desta estratégia, nosso grupo constatou uma interação significativa entre os genes interferon- β murino (mIFN β) e p19ARF. Células B16 (melanoma de

camundongo) transduzidas com os vetores adenovirais AdPGp19 e AdPGmIFN β morreram dentro de um intervalo de 96 horas. Em ensaios *in vivo* preliminares, este efeito foi reproduzido e os animais com tumores tratados com a combinação p19ARF e mIFN β revelaram redução no tamanho do tumor [98]. Este trabalho com os cDNAs de camundongo foi desenhado cuidadosamente devido à atividade espécie-específica de interferon- β e temos, até agora, utilizado este modelo especificamente para camundongo. Um pedido de patente, que descreve o uso de um vetor deste tipo para terapia gênica do câncer, já foi depositado no INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial, no dia 16/04/2010, P.I. 1.010.481-0).

A plataforma aprimorada do vetor adenoviral AdRGD-PG nunca foi testada em linhagens caninas. Sendo assim, buscando novos modelos de estudo para aproximar estas observações com a realidade clínica, procuramos estabelecer o modelo experimental canino em nosso laboratório para iniciar as etapas de transdução das linhagens e futuramente avaliar a abordagem p19ARF/INF como modelo de terapia gênica.

2. OBJETIVO

Estabelecer linhagens celulares de melanoma canino com capacidade de formar tumores em camundongos *nude*, caracterização de *TP53* e determinar a capacidade de transdução com vetores adenovirais aprimorados.

2.1 Objetivos específicos

- 1) Coleta de amostras de melanoma de cavidade oral canino.
- 2) Estabelecimento de linhagens celulares com capacidade de crescimento *in vitro* e *in vivo* em camundongo Balb/c *nude* (Nu/Nu).
- 3) Sequenciamento dos exons 4 – 8 do *TP53* das linhagens estabelecidas.
- 4) Transdução das linhagens *in vitro* com vetores adenovirais aprimorados com a inserção do tripeptídeo RGD, dirigidos pelos promotores PG ou CMV.
- 5) Utilização de doxorubicina e Nutlin-3 para ativação do promotor PG e de genes da via de p53.

3. MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos conforme o delineamento no esquema da Figura 1. As etapas serão detalhadas ao longo desta dissertação.

Figura 1. Esquema do delineamento experimental do projeto.

3.1. Coleta de amostras

Foram obtidas amostras de tumores de cavidade oral de cães atendidos nas clínicas veterinárias Oncocane – São Paulo (SP) e Dentalpet – São José dos Campos (SP).

Os animais foram submetidos à avaliação clínica e odontológica (Anexo A), exames laboratoriais (hematológicos e bioquímicos) e de imagem (raio x de tórax e ultrassom de abdômen). Nenhum dos cães incluídos no estudo foi submetido à quimioterapia neoadjuvante. A ressecção cirúrgica foi realizada em centro cirúrgico devidamente equipado e os cães foram submetidos à anestesia geral inalatória durante o procedimento. As técnicas cirúrgicas adotadas incluíram mandibulectomia, maxilectomia e biópsia excisional, além da linfadenectomia regional (linfonodo retrofaríngeo e/ou cervical superficial). Em paralelo, uma amostra de sangue periférico também foi colhida para posterior extração de RNA e DNA genômico (gDNA) não tumoral.

Todos os tutores dos animais assinaram o termo de autorização para procedimento cirúrgico (Anexo B), segundo resolução Nº 1071, de 17 de novembro de 2014, Art. 4º III do Conselho Federal de Medicina Veterinária e termo de consentimento de participação em projeto científico (Anexo C).

3.2. Caracterização histopatológica e imunohistoquímica

As dimensões do segmento tumoral foram mensuradas e aproximadamente 50% do volume foi preservado em solução de formaldeído 10%, inserido em bloco de parafina para coloração em Hematoxilina & Eosina (H&E) e classificação histopatológica (melanoma ou melanoma amelanótico) e análise imunohistoquímica com anticorpos para detecção de Melan-A, HMB45 e Tirosinase (coquetel melanoma) e PNL2. A outra metade da amostra foi transportada em meio de cultura

RPMI (Thermo Fisher Scientific), suplementado com 1x concentração final de antibiótico e antimicótico (Antibiotic-Antimycotic, Thermo Fisher Scientific), refrigerado e destinado ao cultivo e crescimento *in vitro*. As análises histopatológicas foram realizadas nos laboratórios veterinários CEVAP (Adamantina – SP) e PROVET (São Paulo – SP) e imunohistoquímicas nos laboratórios VETPAT (Campinas – SP) e Vetmol (Botucatu-SP).

3.3. Cultivo e crescimento *in vitro*

Em cabine de segurança biológica os fragmentos tumorais armazenados em meio de cultura foram transferidos para placa de petri estéreis, pesados e dissociados mecanicamente com lâmina de bisturi. Os fragmentos foram lavados com solução de PBS 1X e recuperados por centrifugação por 5 minutos, 200g. Em seguida digeridos com tripsina 0,25% (Thermo Fisher Scientific) a 37°C durante 30 minutos com agitação contínua. Após esta etapa foi adicionado meio RPMI com 10% SFB (soro fetal bovino) (Thermo Fisher Scientific), para inativar a tripsina, e adicionado liberase 1% (Sigma-Aldrich), 8µl por 100g de tumor para digestão enzimática e mantidos a 37°C em agitação contínua por 30 minutos. As suspensões celulares obtidas foram lavadas com meio RPMI acrescido de 10% de SFB, centrifugadas a 4°C a 200g durante 10 minutos e então transferidas para placa de cultura de 6 poços em meio de cultura RPMI suplementado com 10% de SFB e 1x antibiótico e antimicótico. As placas foram mantidas à 37°C em atmosfera úmida 5% de CO₂. As células foram tripsinizadas quando atingiram 90% de confluência e repassadas para outras placas para manutenção de crescimento. Após 2 a 3 semanas de crescimento em cultura, as células foram tripsinizadas, diluídas em concentração de uma célula por 100µl e semeadas em placa de 96 poços. Foram expandidas somente aquelas que formaram uma única colônia por poço, denominadas TIG, GAB e BAN.

A última cultura celular, denominada MEL, proveniente de linfonodo metastático de melanoma canino, foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Cristina Massoco, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo.

3.3.1. Análise de cinética de crescimento

Células cultivadas em RPMI ou DMEM com 10% SFB foram transferidas para placas de 6 poços em uma concentração inicial média de 5×10^4 células por poço. O número de células viáveis (exclusão com azul de tripan) foi contado em câmara de Neubauer diariamente, até o 3º dia de cultivo. Para o cálculo de geração (tempo necessário para que a população celular dobre em número), também chamado tempo de dobramento, utilizamos as fórmulas descritas abaixo:

$$n = (\log 3,32 X_f/X_i) / t_f-t_i$$

$$g = 1/n$$

Sendo

g = tempo de geração

n = número de gerações por unidade de tempo

X_f = número de células finais

X_i = número de células iniciais

t_f = tempo de cultivo final

t_i = tempo de cultivo inicial

3.4. Crescimento *in vivo*

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP (Aprovação em 23/03/16 – anexo D) para a utilização de camundongos Balb/c *nude* (Nu/Nu), fêmeas, de 6 á 8 semanas de idade.

Para avaliar a capacidade tumorigênica, as células foram ressuspensas em 100 µL de PBS 1X um número total 2×10^6 células e inoculadas, através de agulha, no flanco de camundongos Balb/c *nude* (Nu/Nu), fêmeas, de 6 á 8 semanas de idade, por via subcutânea. Este procedimento foi realizado durante anestesia dissociativa de curta duração (100 mg/kg quetamina e 10 mg/kg xilazina por via intraperitoneal). Esses animais foram monitorados periodicamente e as medidas tumorais aferidas com auxílio de paquímetro digital. O cálculo do volume tumoral foi baseado na fórmula proposta por Steel (1977):

$$V = \frac{D \cdot d^2}{2}$$

onde: V = volume tumoral (mm³);

D = maior diâmetro do tumor;

d = menor diâmetro do tumor.

Após anestesia com Isoflurano (BioChimico) os camundongos foram eutanasiados por inalação de CO₂ e foi realizada a ressecção dos tumores formados. Parte dos tumores foi transportado em meio de cultura RPMI para manutenção do crescimento *in vitro*, conforme descrito no item 3.3, e parte foi fixada com paraformaldeído tamponado 10% por 24 horas, seguido de lavagem com água autoclavada e fixação em álcool 70%. A amostra fixada foi emblocada em parafina e foram confeccionadas lâminas para avaliação histológica (coloração H&E) e análise imunohistoquímica por técnica estreptavidina-biotina-peroxidase, com uso dos anticorpos com diluição e marca conforme descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Anticorpos utilizados na marcação imunohistoquímica dos tumores extraídos de camundongos nude

Anticorpo	Clone	Diluição	Marca
Coquetel Melanoma	HMB45 (Clone HBM45), Melan-A (Clone A103) e Tirosinase (Clone T311)	Puro: Edta	Dako
ki67	MIB-1	1:500	
p53	Pab240	1:1000	
Coquetel Citoqueratinas	Clones AE1/ AE3	1:300	
CD20	L26	1:100	
S100	Z0311	1:1000	
PNL2	PNL2	1:50	Diagnostic BioSystems

3.5 Crescimento Esferoides

Foram selecionadas duas culturas primárias que não apresentaram capacidade tumorigênica em camundongo *nude* para crescimento *in vitro* em 3 dimensões (formação de esferoide) e em seguida, nova tentativa de crescimento *in vivo*. Para isto, as células foram plaqueadas em placa da 60mm e com 80% de confluência foram incubadas overnight com 80 µl de partículas magnéticas (NanoShuttle™ - Greiner Bio-one). No dia seguinte foram tripsinizadas e plaqueadas 2×10^5 destas células em duplicata, com meio RPMI acrescido de 10% de SFB, em placa antiaderente CELLSTAR® (Greiner Bio-one) de 24 poços. Esta foi então posicionada sobre outra placa com imãs e mantida à 37°C em atmosfera úmida 5% de CO₂ por 24 horas. A placa magnética foi então removida e os esferoides foram monitorados por 1 semana. Após este período as esferas foram retiradas com pipeta monocal, transportadas em microtubo com PBS 1X e introduzidas no flanco de camundongo *nude*, através de incisão subcutânea. O procedimento foi realizado sob anestesia, conforme descrito no item 3.4, e os

camundongos foram monitorados por 2 meses para observação da formação de crescimento tumoral.

3.6 Sequenciamento

Os primers utilizados para o sequenciamento dos exons 4, 5, 6, 7 e 8 do gene *TP53* canino, das linhagens estabelecidas, foram desenhados utilizando a plataforma NCBI (National Center for Biotechnology Information) Blast (National Library of Medicine), considerando os critérios de temperatura de anelamento entre 58 e 60°C, porcentagem de bases C-G entre 50 e 70%, com tamanho de 17 até 22 pares de bases, considerando a sequência base NC_006587.3.

Tabela 2 - Primers para reação de PCR e sequenciamento do gene *TP53* canino

Exo n	Nome do primer	Sequência 5' – 3'	Temperatura de anelamento
4	PCR_P53canino_F4	TACTCCCCTCTCCTCAACAAG	59°C
6	PCR_P53canino_F6	GTTGGCTCTGACTATACCACC	59°C
8	PCR_P53canino_R8	CTGAAGGGTGAAATATTCTCC A	59°C

Para a confirmação da presença do gene *TP53* canino no DNA genômico e da especificidade dos primers obtidos foi realizada reações de polimerase em cadeia (PCR) da região entre exon 6 e 8 do gene. O DNA genômico foi extraído a partir de amostra de sangue periférico com o Kit Qiagen DNA Extration, conforme protocolo do fabricante, e a amplificação foi realizada com os primers PCR_P53canino_F6 e PCR_P53canino_R8, descritos na Tabela 2. A confirmação

da amplificação do gene foi obtida pela identificação da banda única em 560 pb em gel de agarose 1%.

A extração de RNA tumoral das linhagens foi realizada utilizando 500 µl de trizol em 5×10^5 células em placa de 35 mm, para romper a membrana das células, e a precipitação por fenol e clorofórmio. O RNA foi ressuspenso em água DEPC (água deionizada, purificada em sistema Milli-Q e tratada com o reagente dietil pirocarbonato) e quantificado por Nanodrop (Thermo Fisher Scientific). A integridade do rRNA foi constatada pela evidência das bandas 28S e 18S, por eletroforese em gel de agarose 1%, e ausência de *smear*. e foram utilizadas somente as amostras que apresentaram razão A260/280nm entre 1.8 e 2.0 obtidas pelo Nanodrop. As amostras foram estocadas em freezer -80°C.

A partir do RNA extraído das linhagens, foi realizada a amplificação da cadeia de DNA complementar (cDNA) por reação de RT-PCR (PCR-transcriptase reversa) utilizando os primers PCR_P53canino_F4 e PCR_P53canino_R8, descritos na tabela 2. Os produtos amplificados obtidos foram confirmados pela presença de banda em gel de agarose 1% em 596 pb.

A reação de sequenciamento foi realizada com o kit BigDye Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific) e foi constituída de Ready Reaction Premix 2,5X 4,0 µL, BigDye Sequencing buffer 5X 2,0 µL, Primer 2,5 pmol/µL 2,0 µL, amostra de DNA (concentração 20 ng/µL) 2,0 µL e água DEPC 10 µL, sendo que em cada amostra foi utilizado um único primer (PCR_P53canino_F4 ou PCR_P53canino_R8). O programa de amplificação utilizado foi 1 ciclo: 96°C por 1 min 30 s; 35 ciclos: 96°C por 18 s, 55°C por 15 s, 59°C por 4 min; Hold: 4°C. Após a reação, os produtos foram precipitados de acordo com o seguinte protocolo: aos 20 µL de reação, adicionou-se 5 µL de EDTA (125mM) e 60 µL de etanol absoluto. Os produtos foram homogeneizados por inversão por 15 s, transferidos para placa MicroAmp® Optical Well 0,1mL (Thermo Fisher Scientific), e a reação incubada por 15 min a temperatura ambiente e protegido da luz. Após incubação, o produto foi centrifugado a 2.173 g por 30 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado (por inversão) e ao precipitado foram adicionados 60 µl de etanol 70%. Em seguida, a placa foi centrifugada a 1.650 g por 15 min. O sobrenadante foi descartado e a placa

centrifugada invertida sobre papel toalha a 185 g por 1 min para secagem. O sequenciamento dos exons 4, 5, 6, 7 e 8 do gene *TP53* canino foi então executado por método Sanger no sequenciador ABI PRISM® 3500 Genetic Analyzer - Applied Biosystems, localizado no Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical – LIM 07- FMUSP.

Os experimentos foram realizados em triplicata técnica e triplicata biológica e os resultados do sequenciamento das quatro linhagens obtidas em formato ab1 foram analisados pelo Software DNASTAR®. As sequências obtidas foram alinhadas com o *TP53* canino na plataforma Blast NCBI.

3.7 Tratamento com doxorrubicina e Nutlin-3

Com intenção de analisar a alteração da morfologia e a proporção de células aderidas e soltas nas diferentes condições de tratamentos, 3×10^5 células das quatro linhagens foram plaqueadas e após 24 horas tratadas com doxorrubicina nas concentrações 0.1, 0.5 e 1 μM , ou com Nutlin-3 nas concentrações de 5, 10 e 20 μM . A análise da morfologia por microscopia em 24, 48 e 72 horas após o tratamento revelou que a quantidade de células destacadas (soltas) e arredondadas foi aumentando pelo aumento da dose de doxorrubicina e do tempo de incubação em comparação aos outras concentrações e tempos. O tratamento com Nutlin-3 nas diferentes concentrações não modificou significativamente a morfologia das células, e na concentração de 20 μM houve aumento da quantidade de células soltas. Na concentração de 0.1 μM de doxorrubicina e na concentração de 10 μM de Nutlin-3 em 48 horas, a proporção de células aderidas foi maior ou igual a 80% em todas as linhagens. Portanto, os tratamentos foram realizados a partir do plaqueamento de 3×10^5 células de cada linhagem em placas de 35 mm, após 24 horas foram lavadas com PBS 1X e adicionado meio de cultura suplementado com 10% de FBS. O tratamento com doxorrubicina consistiu na adição de 0,1 μl do fármaco por ml de

meio de cultura (concentração final 0.1 μM), e o tratamento com Nutlin-3 na adição de 1 μl por ml de meio de cultura (concentração final 10 μM).

3.8 Reação de PCR quantitativa

Para avaliar a intensidade de expressão dos genes *TP53*, *CDKN1A* (p21), *MDM2*, *PUMA*, *Bax*, *Bcl-2* caninos, foram realizadas reações de PCR quantitativa com kit GoTaq® 1-Step RT-qPCR System (Promega) a partir do RNA extraído das quatro linhagens. Como normalizador foram analisados cinco genes: *Bactina*, *GAPDH*, *ATP5*, *RPL32* e *HPRT1*. Após ensaios de validação o gene normalizador selecionado foi o *HPRT1* (hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, variante 1) responsável pela produção da enzima de mesmo nome [99, 100].

O desenho dos primers para estas reações foi baseado nos critérios descritos no item 3.6, de forma que contivessem pelo menos um íntron entre as regiões de hibridização, utilizando como referência os genes conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3 - Primers para PCR quantitativo utilizados em linhagens de melanoma canino.

Gene	Primer (5' – 3')	Temperatura anelamento	Tamanho	Referência
HPRT1	F: AGGACCCCTCGAAGTGTTGGC R: GGGACTCCAGATGCTTCCAAACTCA	59°C	99 pb	NM_001003357.2
p21	F: AAACGGCGGCAGACCAGCAT R: GGTGTAGAAGGGGCCTGGGATGT	59°C	143 pb	XM_532125.6
MDM2	F: GGGCCCCTTCGTGAGAATTG R: GGTGTGGCTTTCTCAGGGATT	59°C	62 pb	NM_001003103.2
PUMA	F: CCAAACGTGACCACTAGCCT R: CCATCAGACCCACCCCATTC	59°C	52 pb	XM_849883.5
Bcl-2	F: CATGCCAAGAGGGAAACACCAGAA R: GTGCTTTGCATTCTTGATGAGG	59°C	76 pb	NM_001002949.1
Bax	F: TTCCGAGTGGCAGCTGAGATGTTT R: TGCTGGCAAAGTAGAAGAGGGCAA	59°C	79 pb	NM_001003011.1
p53	F: GTTGGCTCTGACTATACCACC R: GGAAATTCTCCTCCTCAGTCCG	59°C	196 pb	NM_001003210.1

Para a padronização dos primers realizamos reação de PCR convencional, conforme temperatura de anelamento descrita na Tabela 3, a partir de amostra de cDNA canino. A especificidade dos primers foi confirmada pela presença de banda única em gel de agarose 1% correspondente ao tamanho do produto amplificado do gene analisado.

A curva de eficiência dos primers foi realizada com amostra de RNA extraído de uma das linhagens estabelecidas, conforme protocolo de extração e quantificação descritos no item 3.6. A curva foi feita em duplicata, a partir da concentração 50 ng/μl de RNA, em 4 diluições seriadas de 1:2. As reações foram otimizadas ajustando a quantidade de primer para que cada curva de dissociação gerasse um único pico e que fossem coincidentes na mesma T_m (temperatura de *melting*). A eficiência foi determinada pela seguinte fórmula:

$$\text{Eficiência} = 10(-1/\text{slope}) - 1]$$

sendo *slope* o coeficiente angular da curva padrão, e esta obtida pela regressão linear do valor do ciclo de amplificação C_t (*Cycle threshold*) sobre o log da quantidade inicial de RNA.

Foram consideradas eficientes as reações que apresentaram resultados entre 90 e 110%, cujo coeficiente de correlação (R^2) estivesse próximo à 1.

O nível de expressão dos genes listados na Tabela 3 foi analisado sob condições de tratamento com doxorubicina e Nutlin-3, conforme descrito no item 3.7. Após 48 horas as células foram lavadas com PBS 1X, e a extração de RNA e quantificação foram realizadas conforme descrita no item 3.6.

A análise da expressão gênica sob os tratamentos foi determinada pela seguinte fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta C_t}$$

sendo: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{tratado}) - \Delta Ct(\text{controle})$; e

$\Delta Ct(\text{tratado}) = Ct \text{ gene alvo amostra tratada} - Ct \text{ gene normalizador amostra tratada}$

$\Delta Ct(\text{controle}) = Ct \text{ gene alvo amostra controle} - Ct \text{ gene normalizador amostra controle}$.

As reações foram executadas no equipamento StepOnePlus (Applied BioSystems), os resultados analisados no Software StepOne v2.3 e os cálculos de curva de eficiência, R^2 e $2^{-\Delta\Delta Ct}$ em Excel.

3.9 Transdução das linhagens com vetores adenovirais *in vitro*

As linhagens de melanoma canino estabelecidas com este projeto foram transduzidas com vetores adenovirais portadores de genes *reporters* para revelar sua susceptibilidade a este processo. Utilizamos os vetores AdRGDCMV-LacZ, (sendo Ad5 não replicativo, com a inserção do tripeptídeo RGD na fibra e com promotor CMV controlando a expressão de LacZ), AdRGD-PGeGFP (Ad5 não replicativo e com promotor responsivo a p53 controlando a expressão do *enhanced green fluorescent protein* - eGFP), AdRGDCMVLuc2 e AdRGD-PGLuc2 (Ad5 não replicativo, ambos expressando luciferase).

Para curva de MOI (multiplicidade de infecção), as células foram semeadas em placas de 35 mm, 1×10^5 células por poço, e transduzidas após 24h com várias MOIs de cada vetor, variando entre MOI 15 a 500.

Para os vetores portando Lac Z, após 48h de incubação, o meio foi aspirado do poço, adicionado PBS 1X para lavagem e fixadas a 4 °C por 5 min com 1 ml do fixador (tampão fosfato 0,1 M pH 7,3; 2% paraformaldeído; 0,2% glutaraldeído). Imediatamente após 5 min o fixador foi aspirado, as células foram novamente

lavadas com PBS 1X e foi adicionado 1 ml do corante contendo X-gal (0,1 M fosfato pH 7,3; 2 mM $MgCl_2$; 5 mM $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$; 5 mM $K_3Fe(CN)_6$; X-gal (1 mg/ml). A placa foi protegida da luz e incubada a 37 °C *overnight*. As células que apresentavam coloração azul, consideradas positivas para a transdução, foram contadas com software Image J para análise da porcentagem infectividade em curva de MOI.

Para os vetores portadores de eGFP, após 48 horas de incubação, o meio foi aspirado, as células foram lavadas com PBS 1X, tripsinizadas, centrifugadas e ressuspendidas em 1 ml de PBS 1X. Estas células transduzidas foram avaliadas por citometria de fluxo identificando a porcentagem de células eGFP positivas em cada MOI observando a intensidade da fluorescência.

A expressão da luciferase nos ensaios foi confirmada a partir do lisado celular utilizando kit Luciferase Assay System (Promega) e leitura da luminescência com uso do equipamento VICTOR 3TM 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer) com 0.1 s de exposição, e resultados normalizados por curva de quantificação de proteína a partir de curva padrão de BSA (*Bovine Serum Albumin*).

Para ensaios funcionais, após 24 horas da transdução das linhagens com os vetores AdRGD-PGeGFP, AdRGDCMVLuc2 e AdRGD-PGLuc2, as células foram tratadas com Nutlin-3 ou doxorrubicina, conforme descrito no item 3.7. Após 48h deste tratamento, as células transduzidas com eGFP foram analisadas por citometria de fluxo e as transduzidas com Luc2 analisadas no luminômetro, conforme previamente descrito.

3.10 Ensaio de viabilidade por MTT

Com intenção de testar a toxicidade dos vetores adenovirais nas linhagens caninas, foi realizado ensaio de viabilidade celular por MTT, ensaio colorimétrico para medir a atividade celular de enzimas que reduzem o corante tetrazolium (MTT) em um composto insolúvel de formazam da cor púrpura.

Foram semeadas $2,5 \times 10^3$ células em placas de 96 poços, incubadas por 24 horas, transduzidas com vetor AdRGD-PGeGFP em diferentes MOIs com meio 2% e incubadas por 4 horas. O meio foi então aspirado, adicionado meio de cultura 10% SFB e 10 µl de reagente MTT (5 mg/ml) e as placas mantidas na estufa de CO₂ por 4 horas. Após este período foi adicionado 100 µl por poço de solução de solubilização composta por 20% SDS, 50% DMF e 30% água deionizada em pH 4,7, e as placas incubadas em estufa por 16 horas protegidas da luz.

A leitura foi feita em leitor de ELISA com filtro de absorbância 570 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata técnica e biológica em 24, 48 e 72 horas.

3.11 Verificação de contaminação por Micoplasma

Para verificar se havia contaminação por Micoplasma nas linhagens celulares foi realizada de PCR utilizando primers específicos para *Mycoplasma* sp.

Ao atingirem 70-80% de confluência, foram coletados 1000 µl do meio de cultura das quatro linhagens e centrifugados a 13000g por 6 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 50 µl de tampão LoTE (*Lo89w-Tris EDTA Buffer*) constituído de 3 mM de Tris-HCl, pH 7,5 e 0,2 mM de EDTA. A suspensão resultante foi incubada por 15 min a 95°C para lise das células e a para a extração de DNA. Após a reação de amplificação, as amostras foram incluídas em gel de agarose 1%. Considera-se micoplasma-positiva amostras que apresentam uma banda em 280 bp.

3.12 Análise Estatística

Os resultados apresentados representam a média de cada grupo $\pm$ erro padrão médio e os experimentos realizados em três ensaios independentes (triplicata biológica) e técnica. As análises estatísticas foram feitas pelo software GraphPad Prism 5. Os testes utilizados em cada experimento estão indicados na legenda de cada figura e os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Na Figura 2 estão resumidos os resultados correspondentes às etapas do delineamento experimental, conforme esquema da Figura 1. As etapas serão detalhadas ao longo da dissertação.

Figura 2: Esquema demonstrando resultados do delineamento experimental.

4.1 Coleta de amostras

Oito amostras foram obtidas de tumores de cavidade oral de cães e uma de linfonodo metastático. Seis cães eram machos e três fêmeas, de idades entre 1 e 15 anos, diagnosticados em estágio clínico III ou IV. Os padrões histológicos dos tumores foram classificados em fusiformes, epitelioides ou mistos, sendo este último determinado quando não há predominância entre os subtipos histológicos fusiforme e epitelióide. O diagnóstico é classificado quanto a presença ou ausência de melanina, conforme exibidos na Tabela 4.

Tabela 4 - Características de doadores e de amostras de melanoma canino

Cão				Tumor				
Nº	Raça	Idade	Sexo	Local de coleta	Estadiamento	Estágio clínico	Padrão histológico	Diagnóstico
1	Pastor alemão	10	M	Palato mole	T3N1M1	IV	Misto	Melanoma amelanico
2	Poodle	15	M	Mandíbula	T3N0M0	III	Fusiforme	Melanoma
3	Akita	13	M	Maxila	T3N0M0	III	Misto	Melanoma amelanico
4	Golden retriever	1	F	Maxila	T3N0M0	III	Fusiforme	Melanoma amelanico
5	SRD	15	F	Palato mole	T2N1M1	IV	Epitelióide	Melanoma
6	Poodle	11	M	Maxila	T3N0M0	III	Epitelióide	Melanoma
7	Rottweiler	12	F	Palato mole	T3N0M0	III	Fusiforme	Melanoma
8	SRD	7	M	Mandíbula	T3N1M0	III	Fusiforme	Melanoma amelanico
9	SRD	12	M	Linfonodo cervical superficial	T3N1M1	IV	Epitelióide	Melanoma melânico

Número de identificação da amostra, raça, idade em anos e sexo dos cães doadores de melanoma de cavidade oral (F = fêmea, M = macho; SRD = sem raça definida). Características do tumor extraído sendo local de coleta a região de onde foram extraídos os tumores; estadiamento da doença e estágio clínico segundo a classificação da

Organização Mundial da Saúde (OMS); padrão histológico das células tumorais classificadas como epitelioides, fusiformes ou misto, quando apresentam as duas morfologias; e diagnóstico do melanoma quanto à presença de melanina.

4.2. Cultura primária

Das nove amostras coletadas e submetidas ao cultivo *in vitro*, sete delas apresentaram adesão à placa e crescimento em monocamada, no entanto, uma destas (amostra n.º 6) apresentou crescimento em pilha e perda de aderência à placa após a décima passagem, limitando a manutenção de seu crescimento. As duas culturas que inicialmente não aderiram à placa (amostras n.º 7 e 8) apresentaram evidências de contaminação bacteriana, sendo possivelmente o limitador da manutenção do crescimento.

As culturas primárias demonstraram crescimento em morfologia predominantemente fusiforme, com arranjos em feixes ou em redemoinhos. Algumas células apresentaram prolongamentos dendríticos e foi possível observar algumas áreas com células epitelioides arranjadas em ninhos. A presença de pigmento acastanhado (melanina) foi observada até a quinta passagem nas culturas primárias de amostras dos cães n.º 2 e 5, cujas análises histológicas originalmente confirmavam a presença de melanina (melanomas melânicos). As demais não apresentaram evidências deste pigmento. A cultura primária obtida da amostra n.º 9 foi gentilmente cedida pela profa. Dra. Cristina Massoco, docente da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo. A coleta foi realizada a partir de linfonodo cervical superficial metastático de melanoma em mandíbula, e em cultura, manteve a produção de melanina durante toda duração do projeto.

As culturas das amostras 1 a 6 foram mantidas em meio RPMI com 10% de SFB e a amostra 9 em meio DMEM com 10% de SFB.

4.3. Crescimento tumoral *in vivo*

A inoculação de células de cultura primária no flanco de camundongos Balbc *nude* não resultou em crescimento tumoral durante período de observação de 2 meses, com exceção da amostra n. 9. As demais células mantidas em monocamada foram então tripsinizadas, ressuspensas em meio RPMI com SFB 10%, diluídas em concentração de 1 célula por 100 μ l e cultivadas isoladamente em placa de 96 poços. Os clones selecionados e expandidos, para posterior crescimento *in vivo*, foram aqueles em que uma única célula foi visualizada inicialmente, que formaram uma única colônia por poço e que apresentaram alta proliferação na colônia. As células mantiveram em cultivo *in vitro* morfologia predominantemente fusiforme, com exceção do cultivo na amostra n. 2, que apresentou morfologia epitelióide.

A inoculação de 2×10^6 células subclonadas no flanco dos camundongos resultou no crescimento tumoral de 6 clones, sendo cada tumor proveniente de um único clone. As culturas provenientes das amostras n.º 4 e 5 não foram capazes de formar tumor em camundongo *nude* por nenhum dos clones selecionados, conforme demonstrado na Tabela 5. A cultura celular obtida a partir da amostra n.º 9, por ter apresentado capacidade tumorigênica, não foi subclonada.

Tabela 5 - Características dos clones celulares estabelecidos a partir de melanoma canino

Nº	Clone	Morfologia ^a	Melanina ^a	Tumorigênica ^b
1	TIG G2	Fusiforme	Ausente	Sim
2	GAB F6	Epitelioide	Presente até a 5º passagem	Sim
	GAB G9	Epitelioide		Sim
3	BAN C10	Fusiforme	Ausente	Sim
	BAN C9	Fusiforme		Sim
	BAN B9	Fusiforme		Sim
4	SARA D10	Fusiforme	Ausente	Não
	SARA G9	Fusiforme		Não
	SARA G6	Fusiforme		Não
5	PEP G9	Fusiforme	Presente até a 5º passagem	Não
	PEP E7	Fusiforme		Não
	PEP D9	Fusiforme		Não

a: Observada em cultura primária. b: Observada em camundongos *nude* após injeção s.c. de 2×10^6 células. (Nº= número de identificação da amostra de acordo com Tabela 4).

Quanto ao crescimento *in vivo*, a cultura primária originada do clone BAN C10 produziu tumor palpável 17 dias após a inoculação, com evidência de tumor de consistência firme, formato regular e não aderido à planos profundos. As culturas GAB F6, TIG G2 e MEL apresentaram crescimento tumoral após 21 dias de inoculação, resultando em tumor de consistência firme, formato regular e aderido à musculatura adjacente. O tumor proveniente da cultura MEL foi o único que preservou coloração acastanhada na análise macroscópica. Os camundongos foram eutanasiados quando o volume tumoral se aproximava de 1000mm^3 ou em decorrência da ulceração do tumor. A curva de crescimento demonstrada na Figura 3 representa o volume tumoral medido e calculado ao longo dos dias, obtida em único ensaio para observação da formação ou não de tumores.

Após eutanásia dos camundongos os tumores foram extraídos. Metade do tumor foi fixado em paraformaldeído 4% para análise histológica e imunohistoquímica e o restante foi cultivado *in vitro* para ensaios subsequentes.

Figura 3 - Curva de crescimento *in vivo* de melanoma canino. Culturas primárias obtidas a partir de melanoma de cavidade oral de 4 cães foram cultivadas *in vitro* e 2×10^6 células de cada cultura foram inoculadas no flanco de camundongos Balb/c *nude*. Com auxílio de paquímetro foram mensuradas 2 dimensões tumorais para cálculo do volume tumoral ao longo dos dias de observação. Cada curva se deriva da mensuração de um tumor formado em um único camundongo.

4.3.1. Crescimento 3D

As culturas primárias que não apresentaram crescimento *in vivo*, foram cultivadas em sistema de levitação magnética para crescimento em três dimensões e cada esferoide formado foi inoculado em flanco de camundongo *nude*.

O esferoide da Figura 4A foi formado por 2×10^5 células provenientes do clone SARA G9, descrito na Tabela 5. O esferoide da Figura 4B foi formado por 2×10^5 células do pool de células do tumor primário (sem selecionar os clones) da amostra n.º 5, descrito na Tabela 4. Ambos os esferoides apresentaram conformação

tridimensional após 48 horas do plaqueamento. A esfera formada pelo pool de células da amostra n.º 5 apresentou deposição de material fibrinoso ao redor da estrutura, possivelmente produzidos por outros tipos celulares como fibroblastos provenientes do tumor primário. Os esferoides apresentaram diâmetros médios de 800 µm e mantiveram a conformação tridimensional em placa antiaderente durante 4 semanas, tempo do monitoramento do ensaio.

Cada esferoide formado foi introduzido no flanco de camundongo *nude*, porém nenhum deles foi capaz de produzir crescimento tumoral durante o período de observação de 2 meses.

Figura 4 - Esferoides formados por cultura primária de melanoma de cavidade oral canino. Foram plaqueadas 2×10^5 células magnetizadas com partículas reagentes NanoShuttle™ em placas de cultura celular antiaderente (CELLSTAR®). A placa foi posicionada sob imã magnético por 4 horas e depois reposicionada acima do imã por 24 horas. (A) Esferoide formado por clone celular de cultivo primário de melanoma de cavidade oral canino (SARA G9). (B) Esferoide formado cultura celular primária de melanoma de cavidade oral canino (cultura primária, amostra n. 5). Imagens obtidas em microscópio de fluorescência (EVOS FL) após 72 horas do plaqueamento.

4.4. Caracterização molecular

Amostras dos tumores extraídos dos camundongos foram analisados por histologia, demonstrando que os tecidos mantiveram marcadas anisocitose, anisocariose e figuras de mitose atípicas que variaram de moderadas à intensas. Para confirmar a preservação de marcadores melanocíticos os tumores foram analisadas por marcação imunohistoquímica com anticorpos anti-coquetel melanoma (HMB45, Tirosinase e Melan-A), S100 e PNL2. Nesta análise, o tumor proveniente do clone GAB F6 apresentou marcação positiva para coquetel melanoma e S100 (Figura 5A e 5C, respectivamente), o tumor proveniente do clone BAN C10 demonstrou positividade para S100 (Figura 5B) e MEL apresentou marcação positiva para PNL2 e coquetel melanoma (Figura 6A e 6B, respectivamente). Como controle negativo, omitiu-se o anticorpo primário, não sendo evidenciada nenhuma marcação nos casos avaliados.

Marcadores diferenciais CD20 e citoqueratinas (AE1/AE3), para marcação de para linfócitos B e células de origem epitelial, respectivamente, foram negativas em todos os tumores analisados, assim como a presença da proteína p53. Já o marcador de proliferação nuclear Ki-67 foi fortemente positivo (++++) em todos os tumores analisados, com exceção do tumor proveniente do clone BAN B9 que mostrou fraca positividade (+). Resultados de marcação imunohistoquímica estão resumidos na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultado da marcação imunohistoquímica dos tumores provenientes de cultura primária de melanoma canino

Anticorpo Amostra	Ki-67	S100	Coquetel Melanoma	CD20	Coquetel Citoqueratina	p53	PNL2
TIG G2	++++	-	-	-	-	-	-
GAB F6	++++	+	+	-	-	-	NA
GAB G9	++++	-	-	-	-	-	NA
BAN C10	++++	+	-	-	-	-	-
BAN C9	++++	-	-	-	-	-	NA
BAN B9	+	-	-	-	-	-	NA
MEL	NA	NA	+	NA	NA	-	+

(Resultado positivo representado por “+” e negativo “-” conforme determinado pelo serviço de patologia. Ki-67 representado por intensidade de marcação. NA = Não avaliado.)

Figura 5 - Marcação imunohistoquímica de melanoma canino. Células de melanoma canino foram inoculadas por via subcutânea no flanco de camundongos nude. Os tumores foram extraídos e realizada marcação imunohistoquímica das proteínas S100, Ki-67 e coquetel melanoma. (A) Corte histológico tumoral proveniente da linhagem GAB F6 apresentando marcação citoplasmática positiva para coquetel melanoma em células epitelioides, (B) Corte histológico tumoral proveniente da linhagem BAN C10 apresentando marcação nuclear positiva para S100 em células fusiformes. (C) Corte histológico tumoral proveniente da linhagem GAB F6 positivos para S100 apresentando marcação nuclear e morfologia epitelióide. (D) Corte histológico tumoral proveniente da linhagem TIG G2 apresentando marcação nuclear positiva para Ki-67 em células fusiformes. Aumento 20x.

A cultura celular MEL, proveniente de linfonodo metastático, foi tripsinizada, centrifugada na presença de álcool 70%, ressuspensa em agarose líquida 2% e

parafinizada para posterior processamento histológico. Esta técnica, conhecida como *cell block*, foi realizada pelo laboratório de patologia da FMVZ (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia) da USP (Universidade de São Paulo) para subsequente marcação por técnica de imunohistoquímica. Os anticorpos PNL2 e Coquetel melanoma foram positivos nesta cultura (Figura 6).

Figura 6 - Marcação imunohistoquímica de cultura celular de melanoma canino. Foi extraído o linfonodo cervical superficial metastático de cão com melanoma primário de cavidade oral e estabelecido cultivo celular primário com meio DMEM e 10 % SFB (soro fetal bovino). As células foram fixadas, ressuspensas e preparados *cell block* e revelaram: **(A)** Marcação imunohistoquímica positiva para PNL2; **(B)** Marcação imunohistoquímica positiva para Coquetel Melanoma. A técnica foi realizada pelo laboratório de Patologia VetMol (Botucatu – SP).

Das sete amostras representadas na Tabela 6, optou-se por realizar os ensaios subsequentes com as quatro linhagens estabelecidas provenientes da amostra MEL e dos clones BAN C10, GAB F6 e TIG G2, denominadas então MEL, BAN, GAB e TIG, respectivamente.

4.5. Estabelecimento de linhagens tumorais

Os tumores extraídos dos camundongos foram reestabelecidos em cultura, e após aproximadamente 3 semanas da manutenção das linhagens em placa de cultura, não foram mais identificados visualmente fibroblastos provenientes do camundongo. As linhagens mantiveram a morfologia e padrão de crescimento semelhantes às da cultura inicial. Todos os ensaios subsequentes foram realizados entre as passagens 25 e 40 das linhagens.

Para avaliar o crescimento *in vitro*, 5×10^4 células foram semeadas em placa de 24 poços. Foram então tripsinizadas, ressuspensas e contadas em câmara de Neubauer 24, 48 e 72 horas após o plaqueamento. A linhagem TIG revelou menor tempo de dobramento apresentando 28,7 horas para que as células dobrem em número. A linhagem BAN apresentou 36,2 horas de tempo de dobramento, GAB 31,4 horas e MEL 40,9 horas. A curva de crescimento na Figura 7 demonstra o número de células ao longo do tempo das quatro linhagens.

Até a passagem 80 as quatro linhagens estabelecidas não apresentaram vacuolização citoplasmática, perda de aderência ou alterações morfológicas relacionadas a perda de viabilidade e morte celular.

Figura 7 - Curva de crescimento *in vitro* das linhagens BAN, TIG, GAB e MEL de melanoma canino. Foram semeadas 5×10^4 células das linhagens de melanoma canino em placa de 24 poços, tripsinizadas, ressuspensas em meio de cultura e submetidas a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer em 24, 48 e 72 horas após o cultivo. O resultado representa a média das contagens de cada linhagem $\pm$ erro padrão médio em ensaios realizados em 3 experimentos independentes em triplicata técnica.

4.6. Sequenciamento dos exons 4 – 8 de *TP53* canino

O RNA total das quatro linhagens foi extraído utilizando trizol e precipitado com isopropanol e clorofórmio. O cDNA correspondente aos exons 4 – 8 do gene *TP53* canino foi gerado utilizando os primers PCR_P53canino_F4 e PCR_P53canino_R8 descritos na Tabela 2. O sequenciamento foi realizado por método Sanger e os resultados obtidos foram analisados no software DNASTAR® (SeqMan Pro).

As sequências consenso do cDNA das linhagens geradas pelo software foram confirmadas pela análise do cromatograma, de forma com que cada base de nucleotídeo fosse determinada por um pico único e que coincide com o alinhamento em todas as amostras. A Figura 8 apresenta um exemplo de um segmento dos cromatogramas obtidos da linhagem GAB. Os ensaios foram realizados em triplicata técnica e duplicata biológica.

Figura 8 - Cromatograma do sequenciamento e segmento da sequência consenso do *TP53* da linhagem de melanoma canino GAB. A partir de RNA foi amplificado o DNA complementar (cDNA) dos exons 4 – 8 do gene *TP53* da linhagem GAB de melanoma canino. A reação de sequenciamento foi realizada por método Sanger e os resultados analisados em Software DNASTAR® (SeqMan Pro). Cada pico representa um par de base (A, T, C ou G) gerando uma sequência única (consenso).

A sequência consenso de cada linhagem foi comparada por alinhamento global, no banco de dados da plataforma Blast (NCBI), com a do *TP53* canino NM_001003210.1 (*Canis lupus familiaris* tumor protein p53 (*TP53*), mRNA), demonstrando 100% de complementariedade nas quatro linhagens (Figura 9).

BAN consensus

Sequence ID: Query_81927 Length: 600 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 600 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1109 bits(600)	0.0	600/600(100%)	0/600(0%)	Plus/Plus

Query 364 CCTCAACAAGTTGTTTGGCAGCTGGCGAAGACCTGCCCGTGACGCTGTGGGTGACGCTC 423
 Sbjct 1 CCTCAACAAGTTGTTTGGCAGCTGGCGAAGACCTGCCCGTGACGCTGTGGGTGACGCTC 60

Query 424 CCCACCCCCCAACATCTGCGCTCCGCGCTATGGCCATCTATAAGAAAGTCGGAGTTGCT 483
 Sbjct 61 CCCACCCCCCAACATCTGCGCTCCGCGCTATGGCCATCTATAAGAAAGTCGGAGTTGCT 120

Query 484 GACCGAGGTTGTGGCGGCTGCCCCACCATGAACGCTGCTCTGACAGTAGTGACGGTCT 543
 Sbjct 121 GACCGAGGTTGTGGCGGCTGCCCCACCATGAACGCTGCTCTGACAGTAGTGACGGTCT 180

Query 544 TGCCCCCTCTCAGCATCTCATCTGAGTGGAAAGAAATTTGCGGGCAGAGTACCTGGACGA 603
 Sbjct 181 TGCCCCCTCTCAGCATCTCATCTGAGTGGAAAGAAATTTGCGGGCAGAGTACCTGGACGA 240

Query 604 CAGAAACACTTTTGCACACAGTGTGGTGGTCTTATGAGCCACCCGAGGTTGGCTCTGA 663
 Sbjct 241 CAGAAACACTTTTGCACACAGTGTGGTGGTCTTATGAGCCACCCGAGGTTGGCTCTGA 300

Query 664 CTATACCAACATCACTACAACATACATGTGTAAACAGTTCCTGCATGGGAGGACATGAACCG 723
 Sbjct 301 CTATACCAACATCACTACAACATACATGTGTAAACAGTTCCTGCATGGGAGGACATGAACCG 360

Query 724 GCGGCCCATCTCTCACTATCATCAACCTGGGAAGACTCCAGTGGAAACGCTCTGGGACGCA 783
 Sbjct 361 GCGGCCCATCTCTCACTATCATCAACCTGGGAAGACTCCAGTGGAAACGCTCTGGGACGCA 420

Query 784 CAGCTTTGAGTACGCGTTTGTGCTCTCCGGGAGAGACCCGGCAGCTGAGGAGGAGAA 843
 Sbjct 421 CAGCTTTGAGTACGCGTTTGTGCTCTCCGGGAGAGACCCGGCAGCTGAGGAGGAGAA 480

Query 844 TTTCCAAAGAGGGGAGACCTTGTCTTGAGCCACCCCGGAGATCCAAAGCGAGCACT 903
 Sbjct 481 TTTCCAAAGAGGGGAGACCTTGTCTTGAGCCACCCCGGAGATCCAAAGCGAGCACT 540

Query 904 GCCTCCAGCACCAGCTCCTCTCCCCGCAAAAGAAAGCCACTAGATGGAGAATATTT 963
 Sbjct 541 GCCTCCAGCACCAGCTCCTCTCCCCGCAAAAGAAAGCCACTAGATGGAGAATATTT 600

GAB consensus

Sequence ID: Query_140153 Length: 620 Number of Matches: 1

Range 1: 2 to 619 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1142 bits(618)	0.0	618/618(100%)	0/618(0%)	Plus/Minus

Query 357 CCCCTCTCTCTCAACAAGTTGTTTGGCAGCTGGCGAAGACCTGCCCGTGACGCTGTGGG 416
 Sbjct 619 CCCCTCTCTCTCAACAAGTTGTTTGGCAGCTGGCGAAGACCTGCCCGTGACGCTGTGGG 560

Query 417 TCAGCTCCCCACCCCCCAACATCTGCGCTCCGCGCTATGGCCATCTATAAGAAAGTCGG 476
 Sbjct 559 TCAGCTCCCCACCCCCCAACATCTGCGCTCCGCGCTATGGCCATCTATAAGAAAGTCGG 500

Query 477 AGTTCTGTGACCGAGGTTGTGGCGGCTGCCCCACCATGAACGCTGCTCTGACAGTAGTG 536
 Sbjct 499 AGTTCTGTGACCGAGGTTGTGGCGGCTGCCCCACCATGAACGCTGCTCTGACAGTAGTG 440

Query 537 ACGGTCTTGCCCCCTCTCAGCATCTCATCCGAGTGGAAAGAAATTTGCGGGCAGAGTACC 596
 Sbjct 439 ACGGTCTTGCCCCCTCTCAGCATCTCATCCGAGTGGAAAGAAATTTGCGGGCAGAGTACC 380

Query 597 TGGACGACAGAAACACTTTTGCACACAGTGTGGTGGTCTTATGAGCCACCCGAGGTTG 656
 Sbjct 379 TGGACGACAGAAACACTTTTGCACACAGTGTGGTGGTCTTATGAGCCACCCGAGGTTG 320

Query 657 GCTCTGACTATACCAACATCCACTACAACATACATGTGTAAACAGTTCCTGCATGGGAGCA 716
 Sbjct 319 GCTCTGACTATACCAACATCCACTACAACATACATGTGTAAACAGTTCCTGCATGGGAGCA 260

Query 717 TGAACCGGCGGCCCATCTCTCACTATCATCAACCTGGGAAGACTCCAGTGGAAACGCTGG 776
 Sbjct 259 TGAACCGGCGGCCCATCTCTCACTATCATCAACCTGGGAAGACTCCAGTGGAAACGCTGG 200

Query 777 GACCGAACAGCTTTTGAAGTACGCGTTTGTGCTCTGTCGGGAGAGACCCGGGAGCTAGG 836
 Sbjct 199 GACCGAACAGCTTTTGAAGTACGCGTTTGTGCTCTGTCGGGAGAGACCCGGGAGCTAGG 140

Query 837 AGGGAATTTTCCACAAGAGGGGGAGGCTTGTCTGAGCCACCCCGGGAGTACCAAGC 896
 Sbjct 139 AGGGAATTTTCCACAAGAGGGGGAGGCTTGTCTGAGCCACCCCGGGAGTACCAAGC 90

Query 897 GAGCACTGCTCCCAAGCAGCAGCTCTCTCCCGGCAAAAGAGGACCACTAGATGGAG 956
 Sbjct 79 GAGCACTGCTCCCAAGCAGCAGCTCTCTCCCGGCAAAAGAGGACCACTAGATGGAG 20

Query 957 AATATTTTCAACCTTCAGA 974
 Sbjct 19 AATATTTTCAACCTTCAGA 2

TIG CONSENSO

Sequence ID: Query_81929 Length: 622 Number of Matches: 1

Range 1: 7 to 622 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1138 bits(616)	0.0	616/616(100%)	0/616(0%)	Plus/Plus

Query 353 TACTCCCCCTCTCTCAACAAGTTGTTTGGCAGCTGGCGAAGACCTGCCCGTGACGCTG 412
 Sbjct 7 TACTCCCCCTCTCTCAACAAGTTGTTTGGCAGCTGGCGAAGACCTGCCCGTGACGCTG 66

Query 413 TGGGTCAGCTCCCCACCCCCCAACATCTGCGCTCCGCGCTATGGCCATCTATAAGAAAG 472
 Sbjct 67 TGGGTCAGCTCCCCACCCCCCAACATCTGCGCTCCGCGCTATGGCCATCTATAAGAAAG 126

Query 473 TCGGAGTCTGTGACCGAGGTTGTGGCGGCTGCCCCACCATGAACGCTGCTCTGACAGT 532
 Sbjct 127 TCGGAGTCTGTGACCGAGGTTGTGGCGGCTGCCCCACCATGAACGCTGCTCTGACAGT 186

Query 533 AGTGACGGTCTTGCCCCCTCTCAGCATCTCATCGAGTGGAAAGAAATTTGCGGGCCAAG 592
 Sbjct 187 AGTGACGGTCTTGCCCCCTCTCAGCATCTCATCGAGTGGAAAGAAATTTGCGGGCCAAG 246

Query 593 TACCTGGACGACAGAAACACTTTTGCACACAGTGTGGTGGTCTTATGAGCCACCCGAG 652
 Sbjct 247 TACCTGGACGACAGAAACACTTTTGCACACAGTGTGGTGGTCTTATGAGCCACCCGAG 306

Query 653 GTTGGCTCTGACTATACCAACATCACTACAACATACATGTGTAAACAGTTCTCTGAGGGA 712
 Sbjct 307 GTTGGCTCTGACTATACCAACATCACTACAACATACATGTGTAAACAGTTCTCTGAGGGA 366

Query 713 GGCATGAACCGCGGCCCATCTCACTATCATCACTCCGGAAGACTCCAGTGGAAAGCTG 772
 Sbjct 367 GGCATGAACCGCGGCCCATCTCACTATCATCACTCCGGAAGACTCCAGTGGAAAGCTG 426

Query 773 CTGGGAGCACAAGCTTTGAGGTACGCGTTTGTGCTCTCCGGGAGAGACCCGGAGCT 832
 Sbjct 427 CTGGGAGCACAAGCTTTGAGGTACGCGTTTGTGCTCTCCGGGAGAGACCCGGAGCT 486

Query 833 GAGGAGGAGAAATTTCCACAAGAGGGGGAGGCTTGTCTGAGCCACCCCGGGAGTACC 892
 Sbjct 487 GAGGAGGAGAAATTTCCACAAGAGGGGGAGGCTTGTCTGAGCCACCCCGGGAGTACC 546

Query 893 AAGCGAGCACTGCTCCGAGCAGCAGCTCTCTCCCCGCAAAAGAAAGCACTAGAT 952
 Sbjct 547 AAGCGAGCACTGCTCCGAGCAGCAGCTCTCTCCCCGCAAAAGAAAGCACTAGAT 606

Query 953 GGAGAAATATTTCAACC 968
 Sbjct 607 GGAGAAATATTTCAACC 622

MEL consensus

Sequence ID: Query_190203 Length: 627 Number of Matches: 1

Range 1: 9 to 626 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1142 bits(618)	0.0	618/618(100%)	0/618(0%)	Plus/Plus

Query 357 CCCCTCTCTCTCAACAAGTTGTTTGGCAGCTGGCGAAGACCTGCCCGTGACGCTGTGGG 416
 Sbjct 9 CCCCTCTCTCTCAACAAGTTGTTTGGCAGCTGGCGAAGACCTGCCCGTGACGCTGTGGG 68

Query 417 TCAGCTCCCCACCCCCCAACATCTGCGCTCCGCGCTATGGCCATCTATAAGAAAGTCGG 476
 Sbjct 69 TCAGCTCCCCACCCCCCAACATCTGCGCTCCGCGCTATGGCCATCTATAAGAAAGTCGG 128

Query 477 AGTTCTGTGACCGAGGTTGTGGCGGCTGCCCCACCATGAACGCTGCTCTGACAGTAGTG 536
 Sbjct 129 AGTTCTGTGACCGAGGTTGTGGCGGCTGCCCCACCATGAACGCTGCTCTGACAGTAGTG 188

Query 537 ACGGTCTTGCCCCCTCTCAGCATCTCATCCGAGTGGAAAGAAATTTGCGGGCAGAGTACC 596
 Sbjct 189 ACGGTCTTGCCCCCTCTCAGCATCTCATCCGAGTGGAAAGAAATTTGCGGGCAGAGTACC 248

Query 597 TGGACGACAGAAACACTTTTGCACACAGTGTGGTGGTCTTATGAGCCACCCGAGGTTG 656
 Sbjct 249 TGGACGACAGAAACACTTTTGCACACAGTGTGGTGGTCTTATGAGCCACCCGAGGTTG 308

Query 657 GCTCTGACTATACCAACATCCACTACAACATACATGTGTAAACAGTTCCTGCATGGGAGGCA 716
 Sbjct 309 GCTCTGACTATACCAACATCCACTACAACATACATGTGTAAACAGTTCCTGCATGGGAGGCA 368

Query 717 TGAACCGGCGGCCCATCTCTCACTATCATCAACCTGGGAAGACTCCAGTGGAAAGCTGCTGG 476
 Sbjct 369 TGAACCGGCGGCCCATCTCTCACTATCATCAACCTGGGAAGACTCCAGTGGAAAGCTGCTGG 428

Query 777 GACCGAACAGCTTTGAGGTACGCGTTTGTGCTCTGTCGGGAGAGACCCGGGAGCTAGG 836
 Sbjct 429 GACCGAACAGCTTTGAGGTACGCGTTTGTGCTCTGTCGGGAGAGACCCGGGAGCTAGG 488

Query 837 AGGGAATTTTCCACAAGAGGGGGAGGCTTGTCTGAGCCACCCCGGGAGTACCAAGC 896
 Sbjct 489 AGGGAATTTTCCACAAGAGGGGGAGGCTTGTCTGAGCCACCCCGGGAGTACCAAGC 548

Query 897 GAGCACTGCTCCCAAGCAGCAGCTCTCTCCCGGCAAAAGAGAGGACCACTAGATGGAG 956
 Sbjct 549 GAGCACTGCTCCCAAGCAGCAGCTCTCTCCCGGCAAAAGAGAGGACCACTAGATGGAG 608

Query 957 AATATTTTCAACCTTCAGA 974
 Sbjct 609 AATATTTTCAACCTTCAGA 626

Figura 9 - Alinhamento global do *TP53* com as linhagens de melanoma canino. O cDNA de exons 4 – 8 do gene *TP53* obtido das linhagens BAN, GAB, TIG e MEL de melanoma canino foi sequenciado por método Sanger. O quadro superior da figura demonstra representação esquemática da posição do alinhamento das sequências obtidas com o *TP53* canino (*Canis lupus familiaris*), do banco de dados NCBI, no programa BLASTN 2.8.0. As quatro figuras inferiores demonstram o alinhamento das bases revelando 100% de homologia com o *TP53* canino.

4.7. Transdução com vetores adenovirais

Para determinar a capacidade de transdução das linhagens estabelecidas, as células foram transduzidas pelo vetor AdRGDCMV_{LacZ}, que codifica o gene *reporter* beta-galactosidase, com MOI de 15, 25, 20, 100 e 200 e após 48 horas de incubação as células foram fixadas e coradas com X-gal (Figura 10).

Figura 10 - Transdução de linhagens de melanoma canino com o vetor AdRGDCMVlacZ. Linhagens BAN, GAB, TIG e MEL foram plaqueadas, transduzidas pelo vetor AdRGDCMVlacZ em MOI de 15, 25, 50, 100 e 200, mantidas em cultura por 48 horas e então fixadas para ensaio de β -galactosidase (produto do gene LacZ). Todos os poços tiveram 7 campos fotografados e as células positivas para a atividade de β -galactosidase contadas com auxílio do programa Image J. **(A)** Porcentagem média de células positivas para a atividade de β -galactosidase em diferentes MOIs. **(B)** Campo fotografado representando as linhagens transduzidas em MOI 50 demonstrando a cor azul nas células transduzidas após coloração com x-gal. O controle demonstrado representa células da linhagem BAN não transduzidas.

Os resultados revelam que as quatro linhagens possuem capacidade de serem transduzidas com vetor AdRGDCMVlacZ e que a partir do MOI de 25 mais de 50% das células expressaram o transgene. Pelo exposto, as células caninas são susceptíveis a transdução utilizando o vetor adenoviral com modificação RGD e que o promotor constitutivo, CMV, não foi associado a variações em atividade do gene repórter.

Pelo exposto na Figura 11, a eficiência de transdução parece ser variada quando foi utilizado o vetor AdRGD-PGeGFP que emprega o promotor responsivo a p53 para direcionar expressão do transgene. No MOI de 50 a linhagem TIG demonstrou positividade para atividade do gene *reporter* em aproximadamente 80%, enquanto GAB próximo a 60%. Já as linhagens BAN e MEL apresentaram aproximadamente 40% de células eGFP-positivas. A variação de células positivas para eGFP talvez não deriva da eficiência de transdução, mas sim da expressão do transgene em diferentes níveis devido ao uso de promotor PG, um assunto explorado em mais detalhe no tópico 4.9.

Figura 11 - Transdução de linhagens de melanoma canino com o vetor AdRGD-PGeGFP. Células das linhagens BAN, TIG, GAB e MEL foram plaqueadas, transduzidas pelo vetor AdRGDPGeGFP com MOI de 25, 50, 100, 200 e 500 e incubadas por 48 horas. Análise da quantidade de células positivas para eGFP foi realizada por citometria de fluxo. **(A)** Dados representam a porcentagem média de células eGFP positivas em diferentes MOIs **(B)** Representação de imagem obtida em microscópio de fluorescência (EVOS FL) em MOI de 100 em diferentes linhagens, demonstrando fluorescência verde. O controle demonstrado representa células da linhagem BAN não transduzida. O ensaio foi realizado em triplicata técnica e biológica e os resultados representam as médias obtidas e o desvio padrão médio.

4.8. Ensaio de viabilidade celular por MTT

As células plaqueadas foram transduzidas com vetor AdRGD-PGeGFP em diferentes MOIs para revelar a toxicidade provocada pelo vetor. A escolha dos MOIs leva em consideração a possível variabilidade da transdução das linhagens representada pela curva de MOI (Figura 11A). As células foram sujeitas a coloração com MTT 24, 48 e 72 horas após a transdução e a absorbância determinada com leitor de ELISA. A Figura 12 representa a razão da absorbância (amostra/controle). Ensaios foram realizados em triplicata técnica e biológica.

A análise dos resultados revela que as linhagens não apresentam evidências de toxicidade significativa até 48 horas após a transdução com o vetor AdRGD-PGeGFP em nenhum dos MOIs utilizados. Após 72 horas de transdução a linhagem GAB apresentou diminuição significativa da viabilidade em MOIs de 350 e 500 e TIG em MOI de 250.

Figura 12 - Ensaio de viabilidade celular por MTT de linhagens de melanoma canino.

As linhagens de melanoma canino GAB e TIG foram plaqueadas, transduzidas com vetor AdRGDPG-eGFP em diferentes MOIs e incubadas por 24, 48 e 72 horas. Os gráficos representam a razão da absorbância (amostra/controle). O controle representa células não transduzidas e os números indicam os MOIs utilizados. O ensaio foi realizado em triplicata técnica e biológica. Teste estatístico Oneway Anova, pós teste Tukey * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

4.9. Ensaios funcionais dos vetores adenovirais

Com intenção de avaliar a expressão do transgene induzido pelo promotor PG, as linhagens de melanoma foram transduzidas com o vetor AdRGD-PGeGFP com MOI 25 e tratadas com doxorrubicina, agente conhecido por sua capacidade de induzir a atividade de *TP53*, ou tratadas com Nutlin-3, antagonista de MDM2.

O tratamento com doxorrubicina provocou aumento significativo na porcentagem de células eGFP positivas e na intensidade de expressão do *reporter* em todas as linhagens, quando comparadas às transduzidas não tratadas com a droga (Figura 13).

Já o Nutlin-3 provocou o aumento na porcentagem de células eGFP positivas em todas as linhagens, porém não foi significativo na linhagem GAB. Quanto a intensidade de expressão só houve aumento significativo nas linhagens BAN e GAB. Exemplo dos resultados obtidos por citometria de fluxo da linhagem BAN estão representados no Anexo E, demonstrando células eGFP positivas (R3) e o aumento da intensidade de expressão do transgene (R5) nas condições não transduzidas (Controle), transduzidas com vetor AdRGD-PGeGFP com MOI 25 (PGeGFP), transduzidas e tratadas com doxorrubicina (DOXO) e transduzidas e tratadas com Nutlin-3 (NUTLIN).

Figura 13 – Tratamento com doxorrubicina ou Nutlin-3 para ativar p53 em linhagens de melanoma canino transduzidas com o vetor AdRGD-PGeGFP. Linhagens de melanoma canino estabelecidas foram plaqueadas 3×10^5 células em placa de 35 mm e transduzidas com o vetor AdRGD-PGeGFP (MOI 25). Após 24 horas foram tratadas com $0,1 \mu\text{M}$ de doxorrubicina ou $10 \mu\text{M}$ de Nutlin-3. Após 48 horas de incubação as células foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo. Os gráficos à esquerda representam a porcentagem de células eGFP positivas e à direita representam a mediana da intensidade de fluorescência de eGFP em cada condição. O controle representa células não transduzidas, e vetor representa células transduzidas mas não tratadas com droga. Os ensaios foram realizados em triplicata técnica e biológica. Teste estatístico Oneway Anova, pós teste Tukey * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Para comparar a expressão dos repórteres sob ação dos promotores PG e CMV nas diferentes estratégias de estímulo de p53, células foram transduzidas com AdRGDCMVLuc2 ou AdRGDPGLuc2 com MOI 25, incubadas por 48 horas com doxorrubicina ou Nutlin-3. A intensidade de luminescência foi detectada em leitor de ELISA. Os gráficos da Figura 14 representam a razão da intensidade de luminescência (amostra/PGLuc2 ou CMVLuc2 não tratadas com droga), normalizada por curva de proteína BSA.

Sob a ação do promotor PG, os tratamentos com doxorrubicina e Nutlin-3 provocaram aumento significativo na intensidade de atividade de luciferase em todas as linhagens, exceto na linhagem MEL cujo aumento foi significativo somente quando tratada com doxorrubicina.

Quanto ao promotor CMV, as linhagens TIG e BAN demonstraram aumento significativo na intensidade de atividade de luciferase em ambos os tratamentos. Nas linhagens, GAB e MEL o aumento da intensidade de luciferase foi significativo somente quando tratadas com doxorrubicina.

Figura 14 - Tratamento com doxorrubicina ou Nutlin-3 para ativar p53 em linhagens de melanoma canino transduzidas com o vetor AdRGD-PGLuc2 ou AdRGDCMVLuc2.

Linhagens de melanoma canino estabelecidas foram plaqueadas 3×10^5 células em placa de 35 mm e transduzidas com MOI 25 do vetor AdRGD-PGLuc2 (gráficos à esquerda) ou AdRGDCMVLuc2 (gráficos à direita). Após 24 horas foram tratadas com $0.1 \mu\text{M}$ de doxorrubicina ou $10 \mu\text{M}$ de Nutlin-3. Após 48 horas de incubação as células foram coletadas e a atividade da luciferase foi detectada a partir do lisado celular utilizando kit Luciferase Assay System (Promega) e leitura da luminescência no equipamento VICTOR 3TM 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer). Os gráficos representam a média da unidade relativa de luciferase (amostra/PGLuc2 ou CMVLuc2 não tratadas com droga), normalizadas por curva de proteína. Os controles representam células não transduzidas. Os ensaios foram realizados em triplicata técnica e biológica. Teste estatístico Oneway Anova, pós teste Tukey * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.10. PCR quantitativa

Para analisar o nível de expressão do gene p53 e genes relacionados a apoptose e parada de ciclo celular foi realizada reação de PCR quantitativa antes e após a ação da doxorrubicina e Nutlin-3.

As linhagens de melanoma canino foram plaqueadas e após 24 horas tratadas com $0.1 \mu\text{M}$ de doxorrubicina ou $10 \mu\text{M}$ de Nutlin-3. Após 48 horas foi extraído o RNA e as reações de PCR quantitativa foram executadas com kit GoTaq® 1-Step RT-qPCR System (Promega), considerando como normalizador o gene HPRT1 (hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, variante 1) no equipamento StepOnePlus (Applied BioSystems). Os Cts obtidos foram analisados no Software StepOne v2.3 os cálculos $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em Excel.

Baseado na análise dos Cts das curvas de eficiência, as reações de PCR quantitativa foram então realizadas com RNA diluído na concentração 12,5 ng/ μ l das condições não tratada (controle), tratadas com doxorubicina e tratadas com Nutlin-3.

Figura 15 - Análise por PCR quantitativa da expressão genica de p53, p21, MDM2, Bax, PUMA, Bcl-2 em linhagens de melanoma canino tratadas com doxorubicina ou Nutlin-3. Linhagens de melanoma canino foram tratadas com 0.1 μ M de doxorubicina ou 10 μ M de Nutlin-3 por 48 horas e coletado RNA para reação de PCR quantitativa. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão médio da expressão relativa de mRNA obtido por $2^{-\Delta\Delta C_t}$, sendo o gene normalizador o HPRT1 canino. Os ensaios foram realizados em 2 experimentos independentes em duplicata técnica. Teste estatístico Oneway Anova, pós teste T tukey *p<0,05 vs. respectivo controle, # p<0,05 vs. respectivo controle.

Como representado na Figura 15, o tratamento com doxorrubicina resultou em aumento significativo de expressão dos genes p21 e Bcl-2 em todas as linhagens. O aumento da expressão de MDM2 e PUMA foram observados na linhagem MEL e do gene Bax nas linhagens em BAN e MEL. Nas demais não houveram redução ou aumento significativo da expressão.

5. DISCUSSÃO

5.1. Estabelecimento de linhagens de melanoma canino

Os melanomas de mucosa são raros, constituem 1% de todos os melanomas diagnosticados e cerca de 8 a 15% de todos os melanomas de cabeça e pescoço. Existem poucos estudos publicados sobre este subtipo, sendo pouco compreendido e explorado. Já na espécie canina, o melanoma é o tumor mais comum na cavidade oral, e assim como em seres humanos é uma doença altamente agressiva e metastática. Além disso, os cães desenvolvem melanoma espontaneamente, possuem sistema imunológico complexo, permitindo estudos relacionados ao aumento da expectativa de vida, epigenética e fatores de risco, e já vem sendo utilizado como um modelo biológico para estudo do melanoma humano.

O estabelecimento de modelos experimentais em oncologia contribui para o estudo da biologia em nível molecular, permitindo a análise da diferenciação e do crescimento tumoral, da morte celular e a realização de ensaios pré-clínicos. Uma destas estratégias é o cultivo celular primário (cultura primária), que consiste na a manutenção *in vitro* de células vivas excisadas de tecido animal ou humano. Após a excisão, o tecido pode ser dissociado por enzimas digestivas e pode ser submetido ao crescimento em monocamada. Este cultivo é heterogêneo, formado por diversos tipos celulares, mantém-se geralmente por pouco tempo em cultura e

é mais propício ao desenvolvimento de contaminações, porém preserva características genéticas do tecido originário. No presente trabalho, as enzimas proteolíticas tripsina e liberase, utilizadas para estabelecer o cultivo primário de melanoma canino, foram eficientes para fragmentar o tecido e clivar as ligações entre as células, permitindo o crescimento em monocamada. A partir de 9 amostras de melanoma de cavidade oral canino, 2 delas não aderiram a placa de cultura devido a contaminação bacteriana da amostra, demonstrando resistência aos antibióticos acrescentados ao meio de cultura. Porém a troca de meio constante, lavagem com PBS 1X e manejo asséptico das culturas em fluxo laminar favoreceram o prolongamento do tempo de vida da maioria das amostras em cultivo primário.

Oito das nove culturas primárias cultivadas *in vitro* não foram capazes de formar tumor em camundongo Balb/c *nude*. Este camundongo apresenta mutação no gene Foxn1 (Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu}), o qual é responsável por um fator de transcrição que regula a expressão de genes relacionados à queratina, tornando-os albinos. Devido à atímia, estes animais são alvos de pesquisas científicas especialmente em estudos com tumores heterotransplantados (de espécies diferentes), pois possuem diminuição de células T CD4⁺ e CD8⁺. Entretanto são capazes de desenvolver resposta imune inata com células monocíticas/macrófagos e células NK (*natural killer*), o que pode ter provocado a inibição do crescimento tumoral das culturas primárias. Outra razão pode estar relacionada ao fato das células do cultivo primário não terem sofrido imortalização, podendo entrar em estado senescente antes de serem capazes de formar tumor.

O processo de diluição realizado isolou e expandiu clones de células com alta velocidade de crescimento e mais adaptadas ao cultivo *in vitro*. Técnica que favoreceu a formação de subculturas secundárias de uma determinada linha celular e que apresentaram capacidade de crescimento *in vivo*, ou tumorigenicidade. Uma das hipóteses para o crescimento tumoral desta seleção de células pode ser o de possuírem o fenótipo “tronco tumoral” cujas características, além de alta taxa de multiplicação, são a capacidade de autorrenovação e de iniciar um novo tumor. Esta hipótese também pode estar relacionada à falta de positividade de marcadores

melanocíticos no tumor gerado pela linhagem TIG. As células “iniciadoras de tumores”, compostas por uma pequena população de células tumorais no microambiente, são mais indiferenciadas e podem gerar tumores que não possuem marcadores específicos de diferenciação melanocítica.

O termo linhagem celular se refere ao cultivo de células que adquiriram a capacidade de se multiplicar indefinidamente, apresentando crescimento rápido e proliferação ilimitada ou limitada a um número elevado de divisões celulares. As quatro linhagens estabelecidas foram capazes de formar tumor *in vivo* e proliferar em meio de cultura RPMI ou DMEM, suplementas com soro fetal bovino 10%. As linhagens foram negativas para contaminação por micoplasma (dados não demonstrados). Após 80 passagens, as linhagens tumorais mantiveram o crescimento *in vitro* bem como suas características morfológicas, sem que tenha sido utilizada nenhuma técnica para imortalização das células, o que poderia favorecer o aumento da variação cromossômica entre as células e a perda de características originais do tumor. Quanto a suplementação das linhagens, o soro fetal bovino foi selecionado por ser um dos mais utilizados, pois os meios de cultura são nutricionalmente insuficientes para manutenção das células *in vitro*, e o soro fetal bovino apresenta menor concentração de imunoglobulinas e elevada proporção de fatores de crescimento em comparação ao soro de bezerros, cavalos e humanos.

Comparadas às culturas primárias, experimentos empregando células de linhagens contínuas tendem a apresentar menor variação nos resultados obtidos, oferecendo maior reprodutibilidade e fidelidade dos dados. Dentre as vantagens da utilização deste modelo estão os estudos pré-clínicos para o desenvolvimento de novas abordagens diagnósticas e terapêuticas, a produção de vacinas e de reagentes biológicos, testes para avaliação da toxicidade de tratamentos, análise independente de parâmetros, elevado número de testes num reduzido intervalo de tempo e a redução dos ensaios com animais.

Por outro lado, algumas das desvantagens do modelo em monocamada podem dificultar a análise de modelos complexos, como por exemplo, compostos por células do sistema imune ou do microambiente tumoral. Uma das estratégias

que pode reduzir o impacto destas limitações é o cultivo de células em modelo tridimensional (3D). A formação de esferoides tumorais por levitação magnética é uma das técnicas que permitem a formação de estruturas que mimetizam tecidos ou o microambiente tumoral. Porém, apesar das culturas primárias estabelecidas neste projeto terem sido capazes de formar esferoides por esta técnica, o remodelamento tridimensional das células, com ou sem os componentes do microambiente tumoral, não permitiu a formação de tumor no subcutâneo de camundongo *nude*. Apesar das partículas magnéticas serem biocompatíveis, o número de células empregado no sistema de levitação foi 10 vezes menor do que o número de células necessário para formar tumor neste modelo, o que pode ter limitado a formação do tumor. Apesar disto, este modelo confere oportunidade de estudar a integração de sinais mediados por interações célula-célula e célula-ambiente que modelam o comportamento fenotípico das células, incluindo a fatores secretados relacionados a proliferação, adesão e sobrevivência.

5.2. Caracterização molecular

O diagnóstico histológico do melanoma pode ser desafiador devido à apresentação morfológica variada das células, que pode ser fusiforme ou epitelióide no melanoma canino. A técnica mais utilizada na veterinária para confirmar a origem melanocítica do tumor é a imunohistoquímica. O marcador S100 foi positivo nos tumores formados pela linhagem BAN, o PNL2 foi positivo em MEL e os compostos pelo coquetel melanoma foram positivos em GAB e MEL. Já a linhagem TIG não apresentou positividade para nenhum dos marcadores melanocíticos testados. Uma das hipóteses para este resultado é a mudança do fenótipo durante cultivo, demonstrada pela parada de produção de melanina em cultura. Inoue e colaboradores (2004) também observaram a parada de produção de melanina em linhagens de melanoma canino após a 8ª passagem em cultura [101]. A literatura também descreve que com a progressão do estágio clínico I para o estágio IV pode

ocorrer a perda de expressão tumoral de melan-A e de tirosinase em 14% dos melanomas resultando na mudança do fenótipo tumoral tanto associado ao aumento da agressividade da doença [102], quanto ao longo da manutenção das células em condições de cultura [103].

O gene *TP53* é um dos mais amplamente estudados na oncologia por sua ação supressora de tumor e por sua alta incidência de mutação no câncer. A proteína p53 é importante na manutenção da integridade do DNA atuando em vias de apoptose e parada de ciclo celular. Anormalidades nos genes supressores tumorais são comuns no melanoma canino, sendo as mutações de p53 também pouco frequentes, porém apresentam marcada perda ou redução de expressão de genes da via de p53 [33]. A homologia entre o gene *TP53* humano e canino obtido pelo alinhamento no banco de dados NCBI é de 87%, correspondente a 811 e 936 nucleotídeos das espécies respectivamente. A maioria das mutações relatadas em tumores de ambas as espécies estão agrupadas em 4 dos 5 domínios altamente conservados evolutivamente, são as chamadas regiões *hot spot* para mutação de *TP53*, localizadas entre os exons 5 e 8 [104, 105]. O sequenciamento dos exons 4, 5, 6, 7 e 8 das linhagens de melanoma canino estabelecidas não revelou alteração nas bases de nucleotídeo nestas regiões, além disso, a p53 não foi detectada por técnica de imunohistoquímica nos tumores formados pelas linhagens. Estes resultados podem sugerir que não há proteína mutante, pois quando mutada se acumula nas células e é eliminada lentamente, sendo geralmente expressa pela imunohistoquímica. Koenig e colaboradores (2002) analisando a expressão de genes supressores tumorais em 7 linhagens de melanoma canino encontraram resultados semelhantes, demonstrando a detecção do p53 por PCR em todas as linhagens [33]. Pela técnica de imunohistoquímica estes autores descreveram o acúmulo de p53 citoplasmático e exclusão da proteína do compartimento nuclear em todas as linhagens. O que pode indicar degradação da p53, já que sua função é maior no núcleo. Uma das principais moléculas envolvidas neste processo é a MDM2 que promove ubiquitinação na extremidade carboxi-terminal da cadeia polipeptídica, exportando a p53 do núcleo para o citoplasma, onde será degradada pelo proteassoma [106]. Ensaios de imunofluorescência poderão ser realizados nas

linhagens estabelecidas neste projeto para a melhor identificação da p53 nos compartimentos celulares, buscando confirmar a funcionalidade da proteína.

A sequência de nucleotídeos conservada dos genes supressores tumorais das espécies humana e canina e as semelhanças no padrão de mutações permitem estudos genéticos comparativos do melanoma humano com o modelo canino.

5.3. Ensaios com vetores adenovirais

Outra abordagem terapêutica para o tratamento do melanoma é a terapia gênica. Em termos gerais, consiste na transferência de uma sequência de ácidos nucléicos para células do paciente, que pode ser realizada por um vetor viral ou não-viral. O material genético transferido pode ser um gene na forma de cDNA, que codifica uma proteína funcional capaz de alterar um processo celular. Sendo os adenovirais os vetores mais amplamente estudados em ensaios de terapia gênica, a capacidade de serem transduzidas, tornam as linhagens de melanoma canino estabelecidas um modelo para o estudo desta terapia

As linhagens demonstraram variabilidade na eficiência de transdução pelo vetor AdRGD-PGeGFP, ainda que sem perda significativa na viabilidade celular em MOI próximo a 500 após 48 horas de transdução. Dentre as hipóteses que podem justificar a diferença na eficiência de transdução está a intensidade de expressão de integrinas na membrana das células. Os vetores derivados do adenovírus sorotipo 5, somente podem transduzir células que exibem o receptor específico CAR (*Coxsackie Adenovirus Receptor*), mas a inclusão do tripeptídeo RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) permite a transdução de grande grupo de células que expressam integrinas, mas não expressam CAR. A intensidade de expressão de integrinas está diretamente relacionada ao tropismo do vetor [93, 94]. Outra hipótese para esta variabilidade está relacionada ao promotor PG, que é regulado pela proteína p53 funcional. As linhagens apresentam diferentes quantidades de p53 e sua ação sobre o promotor PG afetará a expressão do transgene

proporcionalmente à estas quantidades. E vale ressaltar que na ausência de estresse celular a p53 é mantida em níveis baixos e atua sobre o promotor PG com consequente menor expressão do transgene, quando comparado ao CMV, reconhecido por ser fortemente ativo em diversos tipos celulares.

A doxorubicina, antibiótico da família das antraciclinas, possui uma variedade de mecanismos moleculares que explicam sua função como genotóxica e citostática, como intercalar entre os pares de nucleotídeo na dupla fita de DNA, geração de espécies reativas de oxigênio levando a dano no DNA, oxidação da membrana lipídica e indução de apoptose em resposta a inibição da enzima topoisomerase II [107]. Os danos gerados pela doxorubicina nas linhagens transduzidas com o vetor AdRGD-PGeGFP promovem fosforilação e este aumento da proteína ativa que atua sobre o promotor PG (responsivo à p53), pode ter resultado em aumento da expressão do transgene nas linhagens.

O Nutlin-3, representante dos imidazolinícos análogos, afeta a ligação do MDM2 com a região amino terminal de p53, impedindo sua degradação por esta via e conduz ao acúmulo de p53 [108]. Este acúmulo pode ter sido responsável pelo aumento significativo da expressão de luciferase nas linhagens BAN, TIG e MEL. Autores já comprovaram a sensibilidade de linhagens de melanoma canino ao Nutlin-3, demonstrando a diminuição da proliferação celular e da formação de colônias após este tratamento [109]. Porém, como já descrito na literatura [108] é possível que o Nutlin-3 não tenha contribuído para a ativação e estabilização de p53 por mecanismos genotóxicos, resultando em uma ação menos eficiente do que a provocada pelo quimioterápico. Os resultados demonstram que o modelo estabelecido é capaz de ser ativado por indutores de p53, e abrem oportunidade para estudos desta via nas linhagens de melanoma canino.

5.4. Expressão gênica

Quando há danos no DNA a p53 ativa proteínas que também são supressoras de tumor como a p21. Esta é codificada pelo gene CDKN1A localizado no cromossomo 12q21 canino. Quando ativadas ou superexpressas inibem as CDKs e a fosforilação da proteína Rb levando a parada de ciclo celular. Na presença de doxorrubicina as linhagens GAB e TIG tiveram aumento de expressão significativa de p21. Sua expressão é fortemente controlada por p53, e autores sugerem que este aumento esteja relacionado ao status selvagem de p53 em linhagens de melanoma canino, já que células com mutação em p53 tratadas com doxorrubicina não apresentaram aumento de expressão de p21 [109]. O gene canino p21 é expresso em duas isoformas, enquanto o humano é basicamente expresso em uma proteína única. A proteína p21 canina possui 82% de homologia a proteína humana, enquanto há 76% de identidade entre a murina e a humana.

Quanto ao gene MDM2, a homologia entre as sequências canina e humana é de 92%. O aumento significativo na expressão de MDM2 na linhagem MEL tratada com doxorrubicina pode estar relacionado tanto a ação direta do quimioterápico, quanto a ação da proteína p53. Em resposta a estresse celular ou dano ao DNA, há aumento direto na expressão do gene MDM2, além disso, a p53 acumulada e ativada por estes danos pode provocar aumento em MDM2 [110] indicando a ativação desta via.

O aumento da expressão de PUMA nas linhagens BAN e MEL pode ter ocorrido tanto pela ativação direta de p53, quanto pela produção de ROS induzida pela doxorrubicina. O aumento da expressão de PUMA pode ter sido transiente, e não ter persistido por 48 horas nas demais linhagens, conforme evidenciado por Sun e colaboradores (2016) em linhagem de osteossarcoma, que revelou aumento de PUMA após 12 horas do tratamento com doxorrubicina, porém não mais detectado após 48 horas [111].

O aumento da expressão de Bcl-2 foi significativo com o tratamento com doxorrubicina nas linhagens BAN, TIG e MEL, indicando a ativação de um mecanismo de resistência a morte celular pelas células tumorais. Porém o aumento da expressão de Bax, como observado em BAN e MEL, pode exercer um efeito dominante sobre a ação de Bcl-2 nestas linhagens, resultando uma atividade pró-apoptótica.

5.5. Perspectivas

A expressão da proteína ARF (*alternate reading frame*, p14ARF em humanos e p19ARF em murinos) aumenta em resposta a ativação de oncogenes, visando inibir (entre outras funções) a atividade de MDM2 e consequentemente promover o acúmulo de p53. Nesta via, a proteína ARF é um parceiro funcional de p53. Nos tumores, o locus de ARF (CDKN2a) frequentemente sofre deleção ou metilação, como em 50% de melanomas primários [76, 112, 113].

A resposta imunológica inata tem papel importante na prevenção e tratamento de tumores. Relatos da literatura indicam que a via p53/ARF pode auxiliar IFN β . A proteína IFN β inicia uma cascata de eventos de estimulação do sistema imune inato e adaptativo, indução de apoptose, inibição de angiogênese, metástase e indução da expressão de MHC I [114]. A bioquimioterapia com IFN β já é utilizada no tratamento de melanoma e glioblastoma, porém esta abordagem é limitada devido a curta meia-vida da proteína e à toxicidade associada a altas doses de IFN β recombinante [115, 116]. Alternativamente, a terapia gênica com IFN β está sendo aplicada clinicamente e com resultados promissores [79-82]. Foi mostrado que na presença de p53, o efeito antiviral de IFN β é maior [117] e que a indução de apoptose em resposta à IFN β depende da presença de ARF [118]. Este conjunto de dados sugere que IFN β pode ser importante na terapia contra o câncer e que a via de p53/ARF pode complementar a função de IFN β .

A imunoterapia e estratégias de terapia gênica também vem sendo utilizadas na veterinária. Uma estratégia de imunoterapia atualmente disponível para o tratamento de melanoma de cães é a Oncept®. Comercialmente disponível desde 2010 nos Estados Unidos é uma vacina xenogênica que carrega o gene da tirosinase humana indicada para melanoma de cavidade oral canino em estágios II e III. Seus resultados permanecem controversos. Apesar de publicações sugerirem o aumento da sobrevida de pacientes [119], outros autores não demonstraram aumento da sobrevida nem do tempo livre de doença [120, 121].

Outras vacinas antitumorais com o uso de lisado de tumor autólogo ou associado ao uso de células dendríticas vem sendo estudadas, até o presente momento, somente em estudos experimentais [94]. A utilização de IFN- β canino e vírus herpes simplex timidina quinase, em paralelo a vacina subcutânea carreando GM-CSF humano e IL-2, aumentou significativamente o intervalo livre de doença e sobrevida, além de aumentar a qualidade de vida de cães com melanoma [122]. Em outro estudo o vetor adenoviral CD40L em cães com melanoma de cavidade oral em estágio III apresentaram remissão completa com duas injeções intratumorais antes da cirurgia [123].

O desenvolvimento de novas estratégias de tratamento de pacientes com câncer pode ser caro e ineficiente. Cães podem ser modelos pré-clínicos para determinar a segurança de novas terapias e encontrar biomarcadores associados a resposta terapêutica, e os ensaios clínicos podem direcionar as estratégias de tratamento, que beneficiariam tanto pacientes humanos como caninos.

Sendo assim, nas perspectivas futuras de nossa proposta pretendemos avaliar a combinação de ARF/INF no modelo experimental canino estabelecido.

6. CONCLUSÃO

A funcionalidade desta plataforma adenoviral aprimorada abre oportunidades para estudos da transferência gênica da combinação p19ARF/IFN β nas linhagens estabelecidas de melanoma canino. Com o sucesso destas análises, teremos um modelo experimental relevante a ser utilizado no desenvolvimento de novas terapias para o melanoma.

7 REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional do Câncer. 2018 [cited 2018; O que é o câncer]. Available from: <https://www.inca.gov.br/>.
2. Instituto Nacional do Câncer. 2018; Melanoma]. Available from: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>.
3. Medrano, R.F., et al., *Vaccination using melanoma cells treated with p19arf and interferon beta gene transfer in a mouse model: a novel combination for cancer immunotherapy*. Cancer Immunol Immunother, 2016. **65**(4): p. 371-82.
4. Rowell, J.L., D.O. McCarthy, and C.E. Alvarez, *Dog models of naturally occurring cancer*. Trends Mol Med, 2011. **17**(7): p. 380-8.
5. Pinho, S.S., et al., *Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis*. Transl Res, 2012. **159**(3): p. 165-72.
6. von Euler, H., et al., *Efficient adenovector CD40 ligand immunotherapy of canine malignant melanoma*. J Immunother, 2008. **31**(4): p. 377-84.
7. MOULTON, J.E., *TUMOURS IN DOMESTIC ANIMALS*. 1990, UNIVERSITY OF CALIFORNIA PRESS: USA.
8. William H. Ward, M.a.J.M.F., MD, *Epidemiology of Melanoma*, in *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy*, F.J. Ward WH, Editor. 2017, Codon Publications: Brisbane (AU). p. 3 - 22.
9. Leonardi, G.C., et al., *Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review)*. Int J Oncol, 2018. **52**(4): p. 1071-1080.
10. Yde, S.S., et al., *Mucosal Melanoma: a Literature Review*. Curr Oncol Rep, 2018. **20**(3): p. 28.
11. Itoh, M., et al., *Anorectal melanoma with a KIT-activating mutation, which is a target for tyrosine kinase inhibitor*. Int J Clin Oncol, 2011. **16**(4): p. 428-34.
12. López, F., et al., *Update on primary head and neck mucosal melanoma*. Head Neck, 2016. **38**(1): p. 147-55.
13. Buery, R.R., et al., *NRAS and BRAF mutation frequency in primary oral mucosal melanoma*. Oncol Rep, 2011. **26**(4): p. 783-7.
14. Kim, C., et al., *Long-term survival in patients with metastatic melanoma treated with DTIC or temozolomide*. Oncologist, 2010. **15**(7): p. 765-71.
15. Soengas, M.S. and S.W. Lowe, *Apoptosis and melanoma chemoresistance*. Oncogene, 2003. **22**(20): p. 3138-51.
16. Middleton, M.R., et al., *Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma*. J Clin Oncol, 2000. **18**(1): p. 158-66.
17. Kirkwood, J.M., et al., *Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684*. J Clin Oncol, 1996. **14**(1): p. 7-17.
18. Ives, N.J., et al., *Adjuvant interferon- α for the treatment of high-risk melanoma: An individual patient data meta-analysis*. Eur J Cancer, 2017. **82**: p. 171-183.

19. Miklavčič, D., et al., *Electrochemotherapy: technological advancements for efficient electroporation-based treatment of internal tumors*. Med Biol Eng Comput, 2012. **50**(12): p. 1213-25.
20. Domingues, B., et al., *Melanoma treatment in review*. Immunotargets Ther, 2018. **7**: p. 35-49.
21. D'Angelo, S.P., et al., *Efficacy and Safety of Nivolumab Alone or in Combination With Ipilimumab in Patients With Mucosal Melanoma: A Pooled Analysis*. J Clin Oncol, 2017. **35**(2): p. 226-235.
22. Hansen, K. and C. Khanna, *Spontaneous and genetically engineered animal models; use in preclinical cancer drug development*. Eur J Cancer, 2004. **40**(6): p. 858-80.
23. Starkey, M.P., et al., *Dogs really are man's best friend--canine genomics has applications in veterinary and human medicine!* Brief Funct Genomic Proteomic, 2005. **4**(2): p. 112-28.
24. Smith, S.H., M.H. Goldschmidt, and P.M. McManus, *A comparative review of melanocytic neoplasms*. Vet Pathol, 2002. **39**(6): p. 651-78.
25. FERRO, G.D., *Prevalência de neoplasias da cavidade oral de cães atendidos no Centro Odontológico Veterinário-Odontovet®-SP-entre 1994 e 2003*. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci, 2003. **40**(2): p. 210 - 211.
26. Ragnarsson-Olding, B.K., *Primary malignant melanoma of the vulva--an aggressive tumor for modeling the genesis of non-UV light-associated melanomas*. Acta Oncol, 2004. **43**(5): p. 421-35.
27. Goldschmidt, M.H. and M.J. Hendrick, *Tumors of the skin and soft tissues*, in *Tumors in Domestic Animal*, D.J. Meuten, Editor. 2002, Iowa State Press: Ames, IA, USA. p. 78-82.
28. Dobson, J.M., *Breed-predispositions to cancer in pedigree dogs*. ISRN Vet Sci, 2013. **2013**: p. 941275.
29. Modiano, J.F., M.G. Ritt, and J. Wojcieszyn, *The molecular basis of canine melanoma: pathogenesis and trends in diagnosis and therapy*. J Vet Intern Med, 1999. **13**(3): p. 163-74.
30. Dzutsev, A., et al., *The role of the microbiota in inflammation, carcinogenesis, and cancer therapy*. Eur J Immunol, 2015. **45**(1): p. 17-31.
31. Mochizuki, H., et al., *BRAF Mutations in Canine Cancers*. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0129534.
32. Mochizuki, H. and M. Breen, *Comparative Aspects of BRAF Mutations in Canine Cancers*. Vet Sci, 2015. **2**(3): p. 231-245.
33. Koenig, A., et al., *Expression and significance of p53, rb, p21/waf-1, p16/ink-4a, and PTEN tumor suppressors in canine melanoma*. Vet Pathol, 2002. **39**(4): p. 458-72.
34. Noguchi, S., et al., *MicroRNAs as tumour suppressors in canine and human melanoma cells and as a prognostic factor in canine melanomas*. Vet Comp Oncol, 2013. **11**(2): p. 113-23.
35. Smedley, R.C., et al., *Prognostic markers for canine melanocytic neoplasms: a comparative review of the literature and goals for future investigation*. Vet Pathol, 2011. **48**(1): p. 54-72.

36. Ramos-Vara, J.A., et al., *Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases*. Vet Pathol, 2000. **37**(6): p. 597-608.
37. Bergin, I.L., et al., *Prognostic evaluation of Ki67 threshold value in canine oral melanoma*. Vet Pathol, 2011. **48**(1): p. 41-53.
38. Laprie, C., et al., *MIB-1 immunoreactivity correlates with biologic behaviour in canine cutaneous melanoma*. Vet Dermatol, 2001. **12**(3): p. 139-47.
39. Harvey, H.J., et al., *Prognostic criteria for dogs with oral melanoma*. J Am Vet Med Assoc, 1981. **178**(6): p. 580-2.
40. Giudice, C., et al., *Immunohistochemical investigation of PNL2 reactivity of canine melanocytic neoplasms and comparison with Melan A*. J Vet Diagn Invest, 2010. **22**(3): p. 389-94.
41. Orchard, G.E., *Comparison of immunohistochemical labelling of melanocyte differentiation antibodies melan-A, tyrosinase and HMB 45 with NKIC3 and S100 protein in the evaluation of benign naevi and malignant melanoma*. Histochem J, 2000. **32**(8): p. 475-81.
42. Choi, C. and D.F. Kusewitt, *Comparison of tyrosinase-related protein-2, S-100, and Melan A immunoreactivity in canine amelanotic melanomas*. Vet Pathol, 2003. **40**(6): p. 713-8.
43. Rochaix, P., et al., *PNL2, a new monoclonal antibody directed against a fixative-resistant melanocyte antigen*. Mod Pathol, 2003. **16**(5): p. 481-90.
44. Owen, L.N., *TNM Classification of Tumours in Domestic Animals*, in World Health Organization. 1980: Geneve, Switzerland.
45. MacEwen, E.G., et al., *Canine oral melanoma: comparison of surgery versus surgery plus Corynebacterium parvum*. Cancer Invest, 1986. **4**(5): p. 397-402.
46. Rotte, A., et al., *Immunotherapy of melanoma: present options and future promises*. Cancer Metastasis Rev, 2015. **34**(1): p. 115-28.
47. Murphy, S., et al., *Oral malignant melanoma - the effect of coarse fractionation radiotherapy alone or with adjuvant carboplatin therapy*. Vet Comp Oncol, 2005. **3**(4): p. 222-9.
48. Proulx, D.R., et al., *A retrospective analysis of 140 dogs with oral melanoma treated with external beam radiation*. Vet Radiol Ultrasound, 2003. **44**(3): p. 352-9.
49. Freeman, K.P., et al., *Treatment of dogs with oral melanoma by hypofractionated radiation therapy and platinum-based chemotherapy (1987-1997)*. J Vet Intern Med, 2003. **17**(1): p. 96-101.
50. Dank, G., et al., *Use of adjuvant carboplatin for treatment of dogs with oral malignant melanoma following surgical excision*. Vet Comp Oncol, 2014. **12**(1): p. 78-84.
51. Silveira, L.M.G., et al., *Utilização de eletroquimioterapia em neoplasias de origem epitelial ou mesenquimal localizadas em pele ou mucosas de cães*. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, 2010. **41**(1): p. 55 - 66.
52. Sirott, M.N., et al., *Prognostic factors in patients with metastatic malignant melanoma. A multivariate analysis*. Cancer, 1993. **72**(10): p. 3091-8.

53. Bostock, D.E., *Prognosis after surgical excision of canine melanomas*. Vet Pathol, 1979. **16**(1): p. 32-40.
54. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
55. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
56. Beckerman, R. and C. Prives, *Transcriptional regulation by p53*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(8): p. a000935.
57. Green, D.R. and G. Kroemer, *Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53*. Nature, 2009. **458**(7242): p. 1127-30.
58. Mihara, M., et al., *p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria*. Mol Cell, 2003. **11**(3): p. 577-90.
59. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome*. Nature, 1992. **358**(6381): p. 15-6.
60. Broude, E.V., et al., *p21 (CDKN1A) is a negative regulator of p53 stability*. Cell Cycle, 2007. **6**(12): p. 1468-71.
61. Nakano, K. and K.H. Vousden, *PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53*. Mol Cell, 2001. **7**(3): p. 683-94.
62. Chipuk, J.E., et al., *PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53*. Science, 2005. **309**(5741): p. 1732-5.
63. Lane, D.P. and L.V. Crawford, *T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells*. Nature, 1979. **278**(5701): p. 261-3.
64. Tsujimoto, Y., et al., *The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining*. Science, 1985. **229**(4720): p. 1390-3.
65. Oren, M., *Decision making by p53: life, death and cancer*. Cell Death Differ, 2003. **10**(4): p. 431-42.
66. Lu, X., *Tied up in loops: positive and negative autoregulation of p53*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(5): p. a000984.
67. Perry, M.E., *The regulation of the p53-mediated stress response by MDM2 and MDM4*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(1): p. a000968.
68. Olivier, M., M. Hollstein, and P. Hainaut, *TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(1): p. a001008.
69. Meek, D.W. and C.W. Anderson, *Posttranslational Modification of p53: cooperative integrators of function*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(6): p. a000950.
70. Lozano, G., *The oncogenic roles of p53 mutants in mouse models*. Curr Opin Genet Dev, 2007. **17**(1): p. 66-70.
71. Souza, D.M.B., et al., *Detection of mutations within exons 4 to 8 of the p53 tumor suppressor gene in canine mammary glands*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2012. **64**(2): p. 8.
72. Giglia-Mari, G. and A. Sarasin, *TP53 mutations in human skin cancers*. Hum Mutat, 2003. **21**(3): p. 217-28.

73. Polsky, D., et al., *HDM2 protein overexpression, but not gene amplification, is related to tumorigenesis of cutaneous melanoma*. *Cancer Res*, 2001. **61**(20): p. 7642-6.
74. Box, N.F. and T. Terzian, *The role of p53 in pigmentation, tanning and melanoma*. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2008. **21**(5): p. 525-33.
75. Bhatia, S., S.S. Tykodi, and J.A. Thompson, *Treatment of metastatic melanoma: an overview*. *Oncology (Williston Park)*, 2009. **23**(6): p. 488-96.
76. Sharpless, E. and L. Chin, *The INK4a/ARF locus and melanoma*. *Oncogene*, 2003. **22**(20): p. 3092-8.
77. Coley, W.B., II. *Contribution to the Knowledge of Sarcoma*. *Ann Surg*, 1891. **14**(3): p. 199-220.
78. Dock, G. *The Influence of Complicating Diseases Upon Leukaemia*. *The American Journal of the Medical Sciences*, 1904. **4**, 563-592
DOI: 10.1097/00000441-190412740-00001.
79. Matsumoto, K., et al., *A pilot study of human interferon beta gene therapy for patients with advanced melanoma by in vivo transduction using cationic liposomes*. *Jpn J Clin Oncol*, 2008. **38**(12): p. 849-56.
80. Wakabayashi, T., et al., *A phase I clinical trial of interferon-beta gene therapy for high-grade glioma: novel findings from gene expression profiling and autopsy*. *J Gene Med*, 2008. **10**(4): p. 329-39.
81. Yoshida, J., et al., *Human gene therapy for malignant gliomas (glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma) by in vivo transduction with human interferon beta gene using cationic liposomes*. *Hum Gene Ther*, 2004. **15**(1): p. 77-86.
82. Yoshida, J., M. Mizuno, and T. Wakabayashi, *Interferon-beta gene therapy for cancer: basic research to clinical application*. *Cancer Sci*, 2004. **95**(11): p. 858-65.
83. Tong, A.W., et al., *Oncolytic viruses for induction of anti-tumor immunity*. *Curr Pharm Biotechnol*, 2012. **13**(9): p. 1750-60.
84. Cerullo, V., et al., *Chapter eight--Oncolytic adenoviruses for cancer immunotherapy: data from mice, hamsters, and humans*. *Adv Cancer Res*, 2012. **115**: p. 265-318.
85. Zamarin, D., et al., *Localized oncolytic virotherapy overcomes systemic tumor resistance to immune checkpoint blockade immunotherapy*. *Sci Transl Med*, 2014. **6**(226): p. 226ra32.
86. Pol, J., G. Kroemer, and L. Galluzzi, *First oncolytic virus approved for melanoma immunotherapy*. *Oncoimmunology*, 2016. **5**(1): p. e1115641.
87. Hunger, A., et al., *Reestablishment of p53/Arf and interferon-beta pathways mediated by a novel adenoviral vector potentiates antiviral response and immunogenic cell death*. *Cell Death Discov*, 2017. **3**: p. 17017.
88. Hunger, A., R.F. Medrano, and B.E. Strauss, *Harnessing combined p19Arf and interferon-beta gene transfer as an inducer of immunogenic cell death and mediator of cancer immunotherapy*. *Cell Death Dis*, 2017. **8**(5): p. e2784.
89. Sznol, M., *Betting on immunotherapy for melanoma*. *Curr Oncol Rep*, 2009. **11**(5): p. 397-404.

90. Ginn, S.L., et al., *Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update*. J Gene Med, 2018. **20**(5): p. e3015.
91. Strauss, B.E. and E. Costanzi-Strauss, *Gene Therapy for Melanoma: Progress and Perspectives*, in *Recent Advances in the Biology, Therapy and Management of Melanoma*, L.M. Davids, Editor. 2013, InTech Open Science.
92. Marasini, S., et al., *Effects of Adenoviral Gene Transduction on the Stemness of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*. Mol Cells, 2017. **40**(8): p. 598-605.
93. Shen, Y.H., et al., *Arg-Gly-Asp (RGD)-Modified E1A/E1B Double Mutant Adenovirus Enhances Antitumor Activity in Prostate Cancer Cells In Vitro and in Mice*. PLoS One, 2016. **11**(1): p. e0147173.
94. Tamura, R.E., et al., *Improving adenoviral vectors and strategies for prostate cancer gene therapy*. Clinics (Sao Paulo), 2018. **73**(suppl 1): p. e476s.
95. Strauss, B.E. and E. Costanzi-Strauss, *pCLPG: a p53-driven retroviral system*. Virology, 2004. **321**(2): p. 165-72.
96. Strauss, B.E., M.C. Bajgelman, and E. Costanzi-Strauss, *A novel gene transfer strategy that combines promoter and transgene activities for improved tumor cell inhibition*. Cancer Gene Ther, 2005. **12**(12): p. 935-46.
97. Bajgelman, M.C. and B.E. Strauss, *Development of an adenoviral vector with robust expression driven by p53*. Virology, 2008. **371**(1): p. 8-13.
98. Merkel, C.A., et al., *Combined p19Arf and interferon-beta gene transfer enhances cell death of B16 melanoma in vitro and in vivo*. Cancer Gene Ther, 2013. **20**(5): p. 317-25.
99. Brinkhof, B., et al., *Development and evaluation of canine reference genes for accurate quantification of gene expression*. Anal Biochem, 2006. **356**(1): p. 36-43.
100. Peters, I.R., et al., *Development and application of multiple internal reference (housekeeper) gene assays for accurate normalisation of canine gene expression studies*. Vet Immunol Immunopathol, 2007. **117**(1-2): p. 55-66.
101. Inoue, K., et al., *Establishment and characterization of four canine melanoma cell lines*. J Vet Med Sci, 2004. **66**(11): p. 1437-40.
102. Hofbauer, G.F., et al., *Tyrosinase immunoreactivity in formalin-fixed, paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution*. J Cutan Pathol, 1998. **25**(4): p. 204-9.
103. Haass, N.K., K.S. Smalley, and M. Herlyn, *The role of altered cell-cell communication in melanoma progression*. J Mol Histol, 2004. **35**(3): p. 309-18.
104. Caron de Fromentel, C. and T. Soussi, *TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis*. Genes Chromosomes Cancer, 1992. **4**(1): p. 1-15.
105. Walker, D.R., et al., *Evolutionary conservation and somatic mutation hotspot maps of p53: correlation with p53 protein structural and functional features*. Oncogene, 1999. **18**(1): p. 211-8.

106. Zhang, Y. and Y. Xiong, *A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation*. Science, 2001. **292**(5523): p. 1910-5.
107. Minotti, G., et al., *Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity*. Pharmacol Rev, 2004. **56**(2): p. 185-229.
108. Vassilev, L.T., et al., *In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2*. Science, 2004. **303**(5659): p. 844-8.
109. Zhang, J., et al., *Establishment of a dog model for the p53 family pathway and identification of a novel isoform of p21 cyclin-dependent kinase inhibitor*. Mol Cancer Res, 2009. **7**(1): p. 67-78.
110. Mendrysa, S.M. and M.E. Perry, *The p53 tumor suppressor protein does not regulate expression of its own inhibitor, MDM2, except under conditions of stress*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(6): p. 2023-30.
111. Sun, Y., et al., *P53 is required for Doxorubicin-induced apoptosis via the TGF-beta signaling pathway in osteosarcoma-derived cells*. Am J Cancer Res, 2016. **6**(1): p. 114-25.
112. Chi, S.G., et al., *Frequent alteration of CDKN2 (p16(INK4A)/MTS1) expression in human primary prostate carcinomas*. Clinical Cancer Research, 1997. **3**(10): p. 1889-97.
113. Kaye, F.J., *RB and cyclin dependent kinase pathways: defining a distinction between RB and p16 loss in lung cancer*. Oncogene, 2002. **21**(45): p. 6908-14.
114. Sato, M., T. Taniguchi, and N. Tanaka, *The interferon system and interferon regulatory factor transcription factors -- studies from gene knockout mice*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2001. **12**(2-3): p. 133-42.
115. Atkins, M.B., *Cytokine-based therapy and biochemotherapy for advanced melanoma*. Clinical Cancer Research, 2006. **12**(7 Pt 2): p. 2353s-2358s.
116. Hamm, C., et al., *Biochemotherapy for the treatment of metastatic malignant melanoma: a systematic review*. Cancer Treat Rev, 2008. **34**(2): p. 145-56.
117. Takaoka, A., et al., *Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence*. Nature, 2003. **424**(6948): p. 516-23.
118. Sandoval, R., et al., *Different requirements for the cytostatic and apoptotic effects of type I interferons. Induction of apoptosis requires ARF but not p53 in osteosarcoma cell lines*. J Biol Chem, 2004. **279**(31): p. 32275-80.
119. Bergman, P.J., et al., *Development of a xenogeneic DNA vaccine program for canine malignant melanoma at the Animal Medical Center*. Vaccine, 2006. **24**(21): p. 4582-5.
120. Ottnod, J.M., et al., *A retrospective analysis of the efficacy of Oncept vaccine for the adjunct treatment of canine oral malignant melanoma*. Vet Comp Oncol, 2013. **11**(3): p. 219-29.
121. Grosenbaugh, D.A., et al., *Safety and efficacy of a xenogeneic DNA vaccine encoding for human tyrosinase as adjunctive treatment for oral malignant melanoma in dogs following surgical excision of the primary tumor*. Am J Vet Res, 2011. **72**(12): p. 1631-8.

122. Finocchiaro, L.M., et al., *Cytokine-Enhanced Vaccine and Interferon- β plus Suicide Gene Therapy as Surgery Adjuvant Treatments for Spontaneous Canine Melanoma*. Hum Gene Ther, 2015. **26**(6): p. 367-76.
123. Westberg, S., et al., *Treatment efficacy and immune stimulation by AdCD40L gene therapy of spontaneous canine malignant melanoma*. J Immunother, 2013. **36**(6): p. 350-8.

ANEXO A

Ficha Anamnese

Paciente: _____ Espécie: _____

Raça: _____ Idade: _____

Responsável: _____

Histórico/Observações: _____

ANEXO B

Serviço Público Federal
Conselho Federal de Medicina Veterinária

Anexo III

Nome do Estabelecimento
Endereço completo
CNPJ – Inscrição estadual – Nº Registro no CRMV
ou
Nome do Médico Veterinário
Endereço completo
CRMV – RG – CPF

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Autorizo a realização do procedimento cirúrgicono animal de nome....., espécie....., raça, sexo, idade (real ou aproximada)....., pelagem, outras informações que possibilitem a identificação do animal (ex. microchip)..... a ser realizado pelo(a) Médico(a) Veterinário(a) CRMV-.....

Identificação do responsável pelo animal:
Nome.....
RG..... CPF.....
Endereço completo
Telefone/email

Declaro ter sido esclarecido acerca dos possíveis riscos inerentes, durante ou após a realização do procedimento cirúrgico citado, estando o referido profissional isento de quaisquer responsabilidades decorrentes de tais riscos.

Cidade, _____, ____de _____ de ____.

Assinatura do responsável pelo animal

ANEXO C

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Estamos solicitando o consentimento do(a) senhor(a) para realizar uma pesquisa. O seu animal é portador de um tumor de cavidade oral, e por isso será submetido à cirurgia para retirá-lo. Uma fração desse tumor será encaminhada para diagnóstico e o restante do material não será utilizado.

O título do projeto é: “Estabelecimento de linhagens celulares de melanoma canino, caracterização molecular e desenvolvimento como modelo de terapia gênica do câncer”, de responsabilidade da pesquisadora Gissele Rolemberg Oliveira Silva. O melanoma de cavidade oral é um dos tumores mais agressivos em seres humanos e apresentam resposta limitada às terapias conhecidas, como a quimioterapia e a radioterapia. A terapia gênica consiste na inserção de genes normais nas células e tecidos de um indivíduo para o tratamento de uma doença como o câncer e revelou se tratar de uma modalidade terapêutica promissora na medicina. Em cães essa terapia ainda não foi amplamente testada e por isso estamos realizando este estudo, na tentativa de estabelecer um modelo de pesquisa animal, com objetivo de ampliar nossos conhecimentos sobre causas e possíveis tratamentos de melanoma.

Solicitamos uma amostra do produto da cirurgia, que seria desprezado, bem como uma amostra de 5ml de sangue, para realizar o estudo. Esta pesquisa em nada vai interferir com o tratamento do seu animal, não vai trazer danos a ele e não implica em qualquer custo. A pesquisa também não trará benefícios diretos ao animal. Entretanto, é possível que a melhor compreensão sobre a doença e sobre a resposta do melanoma canino frente à terapia gênica nos ajude, no futuro, a oferecer maneiras mais efetivas de tratamento. A mostra de sangue será utilizada para determinar a sequência do DNA. A amostra de tecido será tratada por terapia gênica para modelo experimental. Estas análises serão realizadas nas dependências do Laboratório de Vetores Virais do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo vinculado à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LVV – ICESP - FMUSP).

DECLARAÇÃO DO MÉDICO VETERINÁRIO

Declaro que expliquei essa proposta de pesquisa, com todos os detalhes necessários ao responsável pelo animal. No meu julgamento, houve acesso a todas as informações disponíveis, incluindo os riscos e benefícios, para que se possa fazer uma decisão informada.

Nome do médico veterinário: _____

CRMV: _____ Data: _____

Assinatura do Médico Veterinário: _____

DECLARAÇÃO DO RESPONSÁVEL

Declaro ter sido esclarecido sobre a pesquisa, e concordar com sua execução.

Declaro também que minha participação é voluntária

Nome do responsável: _____

RG: _____ Data _____

Nome do animal: _____

Assinatura do Responsável: _____

ANEXO D

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado “**Estabelecimento de linhagens celulares de melanoma canino, caracterização molecular e desenvolvimento como modelo de terapia gênica do câncer**” protocolo nº **007/16** sob a responsabilidade de **Bryan Strauss** e **Gissele Rolemberg Oliveira Silva**, apresentado pelo Departamento de Radiologia e Oncologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 23.03.16

Finalidade	☐ Ensino ☒ Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Abril/2017
Espécie/linhagem	Camundongo Nude
Nº de animais	72
Peso/Idade	6 semanas
Sexo	fêmea
Origem	Biotério Central da FMUSP

CEUA-FMUSP, 23 de Março de 2016

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

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua.fm@usp.br

ANEXO E

Experiment Name: **moi 25**
 Specimen Name: **BAN(22-06)(1)**
 Sample Name: **O**
 Showing **10,000** of **10,000** events.

Controle

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	10,000	100.000%	100.000%
R1	9,204	92.040%	92.040%
R2	8,747	95.035%	87.470%
R3	366	3.977%	3.660%
R4	9,767	97.670%	97.670%
R5	233	2.330%	2.330%

Experiment Name: **moi 25**
 Specimen Name: **BAN(22-06)(1)**
 Sample Name: **GFP**
 Showing **10,000** of **10,000** events.

PGeGFP

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	10,000	100.000%	100.000%
R1	9,182	91.820%	91.820%
R2	7,101	77.336%	71.010%
R3	1,964	21.390%	19.640%
R4	8,206	82.060%	82.060%
R5	1,794	17.940%	17.940%

Experiment Name: **moi 25**
 Specimen Name: **BAN(22-06)(1)**
 Sample Name: **DOXO**
 Showing **10,000** of **10,000** events.

DOXO

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	10,000	100.000%	100.000%
R1	7,669	76.690%	76.690%
R2	3,015	39.314%	30.150%
R3	4,260	55.548%	42.600%
R4	5,797	57.970%	57.970%
R5	4,203	42.030%	42.030%

Experiment Name: **moi 25**
 Specimen Name: **BAN(22-06)(1)**
 Sample Name: **NUTLIN1**
 Showing **10,000** of **10,000** events.

NUTLIN

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	10,000	100.000%	100.000%
R1	8,664	86.640%	86.640%
R2	5,004	57.756%	50.040%
R3	3,394	39.174%	33.940%
R4	6,699	66.990%	66.990%
R5	3,301	33.010%	33.010%