

JOYCE PIRES DE CARVALHO

**Aspectos etiológicos e epidemiológicos do melanoma de mucosa oral
de cães**

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

Programa de Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan
Dagli

SÃO PAULO

2022

JOYCE PIRES DE CARVALHO

**Aspectos etiológicos e epidemiológicos do melanoma de
mucosa oral de cães**

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

Programa de Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia
Zaidan Dagli

SÃO PAULO

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Carvalho, Joyce Pires de
Aspectos etiológicos e epidemiológicos do melanoma
de mucosa oral de cães / Joyce Pires de Carvalho. --
São Paulo, 2022.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.
Orientadora: Maria Lúcia Zaidan Dagli.

Descritores: 1.Melanoma 2.Boca 3.Cães
4.Microbioma 5.RNA ribossômico 16S 6.Epidemiologia

USP/FM/DBD-115/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

À minha família, pelo incentivo infinito.

Pesquisar é acordar para o mundo (Marcelo Lamy).

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof^a Dr^a Maria Lúcia Zaidan Dagli, pela generosidade em partilhar de seus conhecimentos e por sempre me incentivar a ir adiante, desde o início da graduação em medicina veterinária.

À Prof^a Dr^a Laura Sicchero e toda a equipe de seu laboratório, Silvaneide Ferreira e João Sobrinho, pela paciência de ensinar e compartilhar o seu valioso tempo e conhecimento em biologia molecular.

Ser professor é atribuição das mais nobres. Através do ensino é possível iluminar o caminho de outros, e manter o conhecimento e desenvolvimento humanos, como uma chama acesa.

Aos médicos veterinários especialistas Denner Santos dos Anjos e Caroline Hosawa, pela dedicação genuína em compartilhar dados valiosíssimos de seus tão queridos pacientes oncológicos.

À Carolina Dagli Hernandez, pela contribuição fundamental com os estudos estatísticos deste trabalho.

Às minhas companheiras de jornada acadêmica, Gabriela Fernandes Toledo e Marcella Collaneri Carrilho, que estiveram comigo e compartilharam a alegria de cada etapa concluída.

Aos cães com melanoma oral que participaram deste projeto, vitimados pelo avanço galopante do câncer, nosso agradecimento. Que possamos contribuir, ao menos a fé, com o desenvolvimento de métodos preventivos e tratamentos mais eficazes.

A todos os responsáveis pelos animais do projeto, que encontrem conforto em seus corações e tenham certeza de sua contribuição para o avanço da oncologia veterinária.

À CAPES, pela bolsa que tornou possível este projeto.

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F.

Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

RESUMO

Carvalho JP. *Aspectos etiológicos e epidemiológicos do melanoma de mucosa oral de cães* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

O melanoma oral é o quarto tipo de câncer mais comum em cães; tem comportamento agressivo, infiltrativo, com alto potencial metastático e prognóstico reservado. Apesar de sua elevada frequência na clínica de pequenos animais, a etiologia dessa neoplasia ainda não foi determinada. Estudos para identificar possíveis agentes etiológicos, como poluentes ambientais, hábitos alimentares e herança genética, são necessários para determinar os fatores que podem contribuir para o desenvolvimento do melanoma oral canino. Viver em ambiente próximo a fumantes, ou fumo passivo de tabaco, e gengivite crônica são hipóteses etiológicas mencionadas em literatura, porém, ainda não comprovadas. Em medicina humana já foi estabelecido que o microbioma e os produtos de seu metabolismo se relacionam de maneira complexa com o hospedeiro, suprimem e estimulam a população de microrganismos comensais e patogênicos, e podem ser considerados carcinógenos biológicos, como é o caso da *Helicobacter pylori* no câncer gastroesofágico. O primeiro estudo sobre microbioma oral canino foi publicado em 2012. No entanto, a relação entre o microbioma oral de cães e o melanoma oral ainda não foi descrita pela literatura. O objetivo geral deste trabalho foi avaliar aspectos etiológicos e epidemiológicos do melanoma de mucosa oral de cães. Para tanto, trinta animais foram incluídos no estudo, sendo quinze cães portadores de melanoma oral e quinze cães saudáveis. Os dois grupos contaram com indivíduos de mesmas idades, raças e sexos. Três estudos foram realizados com estes trinta cães. O primeiro estudo consistiu da aplicação de questionário epidemiológico aos tutores de todos os animais, visando conhecer hábitos alimentares, exposição a poluentes como fumaça de cigarro e contato com produtos químicos, para identificar potenciais fatores etiológicos do melanoma oral. O segundo estudo consistiu na caracterização do microbioma oral por sequenciamento do rRNA de 16S, para descrever as bactérias presentes na cavidade oral dos trinta cães. O terceiro estudo consistiu de ensaios de PCR para possível amplificação de Taupapilomavírus com *primers* específicos em melanomas orais caninos, uma vez que este vírus apresenta tropismo por células da mucosa e poderia

estar envolvido na carcinogênese oral. Os resultados revelaram que a gengiva foi a localização anatômica mais frequente em que o melanoma foi encontrado (47% dos cães), o que levanta a hipótese de o tumor ser secundário à inflamação crônica, ao acúmulo de microrganismos e substâncias químicas nas bolsas subgengivais. Todos os animais incluídos no estudo eram idosos e apresentavam doença periodontal em diferentes gravidades. Não se obteve nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as respostas ao questionário dos tutores de cães portadores de melanoma oral e controles; portanto neste estudo nenhum fator ambiental pôde ser apontado como possível fator etiológico do melanoma oral. *Tanerella forsythia* e *Porphiromonas gingivalis* são bactérias envolvidas na patogenia da doença periodontal e do câncer esofágico em humanos, e ambas foram encontradas em quantidade significativamente maior na mucosa oral de cães portadores de melanoma oral. Por este motivo, a presença destas bactérias pode estar associada à doença periodontal e inflamação crônica, potencialmente levando à carcinogênese. Não foi detectada a presença do papilomavírus em nenhuma amostra de melanoma oral. Os autores deste trabalho encorajam mais estudos metagenômicos e epidemiológicos com maior número de animais, para garantir a confiabilidade dos resultados.

Descritores: Melanoma; Boca; Cães; Microbioma; RNA ribossômico 16S; Epidemiologia.

ABSTRACT

Carvalho JP. *Etiological and epidemiological aspects of oral mucosal melanomas of the dog [dissertation]*. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

Oral melanoma is the fourth most common type of cancer in dogs; it is aggressive, highly metastatic and represents a poor prognosis for the patient. Despite its high frequency in small animal medicine, its etiology is yet to be determined. Studies to identify possible etiological agents, such as environmental pollutants, dietary habits and genetic inheritance, are needed to determine the factors that may contribute to the development of canine oral melanoma. Living in an environment close to smokers, secondhand tobacco smoke and chronic gingivitis are etiological hypotheses mentioned in the literature, however, not yet proven. In human medicine it has been established that the microbiome and the products of its metabolism are in a complex way related to the host, suppress and stimulate the population of commensal and pathogenic microorganisms, and are considered biological carcinogens, such as *H. pylori* in gastrointestinal cancer. The first study on the canine oral microbiome was published in 2012, however, the relationship between the oral microbiome of dogs and oral melanoma has not been described by literature. The general objective of this work was to evaluate etiological and epidemiological aspects of melanoma of the oral mucosal of dogs. Therefore, thirty animals were included in the study, fifteen dogs with oral melanoma and fifteen healthy dogs. Both groups had individuals of the same ages, races and sexes. Three studies were performed with these thirty dogs. The first study consisted of the application of an epidemiological questionnaire to the guardians of all animals, in order to learn about eating habits, exposure to pollutants such as cigarette smoke and contact with chemical products, in order to identify potential etiological factors for oral melanoma. The second study consisted of the characterization of the oral microbiome by 16S rRNA sequencing, to describe the bacteria present in the oral cavity of thirty dogs. The third study consisted of PCR

assays for possible amplification of Taupapillomaviruses with specific primers in canine oral melanomas, since this virus presents tropism for mucosal cells and could be involved in oral carcinogenesis. The results revealed that the gingiva was the most frequent anatomical location in which melanoma was found (47% of the dogs), which raises the hypothesis that the tumor is secondary to chronic inflammation, the accumulation of microorganisms and chemical substances in the subgingival pouches. All animals included in the study were elderly and had periodontal disease in different phases. There was no statistically significant difference between the responses to the questionnaire from tutors of dogs with oral melanoma and controls; therefore, in this study, no environmental factor could be appointed as a possible etiological factor for oral melanoma. *Tanerella forsythia* and *Porphiromonas gingivalis* are bacteria involved in the pathogenesis of periodontal disease and esophageal cancer in humans, and both were found in significantly greater amounts in the oral mucosa of dogs with oral melanoma. For this reason, the presence of these bacteria may be associated with periodontal disease. The presence of papillomavirus was not detected in any sample of oral melanoma. The authors of this work encourage more metagenomic and epidemiological studies with a larger number of animals to ensure the reliability of the results.

Descriptors: Melanoma; Mouth; Dogs; Mycobiome; RNA, Ribosomal, 16S; Epidemiology.

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

rRNA 16 s – RNA ribossomal 16s

c-kit – Mast stem cell growth factor receptor (receptor do fator de crescimento)

GIVCS – Global Initiative for Veterinary Cancer Surveillance

ALT – Alanina Aminotransferase

FA – Fosfatase alcalina FA,

AST – Aspartato aminotransferase

TNM – Tumor, linfonodo e metástases

OMS – Organização Mundial da Saúde

p53 – TP53; proteína de tumor

EUA – Estados Unidos da América

FDA – Food and Drug Administration

DNA – Ácido desoxirribonucleico

pH – Potencial hidrogeniônico

EGF – Fator de Crescimento Epidérmico LPS – Lipopolissacarídeo

TLR4 – Toll-like 4

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos

RNA – Ácido ribonucleico

mRNA – RNA mensageiro

RNPs – Ribonucleoproteínas

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PGM – Personal Genome Machine Mbp – Megabase pair

Bp – Pares de base

Gbp – Gigabase pairs

CVP-1 – Papillomavirus canino tipo 1

USP – Universidade de São Paulo

FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

ICESP – Instituto do Câncer do Estado de São Paulo

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

ANCLIVEPA – Associação nacional dos clínicos veterinários de pequenos animais

Sumário

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 | Melanoma de mucosas em humanos..... | 1 |
| 1.2 | Melanoma oral canino..... | 4 |
| 1.3 | Estadiamento e Prognóstico do Melanoma oral canino..... | 9 |
| 1.4 | Tratamento do melanoma oral canino..... | 12 |
| 1.5 | Microbioma oral humano..... | 16 |
| 1.6 | Microbioma oral em cães..... | 18 |
| 1.7 | Doença periodontal..... | 21 |
| 1.8 | Tecnologia de sequenciamento do gene rRNA 16S..... | 24 |
| 1.9 | Papiloma Vírus Canino..... | 29 |
| 2 | OBJETIVOS GERAIS..... | 32 |
| 2.1 | Objetivos específicos..... | 32 |
| 3 | Material e Métodos..... | 33 |
| 3.1 | Aspectos éticos..... | 33 |
| 3.2 | Cães do grupo melanoma..... | 33 |
| 3.3 | Cães do grupo controle..... | 34 |
| 3.4 | Aplicação do questionário epidemiológico..... | 34 |
| 3.5 | Análise do Microbioma pelo sequenciamento de RNA 16S..... | 35 |
| 3.5.1 | Coleta de swabs orais..... | 35 |
| 3.5.2 | Preparo da biblioteca e reação de PCR multiplex para identificação do microbioma oral de cães..... | 35 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.6 | Detecção de Papilomavírus canino pela reação de PCR..... | 39 |
| 3.7 | Análise estatística..... | 41 |
| 4 | Resultados..... | 42 |
| 4.1 | Características dos cães com melanoma oral..... | 42 |
| 4.2 | Características do microbioma oral dos cães com melanoma oral..... | 47 |
| 4.2.1 | Tannerella forsythia e Peptostreptococcus sp..... | 50 |
| 4.3 | PCR para papilomavírus canino nas amostras de melanoma oral..... | 51 |
| 5 | Discussão..... | 52 |
| 6 | Conclusões..... | 57 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 59 |
| 7 | | 59 |

| | | |
|--|--|----|
| | ANEXO II – Questionário epidemiológico aplicado a todos os responsáveis pelos animais incluídos neste projeto..... | 65 |
| | ANEXO III - Certificado de aprovação da CEUA FMVZ USP..... | 68 |

Lista de tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Gêneros de bactérias encontradas na cavidade oral canina..... | 21 |
| Tabela 2: Primers desenhados para o estudo..... | 40 |
| Tabela 3: Razão de chances (RC) do melanoma oral em cães com doença periodontal..... | 44 |
| Tabela 4: Distribuição dos cães por tipo de focinho..... | 46 |
| Tabela 5: Resposta para a pergunta 10- Distribuição dos cães por escore corporal..... | 47 |
| Tabela 6: Levantamento de tutores fumantes..... | 47 |
| Tabela 7: Apresentação das variáveis epidemiológicas estudadas neste projeto..... | 48 |
| Tabela 8: Média das bactérias encontradas nos cães com melanoma e saudáveis..... | 52 |
| Tabela 9: Resumo dos ensaios PCR realizados – 2019..... | 54 |

Lista de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1: Cão portador de melanoma oral melânico..... | 8 |
| Figura 2: Cão portador de melanoma oral. Imagem cedida por Denner Santos dos Anjos | 9 |
| Figura 3: Cão com melanoma oral, antes e depois do tratamento com eletroquimioterapia. Imagem cedida por Denner Santos dos Anjos..... | 17 |
| Figura 4: Estrutura de um ribossomo..... | 27 |
| Figura 5: 9 regiões hipervariáveis do gene rRNA 16S..... | 28 |
| Figura 6: Raças dos cães neste projeto..... | 44 |
| Figura 7: Localização anatômica dos tumores..... | 45 |
| Figura 8: Bactérias encontradas..... | 51 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Melanoma de mucosas em humanos

Os melanomas de mucosa têm origem nos melanócitos epiteliais das mucosas; são neoplasias malignas raras em seres humanos, e representam entre 0,8% e 3,7% dentre todos os tipos de melanoma, com incidência de 800 casos novos diagnosticados por ano nos Estados Unidos (PROTEAU et. al, 2019).

A etiologia do melanoma oral em humanos e animais está em fase de elucidação, acredita-se que ocorra a partir da hiperplasia secundária a uma injúria crônica, de causas mecânicas, inflamatórias ou infecciosas.

O consumo de álcool, higiene oral inadequada, doença periodontal e o hábito de fumar são hipóteses para sua etiologia, porém ainda sem comprovação definitiva (TEIXEIRA, 2011). É sabido que a radiação solar não é um fator etiológico devido à pouca ou nenhuma exposição solar das mucosas, por serem regiões mais protegidas no corpo.

O melanoma é uma neoplasia originária de melanócitos, que são células produtoras de melanina. Seu sítio anatômico mais comum é a pele, e menos frequentemente cavidade oral, olhos, mucosas anorretais e vulvovaginais. Esta neoplasia cursa com prognóstico ruim, com sobrevida de apenas 25% dos pacientes em um período de cinco

anos, em comparação a 80% de pacientes que sobrevivem por 5 anos com melanomas cutâneos (GOLDEMBERG, 2020).

A melanina é um pigmento que protege a pele e os olhos da radiação ultravioleta. Além de produzi-la, os melanócitos têm a função de transportá-la para os queratinócitos por meio dos melanosomos, organelas intracelulares armazenadoras de melanina. A radiação ultravioleta não foi associada à carcinogênese do melanoma de mucosas, por serem tecidos não expostos à luz solar. Ainda não é clara a função de melanócitos no epitélio de mucosas, mas há evidência de que tenham importância imunológica (TYRELL, 2018).

O fumo foi sugerido como fator de risco para o melanoma de mucosa oral em humanos devido a sua alta prevalência entre fumantes. A etiologia viral é pouco provável, pois nenhum estudo mostrou evidência de correlação entre o melanoma de mucosa e os vírus do papiloma, herpes e poliomavírus (ASCIERTO, 2017).

O melanoma de mucosas em humanos ocorre geralmente em indivíduos entre 65 e 79 anos, geralmente até duas décadas mais tardiamente que o melanoma cutâneo; é igualmente encontrado em mulheres e homens. A localização no lábio é mais predominante em homens. As etnias mais acometidas são indivíduos negros, japoneses e indianos (ZITO, 2020).

Não há predileção sexual e a média de idade nos pacientes acometidos situa-se entre cinquenta e cinco a sessenta e oito anos, mas pode ocorrer em indivíduos de qualquer faixa etária. As etnias asiáticas, africanas, hispânicas e indianas apresentam maior incidência de casos. A principal localização dos melanomas de mucosa é no

palato duro e alvéolo dentário, e na maioria dos casos ocorre o denominado melanoma de novo, que se trata de uma formação que ocorre a partir de uma lesão existente ou como uma nova lesão (WILLIAMS, 2019).

O diagnóstico é feito quando os pacientes procuram ajuda médica após o aparecimento de uma lesão única pigmentada, geralmente indolor, que com o tempo se torna nodular, ulcerada e hemorrágica, com lesões satélites adjacentes. Pode ocorrer metástase para linfonodos cervicais, relatado em até 30% dos casos. Apenas uma pequena porcentagem dos melanomas de mucosa em humanos são amelanícos, que apresentam comportamento biológico mais agressivo em comparação aos melanomas melânicos (WILLIAMS, 2019).

O tratamento preconizado para o melanoma é a excisão cirúrgica com margens livres de células neoplásicas, se a doença é focal. Devido ao diagnóstico ser tardio na maioria dos casos, as metástases são comuns e ocorrem apesar de tratamentos como imunoterapia e radioterapia. O Ipilumab é o anticorpo contra CTLA-4 (antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico), que estimula a ativação e proliferação de células-T, o que resulta em recrutamento de mais células-T e maior atividade diante das células tumorais alvo. O Nivolumab é um anticorpo monoclonal que bloqueia PD-1; inibidor de check point celular, também resulta em aumento da função de células-T. Devido a estes dois mecanismos distintos, ocorre sinergia para atacar as células tumorais (SOHAL, 2020).

O melanoma de mucosas em humanos e na cavidade oral de cães compartilha mutações nos genes BRAF e NRAS, e também mutações em c-kit, sendo seguro afirmar

que esta neoplasia apresenta características clínicas e histopatológicas semelhantes entre as espécies humana e canina, fato este que representa oportunidade para abordar o melanoma oral canino como modelo pré-clínico para seres humanos (SIMPSON, 2013).

1.2 Melanoma oral canino

A oncologia comparativa é a ciência que estuda o risco de desenvolvimento de tumores entre as espécies, com o objetivo de beneficiar a saúde humana e animal (DALUZ et al., 2022).

O estudo de cânceres de ocorrência natural em cães fornece informações que ajudam na compreensão, diagnóstico e tratamento do mesmo tipo de câncer em humanos, por terem apresentação clínica e fisiopatologia semelhantes (SCHIFFMAN et. al, 2014).

A análise genômica de tumores caninos revelou características compartilhadas entre as duas espécies, fornecendo uma nova visão sobre a base genética do desenvolvimento tumoral. A reprodução de cães de raças puras desenvolve acidentalmente maior predisposição a doenças específicas devido à consanguinidade e endogamia (SCHIFFMAN et. al, 2014).

A maior fonte de dados epidemiológicos sobre câncer animal vem de laboratórios e hospitais veterinários, utilizando classificações não padronizadas, o que pode levar a vieses e limitações para a realização de estudos de oncologia comparativa.

A análise de dados oncológicos em medicina veterinária ainda não é obtida de maneira organizada e sistemática, uma vez que não há sistemas de câncer unificados nacionalmente como ocorre na medicina humana, havendo apenas estudos estatísticos de universidades e iniciativas acadêmicas para este fim, mas que por si só não são capazes de gerar conclusões clínicas e epidemiológicas decisivas sobre os mais diversos tipos de câncer. Recentemente, um grupo internacional denominado Global Initiative for Veterinary Cancer Surveillance (GIVCS), cujas atividades podem ser vistas em www.givcs.org, elaborou um sistema de codificação de neoplasias caninas denominado Vet-ICD-O-canine 1 (Pinello et al., 2022, aceito). Doravante, esse sistema poderá ser usado em registros de câncer de animais, possibilitando a uniformização dos diagnósticos e também a comparação com as neoplasias humanas. O entendimento sobre o câncer e as possibilidades de ferramentas para diagnóstico e tratamento em animais domésticos passou por grandes transformações nas últimas décadas. Apesar deste grande progresso, a doença ainda apresenta alta morbidade e mortalidade em nestas espécies (PANG LY, 2016).

Em cães há diversos tipos histológicos de câncer da cavidade oral, categorizados como não-odontogênicos, que surgem a partir de estruturas da cavidade oral, ou odontogênicos, com origem em estruturas dentárias, estes considerados raros.

A maioria das lesões de cavidade oral em cães são hiperplásicas, inflamatórias e benignas, como a hiperplasia gengival e fibroma odontogênico, e ocorrem em cães de meia idade, sem predileção sexual.

Um artigo publicado por Mikiewicz et al. em 2019 realizou um estudo retrospectivo das afecções de cavidade oral em cães e dentre todos os casos avaliados, 32,9% se tratavam de uma neoplasia maligna, a maior parte deles melanoma oral de alto grau, seguido de carcinoma de células escamosas e fibrossarcoma. Todos os cães com melanoma incluídos no artigo citado eram idosos; apesar menos frequente, este tipo de câncer também ocorre em indivíduos jovens.

A neoplasia oral de origem não-odontogênica mais comum no cão é o melanoma, tipo de câncer originário dos melanoblastos e melanócitos da neuroectoderme, que pode ter duas formas: melânica, pigmentada e amelânica, não pigmentada.

O melanoma é o tipo de câncer mais frequente na cavidade oral do cão, e raramente ocorre em locais expostos ao sol, não sendo então associado à radiação ultravioleta. Sua origem está relacionada à presença de melanina, ocorre com maior frequência em cães de raças em que a mucosa oral é pigmentada, como Cocker Spaniel, Poodle, Chow Chow, Golden Retriever, Dachshund e cães sem raça definida. Os animais acometidos são geralmente geriátricos, estando entre dez e doze anos de idade, e não há predileção sexual (NISHIYIA, 2016).

O melanoma oral canino apresenta comportamento altamente agressivo e poucas opções de tratamento que proporcionem longos períodos de remissão. Tumores espontâneos em cães são modelos experimentais mais adequados que os experimentos conduzidos em camundongos para estudos da carcinogênese em tumores humanos, oferecem resultados mais fidedignos, uma vez que os animais de companhia domésticos

compartilham o mesmo ambiente, portanto, são possivelmente expostos aos mesmos carcinógenos ambientais (ATHERTON et. al, 2016).

Holanda et al., 2022, avaliaram a influência ambiental no desenvolvimento de linfomas não Hodgkin em cães da cidade de Recife, PE. O estudo caso-controle incluiu 89 cães portadores de linfoma e oitenta e nove controles, e demonstrou que a ocorrência de linfomas está relacionada à exposição de carcinógenos ambientais.

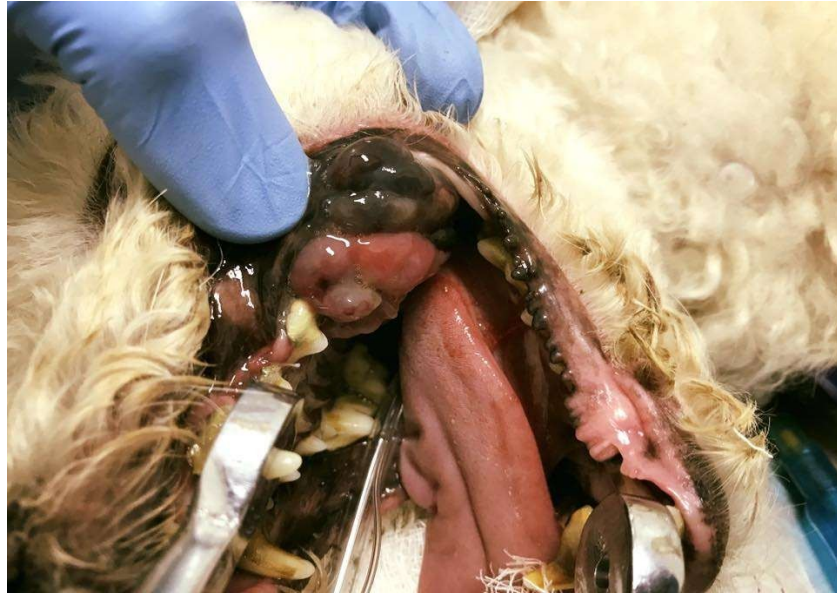
O aspecto macroscópico do melanoma oral canino é de um tumor uniformemente marrom ou preto; em alguns casos pode ter diversas cores como cinza, preto, vermelho e marrom na mesma lesão, além de despigmentação. Focos infiltrativos podem circundar o foco primário. Em melanomas amelanicos não há pigmentação. A superfície tumoral é lisa, com mucosa íntegra ou ulcerada, com sangramentos, fraturas dentárias patológicas, dor, mobilidade de dentes e cicatrização retardada.

Linfonadenopatias adjacentes podem também estar presentes e indicam prognóstico ruim (MELETI, 2007).



Figura 1: Cão portador de melanoma oral melânico
Imagem cedida pelo Hospital Veterinário ANCLIVEPA-SP

**Figura 2: Cão portador de melanoma oral misto.
Imagem cedida por Denner Santos dos Anjos**



Os aspectos histopatológicos do melanoma oral e de mucosas são semelhantes, incluindo uma grande variedade de morfologias celulares, como epitelióide, fusiforme e células redondas melanocíticas. Os melanomas com padrão celular epitelióide e fusiforme podem ser facilmente confundidos com carcinoma indiferenciado, linfoma de células grandes, sarcomas, carcinomas sarcomatóides ou processos inflamatórios. Os melanomas amelanícos requerem imuno-histoquímica para estabelecer e confirmar seu diagnóstico. Os marcadores para identificação dos melanócitos são HMB-45, S100, Melan-A, MITF e tirosinase (CARVALHO, 2019).

1.3 Estadiamento e Prognóstico do Melanoma oral canino

Apesar de ter aspectos clínicos, diagnósticos e terapêuticos descritos pela literatura, a etiologia do melanoma oral permanece indeterminada (MELETI, 2006).

De acordo a Organização Mundial da Saúde (OMS) os fatores determinantes para a agressividade e comportamento biológico do melanoma oral canino são o tamanho, localização, estágio e características histológicas.

O diagnóstico do melanoma oral canino é feito geralmente em estágios mais avançados devido a seu crescimento rápido, aliado à localização em cavidade oral que pode dificultar a observação da lesão, que ocorre geralmente quando há sinais clínicos mais evidentes como halitose, perda de dentes por fratura patológica após a invasão de tecidos locais, sangramentos, disfagia, disfonia, prostração, perda de peso e frequentemente metástases à distância (BERGMAN, 2007).

Devido ao fato de a maioria dos tumores apresentarem-se em estágios avançados, com invasão óssea, a cirurgia é muito agressiva e oferece prognóstico reservado.

A proliferação tumoral pode ocorrer nas seguintes localizações, pela ordem de sua maior ocorrência: gengiva, lábios, língua e palato duro. O comportamento mais comum deste tipo de câncer é infiltração local, recorrência de metástase para linfonodos regionais, e, menos frequentemente em pulmões ou outros órgãos.

O diagnóstico do melanoma oral pode ser desafiador porque há uma grande variação da pigmentação, que pode estar completamente ausente nos melanomas amelanóticos,

cujo comportamento biológico apresenta-se com maior agressividade. Outro ponto importante que representa maior dificuldade no diagnóstico é a grande variedade de características microscópicas, pois podem mimetizar carcinomas, sarcomas, linfomas e tumores osteogênicos. Portanto, a confirmação de que é neoplasia originária de melanócitos em melanomas amelanóticos por imuno-histoquímica é frequentemente necessária (RAMOS VARA et. al, 2000).

A primeira etapa para definir a conduta terapêutica e determinar o prognóstico do animal diagnosticado com melanoma oral é a verificação completa de seu estado geral em exame físico, identificar o escore corporal, a presença de comorbidades, endo e ectoparasitas e instituir o tratamento em casos de doenças concomitantes.

Deve-se coletar amostras de sangue para realização de exames bioquímicos de função renal (enzimas: ureia e creatinina), função hepática (enzimas: alanina aminotransferase, ALT, fosfatase alcalina, FA, aspartato aminotransferase, AST), hemograma, glicemia, triglicerídeos totais e colesterol (Joubert, 2007).

As ferramentas de diagnóstico por imagem são indispensáveis na etapa do estadiamento clínico e cirúrgico. A radiografia torácica em três projeções é capaz de revelar a presença de metástases em parênquima pulmonar e espaço mediastinal. A ultrassonografia abdominal total identifica metástases em órgãos nobres como fígado, baço, rins, glândulas adrenais e linfonodomegalias, além de descrever o aspecto geral dos órgãos por meio de uma varredura sistematizada (Joubert, 2007).

Radiografias de crânio são rotineiramente realizadas na fase de triagem de tumores orais caninos, no entanto, fornecem informações limitadas quanto ao impacto da

formação nas adjacências, dada a sobreposição de estruturas dentárias e ossos da face. As radiografias podem detectar lise óssea apenas quando ao menos 40 % do tecido estiver acometido, além de não possibilitar a observação de linfonomegalias, delimitação do aumento de volume tecidual e limitação de margens (KAFKA et al., 2004).

A tomografia computadorizada é indicada em casos de neoformações orais, pois fornece uma avaliação tridimensional das estruturas e informações importantes como o grau de invasão local do tumor, possibilitando um planejamento cirúrgico muito mais aprofundado e objetivo, pois frequentemente ocorre lise óssea adjacente, havendo então a indicação de mandibulectomia ou maxilectomia (KAFKA et al., 2004).

A ressonância magnética é capaz de fornecer melhores definições dos limites tumorais de maneira mais precisa em relação à tomografia computadorizada, permitindo realizar o cálculo de margens e identificar invasões teciduais mais discretas (KAFKA et al., 2004).

Os exames cardiológicos necessários para definir a aptidão pré-anestésica para a cirurgia são o eco doppler cardiograma, a fim de avaliar a funcionalidade do miocárdio e valvas cardíacas e também o eletrocardiograma, para identificar possíveis arritmias.

Todos os exames mencionados anteriormente servem em conjunto como o planejamento cirúrgico completo, que visa a segurança do animal, além de garantir da melhor maneira possível que ele se beneficie tanto em qualidade de vida quanto em sobrevida livre da doença (Joubert, 2007).

O estadiamento leva em consideração o tamanho do tumor, com base na tabela TNM (Tumor, linfonodo e metástases) da Organização Mundial da Saúde (OMS) (Owen, 1980) que classifica o melanoma oral canino em estágios, e o correlaciona com as condições clínicas do paciente para decidir qual tratamento será instituído. A presença de metástase à distância impede o tratamento cirúrgico. Nesses casos é instituída somente a terapia adjuvante, como a quimioterapia, controle de dor e terapêutica paliativa.

O exame citológico ou histológico de linfonodos regionais deve ser realizado para o estadiamento mais preciso, independentemente do tamanho do linfonodo regional. Dada a correlação entre metástases em linfonodos com a sobrevida mais curta, a biópsia do linfonodo sentinela deve ser parte do protocolo de estadiamento para todos os pacientes com melanoma oral.

O estudo de Sarowitz et. al, 2017 identificou que 75% dos cães que experimentaram recidiva local morreram ou foram eutanasiados em trinta dias desde a recorrência, indicando maior agressividade tumoral em casos de um novo crescimento tumoral.

1.4 Tratamento do melanoma oral canino

O tratamento de escolha para as neoformações orais é a ressecção cirúrgica completa para casos em que não haja metástases à distância, com a premissa de remover

as células neoplásicas nas margens cirúrgicas, fator que influencia a recidiva local. Em tumores com envolvimento ósseo, a excisão deve considerar a ressecção agressiva também de tecidos ósseos, como a mandibulectomia e maxilectomia.

A manutenção da qualidade de vida e funcionalidade oral deve ser também levada em consideração quando cirurgias mutilantes são consideradas. Em alguns casos de tumores muito grandes, o responsável pelo animal não adere ao tratamento devido aos altos riscos de complicações pós operatórias como a osteomielite, infecções, dificuldades no manejo alimentar como a administração de alimentos via sonda esofágica, além do prognóstico pobre em muitos casos, em que há recidiva local em dois meses (SAROWITZ et al., 2017).

A quimioterapia e radioterapia são parte das modalidades de terapia adjuvante, não são efetivas como tratamento primário com o objetivo curativo, o que pode sugerir deficiência em vias apoptóticas provocadas por mutações em genes críticos que regulam a apoptose, como CDKI ou p53 (MODIANO, 1999).

A radioterapia é indicada como tratamento adjuvante, quando a cirurgia não obtém margens adequadas, como tratamento paliativo e controle de dor, para remissão parcial em casos avançados de tumores grandes e cirurgicamente irressecáveis, ou quando a cirurgia agressiva (mandibulectomia ou maxilectomia) foi recusada pelo responsável pelo animal. Quando há metástases em linfonodos regionais também há indicação para a radioterapia (CUNHA, 2018).

O estudo de Cunha et al, 2018, aplicou a radioterapia em vinte cães com intenção paliativa, a fim de reduzir o tamanho do tumor e minimizar o desconforto. 64% dos

animais apresentaram remissão parcial do tumor, 29% remissão completa, e 7% apresentaram estabilidade do quadro com doença estável.

A radioterapia melhorou a qualidade de vida do paciente, mesmo em cães com metástases distantes. Estudos anteriores mostraram que a radioterapia é um tratamento adjuvante eficaz para cães com melanoma oral, com altas taxas de remissão completa ou parcial.

O melanoma é um tumor altamente imunogênico. A vacina Oncept (Merial, Duluth, GA, EUA) contém plasmídeo de DNA-tirosinase, uma glicoproteína essencial para síntese de melanina e é superexpressa em melanomas. A vacina recebeu licença provisória do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (FDA) em 2007 para o tratamento de cães com melanomas em estágios II e III, controlados localmente. Um ensaio clínico com cinquenta e oito cães em estágios II e III com tumores controlados localmente, a vacina aumentou significativamente a sobrevida em comparação a um grupo controle, no entanto o estudo de Ottnod et al em 2013 não demonstrou maior sobrevida com o uso da vacina em uma população semelhante de cães (VERGANTI, 2017).

A vacina Oncept contra melanoma canino tem sido usada em vários países do Reino Unido. No entanto, a literatura não fornece dados conclusivos sobre sua efetividade ou fator prognóstico com base em sua utilização (VERGANTI, 2017).

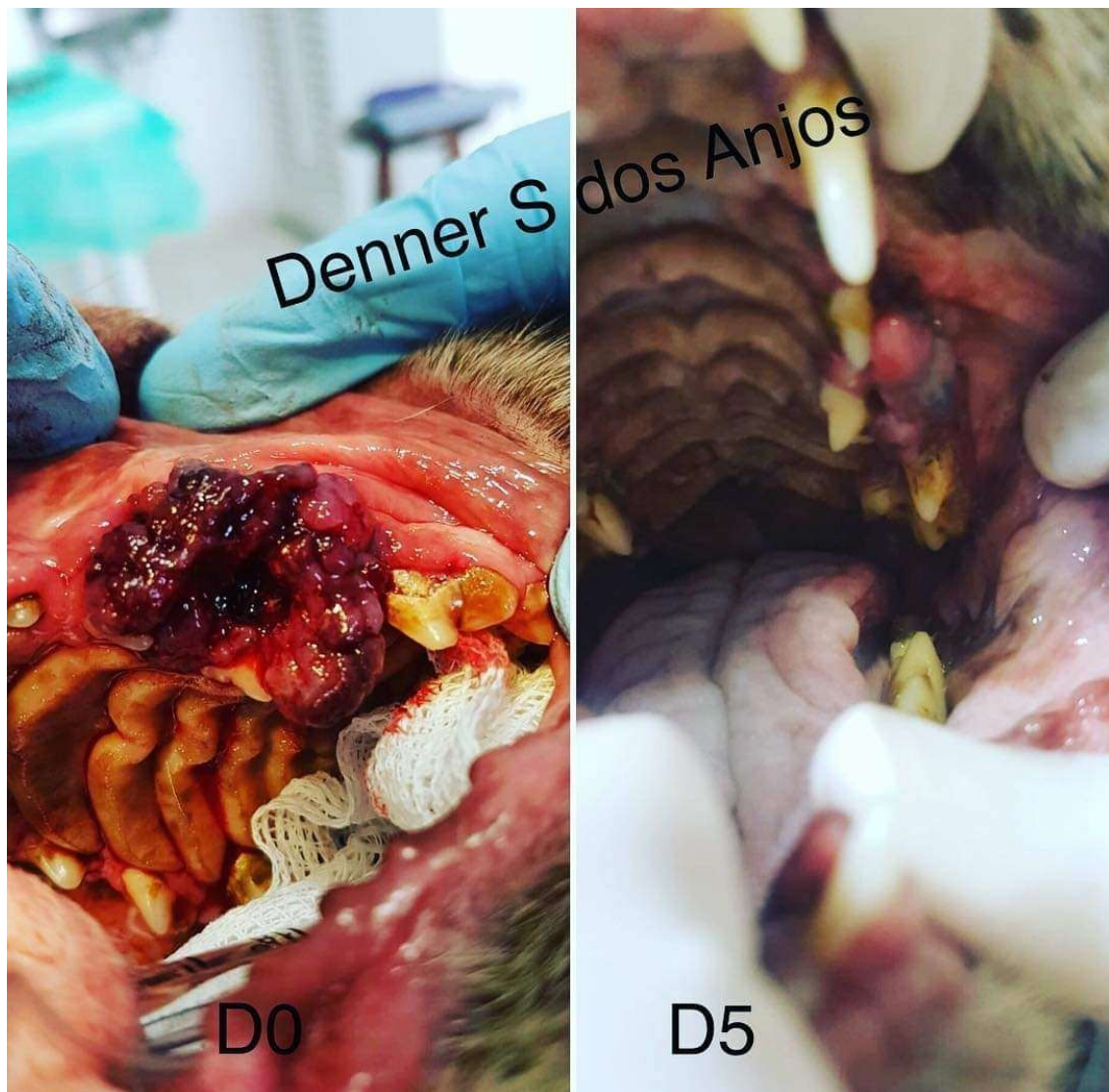
A medicina veterinária não dispõe da variedade de drogas de alvo molecular existentes na medicina humana. O fármaco dessa classe mais frequentemente utilizado é o fosfato de toceranib (Palladia), inibidor de proteínas transmembranares da família de

receptores da tirosina quinase, incluindo receptores de membrana, como o fator de

células-tronco, fator de crescimento endotelial (VEGF-2), fatores de crescimento alfa e beta (PDGF α/β), fator estimulante de colônia 1 (CSF-1) e fator neurotrófico derivado de células da glia (GDNF) (WOUDA, 2018). Este foi o primeiro fármaco antineoplásico veterinário a receber aprovação do Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos, com eficácia comprovada inicialmente contra o mastocitoma canino, mas com boa resposta no tratamento adjuvante de mieloma múltiplo, sarcomas e melanoma (WOUDA, 2018).

A eletroquimioterapia é um tratamento muito bem estabelecido, apresentando resultados excelentes de remissão tumoral em melanomas orais, mastocitomas, sarcomas, tumores perianais e tumores de ducto nasal, com poucos efeitos colaterais. É uma modalidade terapêutica que vem se popularizando em oncologia veterinária desde 2006, quando os procedimentos operacionais padrão foram publicados pela primeira vez. Esta técnica consiste na aplicação de um campo elétrico a um tumor para aumentar a permeabilidade das células ao fármaco quimioterápico bleomicina, administrado previamente pela via endovenosa ou intratumoral em uma dose baixa.

O fármaco cisplatina também pode ser utilizado localmente, e apresenta resultados positivos semelhantes. A indicação da técnica de eletroquimioterapia é para tumores cutâneos e subcutâneos de qualquer origem histológica. Após o campo elétrico ser aplicado, o aumento da permeabilidade da membrana celular é obtido por meio de um princípio denominado eletroporação, que afeta todas as células tumorais do local (TELLADO, 2020).



1.5 Microbioma oral humano

Existe um conjunto de microrganismos que habitam a cavidade oral que são categorizados como o microbioma, que já é definido na literatura como carcinógeno

biológico, pois é capaz de interagir com a imunidade, metabolismo e digestão do hospedeiro de maneira simbiótica ou patológica.

A microbiota bacteriana oral saudável é composta por seis filos principais, Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Spirochaetes e Fusobacterium, que respondem por 94% dos táxons detectados. O gênero *Streptococcus* é o mais predominante, seguido por *Prevotella*, *Veillonella*, *Neisseria*, e *Haemophilus* (CHATTOPADHYAY, 2019).

Mais de 700 espécies de bactérias compõem o microbioma bacteriano oral humano, variando entre os diferentes sítios anatômicos bucais. Álcool e tabaco são agentes etiológicos prováveis para o câncer oral, devido ao fato de alterarem a microbiota local. Tanto bactérias comensais quanto patogênicas têm sido correlacionadas ao desenvolvimento de câncer, por estarem envolvidas na inflamação crônica, que pode levar à carcinogênese. Subprodutos do metabolismo bacteriano podem induzir alterações genéticas em células epiteliais do hospedeiro, que levam à proliferação destas células (CHATTOPADHYAY, 2019).

As bactérias *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* induzem a produção de citocinas inflamatórias, proliferação celular, inibição da apoptose, invasão e migração celular (CHATTOPADHYAY, 2019).

Em humanos, bactérias pertencentes ao filo Synergistetes constituem 0,1% do microbioma da placa de áreas periodontalmente saudáveis, bolsas periodontais mais profundas albergam percentuais acima de 1%, e são mais prevalentes em pacientes com

doenças periodontais do que em pessoas saudáveis. A placa dentária de locais com inflamação ativa exibe altos níveis de espiroquetas e fusiformes (Baumgartner, 2012).

1.6 Microbioma oral em cães

Estudos de microbiota em animais são realizados com muito menor frequência em relação aos estudos em humanos, no entanto, é sabido que o microbioma de cães é muito diferente daquele dos humanos. Com a tecnologia de identificação molecular feita pelo método de sequenciamento do gene rRNA 16S, foi comprovado que bactérias de diferentes hospedeiros vertebrados muitas vezes são espécie específico, apesar das semelhanças fenotípicas e bioquímicas com micro-organismos encontrados no microbioma de seres humanos (DEWHIRST, 2012).

O estudo de Dahlén et. al. em 2012 utilizou o método de sequenciamento do gene rRNA 16S para caracterizar o microbioma da placa subgingival de seis cães. Os resultados demonstraram que as bactérias *Porphyromonas crevioricanis* e *Fusobacterium canifelinum* foram as duas espécies mais prevalentes. Além disso, a flora subgingival predominante em cães mostra grandes semelhanças com os gêneros de bactérias subgingivais de humanos.

O primeiro estudo a descrever o microbioma da cavidade oral de cães saudáveis categorizou os filos de acordo com a quantidade de famílias bacterianas encontradas em cada um deles, revelando que os principais filos que aos quais pertencem a maior quantidade de bactérias são Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes, Spirochaetes, Synergistetes, Actinobacteria e Fusobacteria (DEWHIRST et al., 2012).

A tabela 2 a seguir descreve os gêneros pertencentes a cada um dos principais filios de bactérias encontradas naturalmente na cavidade oral canina.

Tabela 1: Gêneros de bactérias encontradas na cavidade oral canina

| Filo | Gêneros de bactérias | Interação com o hospedeiro |
|----------------|---|-----------------------------------|
| Firmicutes | Bacilli, Clostridia, Erysipelotrichia. | Patogênica oportunista e comensal |
| Proteobacteria | Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteri, Epsilonproteobacteria, Zetaproteobacteria. Acidithiobacillia, Hydrogenophilalia, Oligoflexia. | Comensal Simbiose |
| Bacterioidetes | Bacteroidia, Flavobacteria, Sphingobacteria, Cytophagia, Borrelia, Brachyspira, Serpulina. | |
| Spirochaetes | Leptospira, Leptonema. | Patogênica |
| Synergistetes | Aminiphilus, Aminobacterium, Aminomonas, Anaerobaculum, Cloacibacillus, Dethiosulfovibrio, Jonquetella, Pyramidobacter, Synergistes, Thermoanaerovibrio e Thermovirga. | Patogênica oportunista e comensal |
| Actinobacteria | Streptomyces, Actinobaculum, e Acanobacterium. | Patogênica oportunista e comensal |
| Fusobacteria | Fusobacterium nucleatum Prevotella e Porphyromonas. | Patogênica |

FONTE: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2011.

A maior parte da microbiota dos mamíferos está localizada no trato

gastrointestinal, pertence aos filos Firmicutes ou Bacteroidetes, e é abundante nas fezes e saliva. Bacteroidetes são encontrados na placa dentária, garganta, e em todas as partes do trato gastrointestinal, especialmente em cólon, apesar da variabilidade de pH, nutrientes e oxigênio em suas diferentes localizações, com até 10¹² células/ ml. Devido ao baixo pH, o filo Bacteroidetes representa até 20% das bactérias residentes, o que inclui os gêneros *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Bergeyella*, *Porphyromonas* e *Tannerella*. *Prevotella* é o terceiro gênero mais abundante na microbiota do estômago, depois do *Helicobacter* e do *Streptococcus* (THOMAS et al, 2011).

Bacteroidetes interagem de maneira simbiote com seu hospedeiro, interagem com a função intestinal com enzimas de degradação de polissacarídeos, ativação de respostas imunológicas relacionadas a células-T, controle da população de patógenos bacterianos, síntese de butirato (produto da fermentação do cólon com propriedades antineoplásicas), e também influenciam o metabolismo dos ácidos biliares e compostos mutagênicos (THOMAS et al., 2011).

O grupo de bactérias Synergistetes é um filo recentemente descoberto, com 40 micro-organismos isolados. Este grupo habita principalmente ambientes anaeróbicos, como o trato gastro-intestinal de animais, solo, óleo poços e estações de tratamento de águas residuais. Estão presentes em áreas lesionadas em humanos, como cistos, abscessos e áreas de doença periodontal, sendo então considerados patógenos oportunistas, apesar de também serem encontrados em no microbioma do umbigo e vagina de indivíduos saudáveis (Bhandari et al., 2012).

Os actinomicetos estão no solo, ambientes aquáticos, lixo vegetal, compostos, produtos alimentares, plantas, animais e no ser humano, medeiam a degradação de polímeros complexos, como quitina, lignina e celulose, ajudam no controle de bactérias

e fungos pela produção de agentes antimicrobianos e causam a deterioração de produtos alimentícios armazenados. Sintetizam antibióticos, pigmentos, inibidores de enzimas e enzimas biotecnologicamente relevantes. São patogênicos, causam a podridão da batata

doce, tuberculose, micetomas, actinomicose, pneumonias e abscessos (HASSAN, 2009).

1.7 Doença periodontal

Processos inflamatórios na cavidade oral são causados principalmente por infecções bacterianas, e menos comumente virais e micóticas. Devido à alta temperatura, umidade e sulcos que dificultam a higienização, a cavidade oral é o ambiente ideal para a proliferação de microrganismos.

Ao longo do tempo e resultante de deposição de matéria orgânica, a placa dentária sofre mineralização e saturação com fosfato de cálcio e se transforma em tártaro, cuja superfície oferece condições ideais para a multiplicação de microrganismos patogênicos, que são a principal causa de lesões no periodonto e gengiva. A gengivite bacteriana é a forma inicial e reversível da doença periodontal que, sem tratamento pode levar à periodontite, destruição do osso alveolar e à bacteremia.

O Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) é fundamental para homeostase das células epiteliais e para a resposta imunológica contra inflamações. Em animais utilizados para experimentação, quando as fontes de EGF são restritas após a remoção da glândula salivar submandibular, ocorrem lesões no epitélio gengival e cicatrização retardada da mucosa oral. O grande aumento de EGF na saliva foi observado diretamente após procedimentos periodontais e extração de dentes molares. (SOBCZYŃSKA-RAK, 2018).

A inflamação crônica de dentes, espaço periodontal e mucosa oral podem predispor ao desenvolvimento de neoplasias. Os tumores orais constituem um grupo

relativamente homogêneo com a maioria dos casos diagnosticados como tumores epiteliais, incluindo principalmente o carcinoma de células escamosas. As lesões são mais frequentemente na laringe, seção oral da faringe, cavidade oral, lábios, seios da face ou cavidade nasal. Os diagnósticos menos comuns incluem adenocarcinomas da glândula salivar ou carcinomas microcelulares. Os tumores não epiteliais incluem sarcomas de tecidos moles e ossos, melanomas e linfomas. (SOBCZYŃSKA-RAK, 2018).

Quando ocorrem distúrbios a homeostase do microbioma é quebrada, ocorre a disbiose, condição na qual microrganismos patogênicos se proliferam em detrimento dos comensais, promovem danos no DNA do hospedeiro, a exemplo das bactérias *Escherichia coli* e *Helicobacter pylori*, capazes de modificar condições ambientais locais, como o potencial redox, pH e disponibilidade de nutrientes, permitindo, que microrganismos patogênicos se multipliquem sem controle. Este fator tem sido associado ao câncer de cabeça e pescoço, e especialmente ao câncer oral (FULLER, 2019).

O microbioma oral é a principal causa de periodontite em humanos, devido a bactérias patogênicas que desencadeiam processos inflamatórios resultantes na destruição dos tecidos periodontais, como as bactérias *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *Tannerella forsythia*.

A infecção periodontal já foi associada à carcinogênese em outros sítios anatômicos, principalmente à bactéria *A. actinomycetemcomitans* e lesões gástricas pré-cancerosas como gastrite atrófica crônica, metaplasia intestinal ou displasia, à espécie

de bactérias oral *Fusobacterium nucleatum* ou bacteroides, que estão associados a periodontite, também apresentam indícios de correlação com apendicite e câncer colorretal.

O microbioma oral varia nos pacientes com diferentes tipos de câncer. Em pacientes com câncer de esôfago, as bactérias *Treponema denticola*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus anginosus* são os principais microrganismos, e a bactéria *Fusobacterium nucleatum* é a mais prevalente em pacientes com câncer colorretal.

Existe a hipótese de a perda óssea associada à periodontite ser um fator de risco para o desenvolvimento de câncer oral. As bactérias *Streptococcus intermedius*, *S. constellatus*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. salivarius* foram isoladas de linfonodos cervicais em pacientes com câncer oral (IRANI, 2020).

Rudolf Virchow no século dezenove propôs que a inflamação crônica poderia promover o desenvolvimento do câncer por infiltração de leucócitos no microambiente tumoral. O carcinoma de células escamosas oral representa 90% de todos os tipos de câncer oral.

Dez espécies de bactérias são prevalentes na cavidade oral quando há lesões malignas, sendo *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter segnis*, *Peptostreptococcus stomatis* e *Catonella morbi*, que vivem na mucosa oral como comensais, mas podem ser oportunistas, com provável relação com o Carcinoma de células escamosas oral (KAVARTHAPU, 2021).

A higiene bucal inadequada leva à doença periodontal e gengivite, e pode representar risco para câncer oral. Bactérias Gram negativas encontradas no espaço

subgengival têm uma parede celular que contém Lipopolissacarídeo (LPS), composto por lipídeos e polissacarídeos. No câncer os níveis de LPS são muito altos.

Na imunidade inata e adaptativa, o LPS é reconhecido pela proteína de ligação a LPS (LBP) e pelo receptor Toll-like 4 (TLR4) para estimular a transcrição de citocinas como parte do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), induzindo a inflamação (KAVARTHAPU, 2021).

A periodontite resulta em perda óssea alveolar e dentária. A infiltração de células inflamatórias na mucosa ocorre em condições inflamatórias, que quando crônicas e associadas a mediações imunológicas podem ser responsáveis pela transformação maligna (KAVARTHAPU, 2021).

1.8 Tecnologia de sequenciamento do gene rRNA 16S

Os ribossomos são a organela central do mecanismo de tradução, que é a etapa em que informação genética codificada em RNAs mensageiros (mRNAs) é convertida em cadeias de aminoácidos (polipeptídeos ou proteínas) com propriedades catalíticas. Estão presentes em organismos procariontes e eucariontes e estão livres no citoplasma.

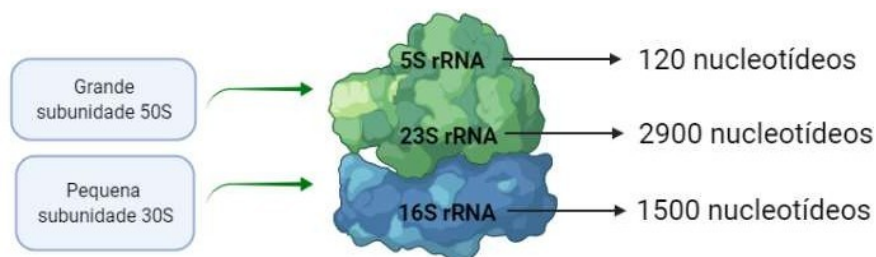
Os ribossomos têm a função de decodificar a mensagem e formar ligações peptídicas, por meio de duas partículas de ribonucleoproteínas (RNPs) de tamanho desigual, ou subunidades. Cada uma é feita de um ou mais ribossomos RNAs (rRNAs) e muitas proteínas ribossomais, ou proteínas r (LAFONTAINE, 2001).

O RNA ribossomal (rRNA) está presente em células procarióticas e eucarióticas, e é responsável pela síntese proteica. O sequenciamento genético do rRNA possibilita identificar a relação familiar entre microrganismos do ponto de vista evolucionário.

A subunidade pequena (30S em bactérias e arqueias, 40S em eucariotos) tem a função de decodificação, enquanto a subunidade grande (50S em bactérias e arqueias, 60S em eucariotos) catalisa a formação de ligações peptídicas, com a atividade da enzima peptidil transferase.

A pequena subunidade bacteriana contém 16S rRNA e 21 r-proteínas, enquanto a subunidade eucariótica pequena contém o rRNA 18S e 32 proteínas r. A grande subunidade bacteriana contém os rRNAs 5S e 23S e 34 proteínas r (LAFONTAINE, 2001). Ribossomos procariontes são compostos pelas subunidades 50S e 30S. A subunidade 30S contém a molécula rRNA 16 s, utilizada para identificar a filogenia bacteriana em estudos metagenômicos.

Figura 4: Estrutura de um ribossomo



O gene rRNA 16S tem nove regiões hipervariáveis, de V1 até V9, essas regiões têm comprimentos variados, como consequência da evolução. Essa heterogeneidade resulta em diferentes habilidades para distinguir entre as bactérias (MACHADO, 2013). Assinaturas genéticas únicas de famílias de microrganismos procarióticos são encontradas codificadas no gene rRNA 16S, que se trata do gene mais bem preservado ao longo da evolução e bem caracterizado pela ciência em bactérias.

O rRNA 16 s é um ótimo marcador taxonômico por ser um gene com alta conservação em sua sequência de nucleotídeos, e permite a confecção de iniciadores ditos universais, que se ligam a uma ampla gama de organismos que possuem o gene rRNA 16 s. Além disso, as regiões conservadas flanqueiam regiões hipervariáveis, regiões que conferem a identidade de diferentes grupos de microrganismos, sendo então identidades taxonômicas.

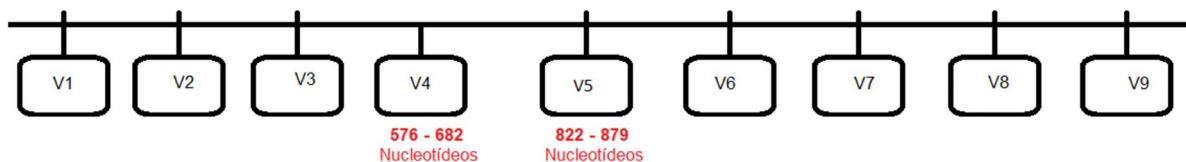


Figura 5: 9 regiões hipervariáveis do gene rRNA 16S

A identificação de bactérias pelo método de sequenciamento do gene 16S rRNA tem sido utilizada há décadas, especialmente em casos de microrganismos fastidiosos, que impossibilitam a cultura por apresentarem altas exigências nutritivas para serem cultivados. Ribossomos e RNA ribossomal estão presentes em todas as células procarióticas. Genes de RNA são altamente conservados na natureza, e assinaturas

genéticas únicas de famílias de micro-organismos procarióticos são encontradas codificadas no gene rRNA.

O sequenciamento metagenômico é uma tecnologia poderosa que visa obter todas as informações genéticas contidas em determinada amostra biológica. Há diferentes tipos de sequenciamento metagenômico, incluindo o *shotgun*, bibliotecas de grandes inserções e sequenciamento de *amplicons*.

O sequenciamento de amplicons é relativamente barato, rápido e capaz de produzir leituras de uma única região genômica, além de o fluxo de análise de dados ser padronizado. Por ser baseado na técnica de PCR, tem as dificuldades relacionadas a ela, como especificidade e cobertura incompletas e vieses do primer.

Várias regiões genômicas podem ser alvos de sequenciamento de amplicons, mas o mais comum é sequenciar o gene marcador 16S rRNA, e então traçar um perfil genético da família de determinado organismo.

O sequenciamento de última geração trouxe avanços como a paralelização massiva das reações de sequenciamento e a separação clonal de modelos, sem a necessidade de inserir fragmentos de genes em um hospedeiro, o que possibilitou que sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA fizesse parte da rotina de muitos estudos de microbiologia ambiental.

Desde o advento do sequenciamento Roche 454 em 2005, várias outras tecnologias de sequenciamento de próxima geração surgiram. Os equipamentos sequenciadores de bancada trouxeram para pequenos laboratórios uma possibilidade antes exclusiva para grandes centros de sequenciamento. Atualmente, cinco máquinas de bancada estão disponíveis: a 454 GS Junior, a Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) e Próton, e o Illumina MiSeq e NextSeq 500. Embora todos ofereçam menos leituras por execução, são mais flexíveis, rápidos e acessíveis para pequenos laboratórios acadêmicos.

Equipamentos de bancada são adequados para sequenciamento de metagenoma de baixa complexidade em estudos de microbiologia ambiental, pois esse tipo de estudo não requer profundidade extrema de sequenciamento.

Em estudos de sequenciamento do gene 16S rRNA, 1.000 leituras podem gerar os mesmos dados de vários milhões de leituras. Os sequenciadores de bancada geram grandes volumes de dados, com rendimentos máximos de ~ 35 Mbp (454 GS Junior), ~ 2 Gbp (Ion Torrent PGM), ~ 10-15 Gbp (Ion Torrent Proton), ~ 10 Gbp (Illumina MiSeq) e ~ 100 Gbp (Illumina Next Seq 500), mais do que suficiente para a maioria dos estudos de microbiologia ambiental.

O equipamento Ion Torrent PGM tem sido usado para análises da comunidade de rejeitos de minas de urânio que tinham pH particularmente alto e baixa permeabilidade, em sistemas de recirculação de aquicultura, solos árticos contaminados com hidrocarbonetos e na mineração de areias betuminosas (Sanschagrin, 2014).

1.9 Papiloma Vírus Canino

O papiloma oral é uma proliferação não odontogênica benigna, acomete principalmente cães jovens, e é causada por três tipos de papilomavírus da família Papillomaviridae, em um período de incubação de 5 cinco semanas. Seu desenvolvimento é autolimitante, e as lesões regridem geralmente em até oito semanas. O papiloma se desenvolve a partir do epitélio pavimentoso estratificado da pele e mucosas orais (lábios, margens gengivais e língua) e faringe, envolvendo ocasionalmente, pálpebras e esôfago. As lesões são múltiplas e em forma de couve flor (ALBUQUERQUE et al., 2012).

Para investigar a hipótese de transformação maligna promovida pelo papilomavírus no melanoma, realizamos a técnica de PCR para investigar a presença do papiloma vírus canino CVP-1 nas amostras tumorais de melanoma oral, um tema inédito até o momento, de acordo com o conhecimento dos autores deste estudo.

Os papillomavírus são um grupo de DNA vírus que induzem lesões benignas e malignas em mucosas e epiderme, mais comumente em cavidade oral e lábios, ocorre em mamíferos e aves, e já foi descrita pela literatura a evolução para carcinoma de células escamosas em cavidade oral de cães. Existem vários tipos de papilomavírus, e eles são classificados com base na sequência de nucleotídeos L1 (DE ALCÂNTARA et al. 2014).

O gene L1 é altamente conservado, é denominado um novo tipo de papilomavírus quando a sequência de nucleotídeos de L1 é ao menos 10% diferente de outros. Mais de duzentos tipos de papilomavírus já foram caracterizados, a maioria em humanos. Existem quatorze tipos de papilomavírus caninos, que podem ser alocados em três gêneros distintos, a se saber: *Lambdapapillomavirus* (CPVs 1 e 6); *Taupapillomavirus* (CPVs 2, 7 e 13); e *Chipapillomavirus* (CPVs 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11 e 14), enquanto o CPV 12 não está atualmente classificado em um gênero definido (DE ALCÂNTARA et al. 2014).

O CPV1, induz papilomas nas mucosas da cavidade oral e pele de cães e também lesões epiteliais hiperplásicas conjuntivais. O CPV2 já foi isolado de papilomas exofíticos e endofíticos, bem como de carcinoma espinocelular invasivo, o CPV6 foi isolado de papiloma endofítico e o CPV7 de uma lesão exofítica. Os CPVs 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11 e 14 estão associados ao desenvolvimento de placas pigmentadas cutâneas. O CPV13 já foi identificado em papilomas orais. Os achados histopatológicos do papiloma viral canino são alterações típicas induzidas no citoplasma ou núcleo das células afetadas. A patogenia da papilomatose promovida por CPV12 ainda não foi elucidada (DE ALCÂNTARA et al. 2014).

2 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar aspectos etiológicos e epidemiológicos do melanoma de mucosa oral de cães.

2.1 Objetivos específicos

- 2.1 Identificar e descrever características ambientais e de manejo de cães com melanoma de mucosa oral, por meio de questionário aplicado a tutores de cães portadores desta neoplasia.
- 2.2 Realizar análise metagenômica do gene ribossomal rRNA 16S, obtido a partir do material genético de swabs orais dos cães participantes deste projeto, e então caracterizar a população bacteriana presente no microbioma dos cães com e sem melanoma.
- 2.3 Investigar a presença de papilomavírus por meio de reação de cadeia de polimerase (PCR) em amostras de melanoma oral canino.

3 Material e Métodos

3.1 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia da USP (Processo número. 8614150218) e da Faculdade de Medicina da USP (Processo no 8614150218)

Os responsáveis por cada um dos animais incluídos neste projeto assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), incluído integralmente no Anexo I.

3.2 Cães do grupo melanoma

Foi realizado um estudo prospectivo observacional, em que foram incluídos em um grupo denominado caso quinze cães diagnosticados com melanoma oral por meio de exame histopatológico. Os animais deste estudo foram atendidos pelo médico veterinário especialista Denner Santos dos Anjos, na cidade de Franca – SP, pela médica veterinária Caroline Hosawa, no Hospital Veterinário Público da cidade de São Paulo (ANCLIVEPA) e pela médica veterinária Michele Venturini, na clínica Odontovet, entre 2018 e 2020.

Os swabs orais foram coletados no momento da indução anestésica para a cirurgia oncológica, realizada de acordo com protocolos de bem-estar animal. As amostras de tecido foram cortadas em fragmentos tumorais com tamanho mínimo de 1

cm, e acondicionados em coletores universais estéreis com solução formalina comercial a 10% para posterior realização de PCR para papiloma vírus canino.

3.3 Cães do grupo controle

Foram incluídos no estudo quinze cães livres de qualquer neoplasia, com o critério de incluir apenas cães da mesma raça, sexo e idade dos animais do grupo melanoma. O recrutamento foi feito no Hospital Escola da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ – USP), e os swabs orais foram coletadas por meio de esfregaço utilizando *swab* oral, enquanto os animais aguardavam por atendimento médico no hospital.

3.4 Aplicação do questionário epidemiológico

Os tutores cujos cães possuíam ou não melanoma oral foram entrevistados por meio de questionário informatizado, disponibilizado na plataforma online Google Forms (<https://www.google.com/intl/pt-BR/forms/about/>).

Foi utilizado um questionário com quatro páginas contendo dados epidemiológicos do animal, como sexo, raça e idade, estilo de vida, alimentos consumidos, origem da água para beber, proximidade a ondas magnéticas, dados sobre o proprietário como tipo de moradia, casa ou apartamento, e hábitos como a utilização de incensos ou cigarros.

Os dados brutos foram inseridos em uma planilha do programa Microsoft Excel para posterior análise estatística.

Os dados foram aplicados entre 2018 e 2020 pela bolsista de iniciação científica, aluna do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP (FMVZ-USP), Marcella Collaneri Carrilho.

3.5 Análise do Microbioma pelo sequenciamento de RNA 16S

3.5.1 Coleta de swabs orais

O *swab* oral foi realizado com uma haste flexível estéril seca de nylon floculado, com movimentos de escovação de língua, lábios e bochechas, dos trinta animais do estudo. Os *swabs* foram colocados em um microtubo contendo uma solução tamponante, e enviados à empresa Neopropecta, sediada em Florianópolis, SC, Brasil, em embalagens plásticas adequadamente identificadas e individualizadas.

O critério para inclusão no estudo foi de os animais não estarem sob antibioticoterapia local ou sistêmica nos últimos trinta dias, não ingerir alimento ou água nas últimas duas horas e não receber nenhum tratamento tópico oral.

3.5.2 Preparo da biblioteca e reação de PCR multiplex para identificação do microbioma oral de cães.

Seguindo as melhores práticas de coleta de amostras, com condições adequadas de armazenamento e transporte para preservar o DNA bacteriano, pode-se utilizar o DNA de basicamente por qualquer método de extração se resultar em boa qualidade do DNA, mesmo em pequenas quantidades (menos de 0,05 ng). A preparação da biblioteca de sequenciamento foi realizada em um protocolo de PCR de duas etapas, dando a melhor amplificação do primer e otimização para multiplexação.

Na primeira Reação de PCR, foram utilizados os primers V3-V4 341F-806R, devido a terem grande cobertura taxonômica bacteriana.

O protocolo utilizou os primers para as regiões V3-V4 com as seguintes condições: os primeiros primers de PCR contêm as sequências Illumina com base na estrutura TruSeq (Illumina, San Diego, CA), permitindo o segundo PCR com sequências de indexação. As reações de PCR foram realizadas em triplicatas com a enzima Platinum Taq (Invitrogen, EUA) com as condições: 95° C por 5 minutos, 25 ciclos de 95° C para 45 s, 55° C para 30 s e 72 ° C por 45 s e uma extensão final de 72 ° C por 2 minutos para PCR 1.

Na PCR 2 as condições eram 95 ° C por 5 minutos, 10 ciclos de 95 ° C por 45 s, 66 ° C por 30 s e 72 ° C por 45 s e uma extensão final de 72 ° C por 2 min. Para comparação, o protocolo Illumina 16S foi usado, conforme descrito por Hoang et. al. 2019.

O PCR final foi limpo usando esferas AMPureXP (Beckman Coulter, Brea, CA), e as amostras foram agrupadas no sequenciamento de bibliotecas para quantificação.

As estimativas foram realizadas com ensaios de dsDNA PicoGreen (Invitrogen, EUA), e então as bibliotecas agrupadas foram diluídas para quantificação precisa de qPCR usando a biblioteca KAPA Kit de quantificação para plataformas Illumina (KAPA Biosystems, Woburn, MA).

As bibliotecas foram sequenciadas em um sistema MiSeq, usando os primers Illumina padrão fornecidos no kit. Uma execução de 300nt de extremidade única foi realizada.

Após o sequenciamento, o pipeline de bioinformática realiza a demultiplexação da sequência. O tamanho das leituras foi normalizado para 283pb.

Para aumentar a confiabilidade da leitura, excluindo possível diversidade gerada por amplicons quiméricos ou nucleotídeo errôneo incorporado na PCR, nós agrupamos 100% leituras idênticas. Se algum cluster for representado por menos de 5 leituras, não é considerado em análises posteriores.

Cada cluster obtém um único identificador, permitindo rastreabilidade entre os resultados, que nos permite comparar unidades taxonômicas operacionais (OTUs) de experimentos diferentes, comparando taxonomias com pipelines diferentes e análise de banco de dados de referência. Usando esta abordagem de agrupamento de leitura, estabelecemos que o cluster é o OTU.

As regiões hipervariáveis V3-V4 e V4 foram amplificadas com os iniciadores 341F-806R e 515F-806R em triplicatas da mesma amostra. A região V4 sozinha mostra

menos resolução para classificar algumas espécies, como *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*.

3.6 Detecção de Papilomavírus canino pela reação de PCR

Primers foram sintetizados pela empresa Thermo Fischer Scientific para investigar a presença do papiloma vírus canino, (patógeno relacionado ao carcinoma de células escamosas oral em cães e gatos) nos fragmentos tumorais de melanoma oral.

O ensaio de PCR foi feito com os primers descritos na tabela a seguir, e foram projetados para amplificar fragmentos do gene L1 do papilomavírus canino.

Tabela 2: Primers desenhados para o estudo

| Primer | Tamanho do fragmento | Descrição |
|------------------------------|----------------------|--|
| FAP64 | 380 pares de base | Amplifica fragmento de 480 pares de base do gene L1 do papiloma vírus canino. |
| CP4 e CP5 | 460 pares de base | Amplificam a porção E1 do papiloma vírus canino |
| Dog GAPDH f e Dog GAPDH r | 485 pares de base | Expresso em altos níveis em diversos tecidos, por isso é utilizado como controle em análises de "western blot" |
| CANPV f | 300 pares de base | Relacionado ao capsídeo viral do papiloma vírus canino Taupapillomavirus, com tropismo pela mucosa oral e pele de cães. |

FONTE: Forslund et al., 1999; Narama et al., 2005; Teifke et al., 1998; de Alcântara, 2014; XIN, 2017.

Fragmentos tumorais dos cães com melanoma oral foram obtidos por meio de ressecção cirúrgica da neoplasia, sendo que, todos os animais estavam sob condições de

anestesia cirúrgica. Os fragmentos foram fixados em formalina comercial a 10% e processados para inclusão em parafina. Cortes foram obtidos e corados com hematoxilina e eosina para exames histopatológicos realizados no laboratório de Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Fragmentos adicionais foram refrigerados para futuros estudos microbiológicos.

O DNA de todas as amostras tumorais foi extraído no Laboratório de Biologia Molecular do ICESP utilizando-se protocolo que emprega fenol: clorofórmio: álcool isoamílico, sendo em seguida a qualidade do DNA extraído avaliada por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop® (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). Todos os DNAs foram utilizados em uma reação de PCR, empregando-se diferentes iniciadores capazes de amplificar um fragmento do gene *tardio L1* (Forslund et al., 1999; Narama et al., 2005; Teifke et al., 1998). A reação de PCR foi realizada empregando-se a enzima polimerase *AmpliTaq Gold*® (Applied Biosystems, Brunchbur, NY, EUA). Um controle negativo sem tecido foi incluído em todos os procedimentos para monitorar possível contaminação.

Os produtos de PCR gerados foram purificados utilizando-se o *illustra ExoProStar 1-Step* (GE Healthcare, Buckinghamshire, RU), sendo em seguida submetidos ao sequenciamento empregando-se o kit *BigDye*® *Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Brunchbur, NY, EUA) em um sequenciador automático *ABI 3130XL Genetic Analyser* (Applied Biosystems, Brunchbur, NY, EUA).

Todos os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta.

As amostras que não geraram sequências de boa qualidade por sequenciamento direto dos produtos de PCR foram clonadas utilizando-se o *TOPO TA Cloning® kit for Sequencing* (Invitrogen, Califórnia, EUA) conforme as instruções do fabricante. As colônias geradas foram crescidas e o DNA isolado por mini-preparação utilizando o *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega, Madison, EUA) sendo, em seguida sequenciado. As sequências geradas foram identificadas utilizando-se o programa Blast disponível online (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.7 Análise estatística

Todas as variáveis das características individuais dos cães e resultados do sequenciamento rRNA 16 s foram inseridas em uma planilha do programa Microsoft Excel, a média e desvio padrão destas variáveis foram calculadas, para realizar posteriormente o teste de Mann Whitney para obtenção do valor de p para cada uma.

Para serem considerados estatisticamente significantes, os valores de p de todas as variáveis deveriam ser iguais ou inferiores a 0,05.

A construção dos gráficos foi realizada com o auxílio dos softwares Prism e Microsoft Excel.

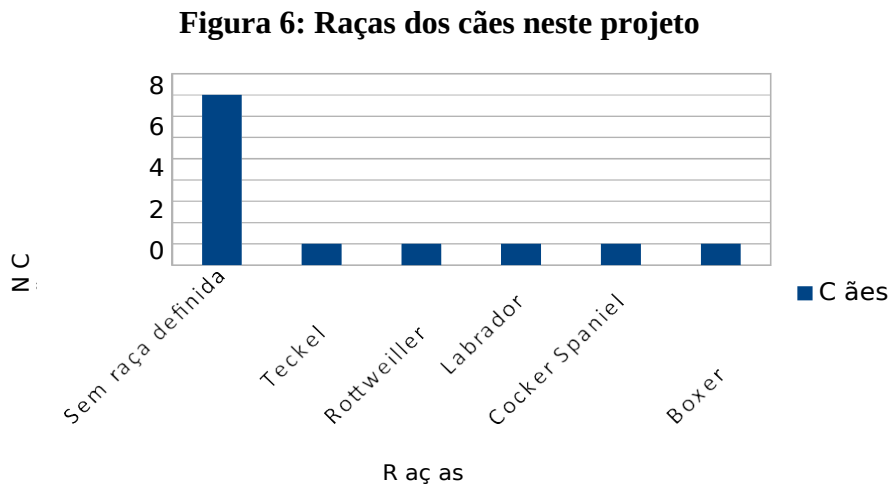
4 Resultados

4.1 Características dos cães com melanoma oral

Para o grupo controle foram recrutados quinze cães com as mesmas características descritas no grupo caso, desde que não houvesse diagnóstico prévio de qualquer tipo de neoplasia. A população de cães incluídos no grupo caso foi composta por nove cães do sexo masculino e por seis do sexo feminino.

A faixa etária dos animais está entre sete e doze anos.

Os cães sem raça definida representam 53% da população e foram os mais prevalentes (8 de 15 cães).



53% (8 de 15 cães) de ambos os grupos apresentavam doença periodontal em algum grau, apenas 7% dos tutores praticavam a escovação dental rotineiramente.

Não houve diferença estatística significativa em relação à escovação dental periódica, não representando fator de proteção para a doença.

Tabela 3: Razão de chances (RC) do melanoma oral em cães com doença periodontal

| | Valor de p | Intervalo de Confiança 95% | |
|-------------------------------|------------|----------------------------|----------|
| | | Inferior | Superior |
| RC Doença periodontal (0 / 1) | 0,76 | 0,18 | 3,21 |
| Grupo Controle | 0,87 | 0,42 | 1,79 |
| Grupo Melanoma | 1,13 | 0,55 | 2,34 |
| Casos Válidos | 30 | | |

FONTE: Cães atendidos por clínicas veterinárias entre 2018 e 2020 em São Paulo-SP.

O cálculo da razão de chances (RC), foi aplicado à amostra e nenhuma das variáveis estudadas apresentou valor significativo para correlação com o melanoma oral canino:

$$RC = \frac{P(\text{doença} | \text{exposto}) / (1 - P(\text{doença} | \text{exposto}))}{P(\text{doença} | \text{não exposto}) / (1 - P(\text{doença} | \text{não exposto}))}$$

A localização anatômica dos tumores foi: gengiva (54%), lábio superior (13%), palato duro (13%), palato mole (7%), lábio inferior (7%), língua (7%).

Figura 7: Localização anatômica dos tumores



Mais de 93% dos animais receberam tratamento antiparasitário comercial preventivo em diferentes intervalos de tempo, em ambos os grupos. Não houve diferença estatística significativa em relação à utilização deste produto.

Nenhuma das variáveis avaliadas relacionadas aos hábitos e manejo dos animais foram identificadas como fatores de risco para o melanoma oral canino, portanto, apresentaram valor p maior ou igual a 0,05.

A resposta para a pergunta 4 está apresentada na tabela 6 a seguir:

Tabela 4: Distribuição dos cães por tipo de focinho

| Tipo de focinho | Melanoma (N) | Saudáveis (N) |
|-----------------|--------------|---------------|
| Braquicefálico | 1 | 1 |
| Mesocefálico | 11 | 7 |
| Dolicocefálico | 3 | 7 |
| Total | 15 | 15 |

FONTE: Cães atendidos por clínicas veterinárias em São Paulo-SP.

Tabela 5: Resposta para a pergunta 10- Distribuição dos cães por escore corporal

| Escore corporal | Melanoma (N) | Saudáveis (N) |
|-----------------|--------------|---------------|
| Adequado | 3 | 7 |
| Ideal | 7 | 3 |
| Sobrepeso | 5 | 5 |
| Total | 15 | 15 |

FONTE: Cães atendidos por clínicas veterinárias em São Paulo- SP

Tabela 6: Levantamento de tutores fumantes

| Tutores fumantes | Melanoma (N) | Saudáveis (N) |
|------------------|--------------|---------------|
| Sim | 10 | 1 |
| Não | 5 | 14 |
| Total | 15 | 15 |

FONTE: Cães atendidos por clínicas veterinárias em São Paulo-SP entre 2018 e 2020

Tabela 7: Apresentação das variáveis epidemiológicas estudadas neste projeto

| Variável | Valor absoluto | Porcentagem | Valor absoluto | Porcentagem |
|---------------------|----------------|-------------|----------------|-------------|
| Fêmeas | 6 | 0,4 | 6 | 0,4 |
| Machos | 9 | 0,6 | 9 | 0,6 |
| Animal Não Castrado | 3 | 0,2 | 12 | 0,8 |
| Animal Castrado | 5 | 0,33 | 10 | 0,67 |
| Adequado | 3 | 0,2 | 7 | 0,47 |
| Magro | 7 | 0,47 | 3 | 0,2 |
| Obeso | 5 | 0,33 | 5 | 0,33 |
| Entre 7 e 10 anos | 7 | 0,47 | 9 | 0,59 |
| Entre 10 e 12 anos | 6 | 0,4 | 4 | 0,26 |
| Acima de 12 anos | 2 | 0,13 | 2 | 0,14 |
| Boxer | 1 | 0,07 | 1 | 0,07 |
| Cocker Spaniel | 1 | 0,07 | 1 | 0,07 |
| Labrador Retriever | 1 | 0,07 | 1 | 0,07 |
| Poodle Standard | 2 | 0,13 | 2 | 0,13 |
| Rottweiler | 1 | 0,07 | 1 | 0,07 |
| S.R.D. | 8 | 0,53 | 8 | 0,53 |
| Teckel | 1 | 0,07 | 1 | 0,07 |
| Braquicefálico | 1 | 0,07 | 1 | 0,07 |
| Mesocefálico | 11 | 0,73 | 7 | 0,47 |
| Dolicocefálico | 3 | 0,2 | 7 | 0,47 |

| Continuação | Variável | Grupo Melanoma (15 cães) | | Grupo Controle (15 cães) | |
|---------------------------|----------------|-----------------------------|--------|-----------------------------|--------------------|
| | | Valor abso- luto | luto | luto | luto |
| % Antiparasitário | Sim | 14 | 0,9333 | 14 | 0,9333 |
| | Não | 1 | 0,07 | 1 | 0,07 |
| Desinfetantes | Sim | 6 | 0,3846 | 6 | 39,96 |
| | Não | 9 | 0,5882 | 9 | 0,6154 |
| Alimentação | Caseira | 2 | 0,1333 | 0 | 0 |
| Alimentação | Comercial | 9 | 0,6 | 12 | 0,8 |
| Alimentação | Mista | 4 | 0,2667 | 3 | 0,2 |
| Escovação | Sim | 1 | 0,066 | 1 | 0,066 |
| Escovação | Não | 14 | 0,934 | 14 | 0,934 |
| Limpeza de tártaro | Sim | 7 | 0,3333 | 10 | 0,6667 |
| Limpeza de tártaro | Não | 8 | 0,5333 | 5 | 0,4667 |
| Doença periodontal | Sim | 8 | 0,5333 | 8 | 0,5333 |
| Doença periodontal | Não | 7 | 0,467 | 7 | 0,4667 |
| | Gengiva | 8 | 0,5333 | Não aplicá- vel | Não aplicá- vel |
| | Lábio inferior | 1 | 0,0667 | Não aplicá- vel | Não aplicá- vel |
| Localização Tumor- ral | Lábio superior | 2 | 0,1333 | Não aplicá- vel | Não aplicá- vel |
| | Língua | 1 | 0,0667 | Não aplicá- vel | Não aplicá- vel |
| | Palato duro | 2 | 0,1333 | Não aplicá- vel | Não aplicá- vel |
| | Palato mole | 1 | 0,0667 | Não aplicá- vel | Não aplicá- vel |
| Estágio Tumoral | II | 5 | 0,3333 | Não aplicá- vel | Não aplicá- vel |
| | III | 10 | 0,3333 | Não aplicá- vel | Não aplicá- vel |
| Tutor fumante | Não | 5 | 0,3333 | 1 | 0,0667 |
| | Sim | 10 | 0,6666 | 14 | 0,934 |

4.2 Características do microbioma oral dos cães com melanoma oral

As bactérias cujo número de sequências foi inferior a 100ng/ dl nas amostras foram desconsideradas das análises estatísticas, dada a pequena concentração. As amostras analisadas contemplaram cinquenta e uma espécies e sete filos diferentes de bactérias.

Os filos bacterianos encontrados em maior abundância em ambos os grupos foram Bacterioidetes, Proteobacteria e Fusobacteria, encontrados em quantidades expressivamente maiores nos cães do grupo caso.

Os filos bacterianos encontrados em menor quantidade foram Synergistetes, Spirochaetes e Actinobacteria, encontrados em quantidades discretamente maiores nos cães do grupo caso.

A bactéria mais abundante em ambos os grupos foi a *Porphyromonas cangingivalis*, e está em maior quantidade nos cães do grupo caso (19%) em relação aos cães do grupo controle (15%). A literatura relaciona a presença deste micro-organismo à patogênese da doença periodontal. A bactéria menos frequente foi a *Filifactor alocis*, em ambos os grupos, e em maior quantidade nos animais do grupo caso.

Figura 8: Bactérias encontradas

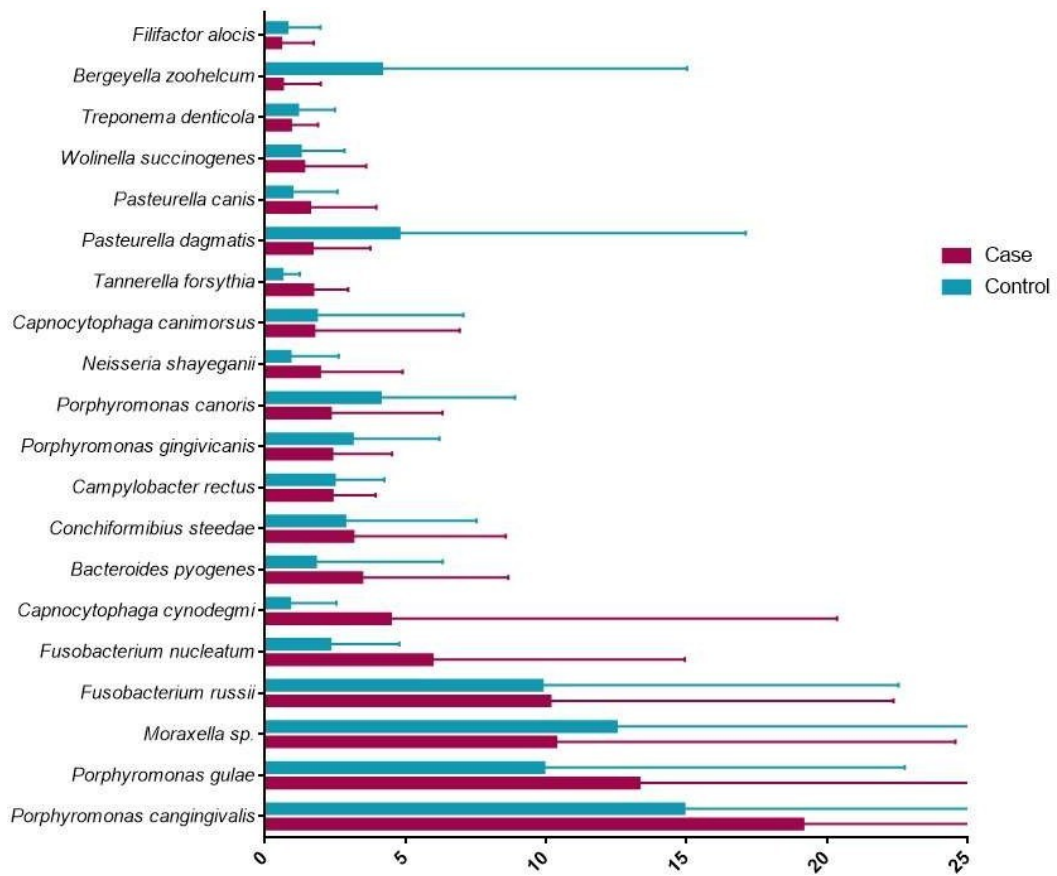


Tabela 8: Média das bactérias encontradas nos cães com melanoma e saudáveis

| Bactérias | Melanoma (ng/ dL) | Saudáveis (ng/ dL) |
|---------------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| <i>Porphyromonas cangingivalis</i> | 24591 | 12981 |
| <i>Fusobacterium russii</i> | 15633 | 12900 |
| <i>Moraxella</i> sp. | 12324 | 8348 |
| <i>Tannerella forsythia</i> | 2366 | 682 |
| <i>Arcobacter thereius</i> | 210 | 841 |
| <i>Conchiformibius steedae</i> | 4075 | 1615 |
| <i>Campylobacter rectus</i> | 3193 | 2178 |
| <i>Porphyromonas canoris</i> | 2348 | 3241 |
| <i>Porphyromonas gingivicanis</i> | 3135 | 2607 |
| <i>Bacteroides pyogenes</i> | 5716 | 2212 |
| <i>Odoribacter denticanis</i> | 1659 | 103 |
| <i>Wolinella succinogenes</i> | 1331 | 872 |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> | 7529 | 2105 |
| <i>Desulfomicrobium orale</i> | 235 | 111 |
| <i>Pasteurella dagmatis</i> | 1948 | 6904 |
| <i>Porphyromonas crevioricanis</i> | 434 | 1303 |
| <i>Moraxella bovoculi</i> | 112 | 13 |
| <i>Neisseria shayeganii</i> | 3272 | 497 |
| <i>Filifactor villosus</i> | 504 | 392 |
| <i>Peptostreptococcus</i> sp. | 826 | 135 |
| <i>Capnocytophaga canimorsus</i> | 2196 | 1239 |
| <i>Filifactor alocis</i> | 839 | 796 |
| <i>Pasteurella canis</i> | 2448 | 957 |
| <i>Neisseria canis</i> | 83 | 106 |
| <i>Haemophilus haemoglobinophilus</i> | 229 | 203 |
| <i>Capnocytophaga cynodegmi</i> | 5756 | 631 |
| <i>Bergeyella zoohelcum</i> | 923 | 2658 |
| <i>Neisseria weaveri</i> | 341 | 751 |
| <i>Treponema denticola</i> | 1075 | 1003 |
| <i>Eikenella corrodens</i> | 163 | 59 |
| <i>Corynebacterium mustelae</i> | 401 | 85 |
| <i>Actinomyces hordeovulneris</i> | 305 | 67 |
| <i>Mycoplasma canis</i> | 400 | 213 |
| <i>Porphyromonas gulae</i> | 18586 | 11997 |
| <i>Streptococcus fryi</i> | 576 | 104 |
| <i>Mycoplasma edwardii</i> | 343 | 22 |
| <i>Pasteurella multocida</i> | 158 | 307 |
| <i>Corynebacterium freiburgense</i> | 208 | 398 |
| <i>Actinomyces canis</i> | 637 | 233 |

| Bactérias | Melanoma (ng/ dL) | Saudáveis (ng/ dL) |
|---------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Streptococcus minor | 287 | 351 |
| Staphylococcus pseudintermedius | 123 | 2 |
| Streptococcus oralis | 2 | 2296 |
| Bacteroides heparinolyticus | 218 | 665 |
| Neisseria zoodegmatis | 678 | 241 |
| Porphyromonas macacae | 137 | 248 |
| Corynebacterium canis | 103 | 16 |
| Mycoplasma feliminutum | 273 | 268 |
| Actinomyces weissii | 214 | 118 |

FONTE: Dados obtidos como resultado da técnica de sequenciamento rRNA16s a partir de swabs orais das trinta amostras de cães deste projeto.

Estudos realizados pela empresa Neopropecta Microbiome Technologies, Florianópolis – SC, Brasil

4.2.1 Tannerella forsythia e Peptostreptococcus sp

DNA das bactérias *Tannerella forsythia* e *Peptostreptococcus sp.* foi amplificado em todas as amostras de cães com melanoma oral, e valor de $p = 0,023$ e $0,028$, respectivamente, indica um valor estatisticamente significativo, e que sua presença na cavidade oral de cães com melanoma pode ser relacionada à etiopatologia deste tipo de câncer.

4.3 PCR para papilomavírus canino nas amostras de melanoma oral

Foram realizadas três extrações de DNA a partir de amostras tumorais frescas de melanoma oral dos 15 cães do grupo caso, realizado no laboratório de biologia molecular do ICESP. Não houve sucesso na amplificação das amostras, e então foi decidido pela sintetização de novos primers de GAPDH.

Foram sintetizados então dois pares de primers: 585 pares de base (primer 1) e outro com 101 pares de base (primer 2).

Tabela 9: Resumo dos ensaios PCR realizados – 2019

| PCR | Temp. anelamento | 1º ciclo | Tempo | Resultado |
|------------------------|------------------|----------|------------|---------------------------------------|
| GAPDH Primer 1 – 585pb | 55C° | 94°C | 10 minutos | Nenhuma amostra amplificada. |
| GAPDH Primer 2 – 101pb | 55C° | 94°C | 10 minutos | Apenas controle positivo amplificado. |

FONTE: Técnica aplicada para realizar os PCRs no laboratório de biologia molecular do ICESP.

Após 10 análises de PCR de GAPDH sem sucesso, e diversas extrações de DNA, foi decidido sintetizar novos primers de GAPDH. Foram sintetizados 2 novos pares de primers: o mesmo em uso 585pb (primer 1) e outro com 101pb (primer 2). Somente houve amplificação do controle positivo com o primer 2 (com amplicon de 101pb), o que significa que não há presença do papiloma vírus canino em nenhuma das amostras de melanoma oral.

Quanto aos primers específicos para o papiloma vírus canino (CP4/CP5 e canPV/FaP64), não houve bandas positivas nas amostras, somente nos controles positivos.

5 Discussão

A identificação precisa da etiologia de neoplasias é complexa e apresenta dificuldades inerentes à presença de numerosos agentes ambientais ou hereditários que podem levar à carcinogênese. Entretanto, a busca de fatores etiológicos para determinados tipos de neoplasias tem sua importância pelo fato de que, uma vez obtidas evidências de que certos agentes podem estar associados ao desenvolvimento de câncer, será possível evitá-los como forma de exercer prevenção primária ou minimizar a presença de neoplasias, seja nos animais ou no homem.

Há evidências da utilização do microbioma oral em humanos como uma ferramenta não invasiva para o diagnóstico no câncer gastrointestinal, que já foi comprovada a relação de câncer gastrointestinal (colorretal, pancreático, gástrico, esofágico e hepático). Bactérias envolvidas em doenças periodontais, como *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia*, estão ligadas a vários tipos de câncer gastrointestinal.

A população de bactérias orais difere significativamente entre casos com câncer digestivo alto e controles saudáveis quando comparados com câncer colorretal (a forma mais comum de câncer digestivo inferior), provavelmente indicando um mecanismo devido a diferenças anatômicas e fisiológicas no trato digestivo.

Mudanças na microbiota oral foram associadas ao risco de vários tipos de câncer gastrointestinal, o que poderia ser considerado uma ferramenta potencial para a previsão precoce e prevenção do câncer gastrointestinal. No entanto, a validação com base em uma grande população, protocolos reproduzíveis para pesquisa de microbioma oral e os padrões de transmissão da microbiota intestinal oral devem ser resolvidos em estudos posteriores (CHEN, 2019). A literatura sugere que a etiologia do melanoma de mucosa canino está relacionada a agentes químicos, microbiológicos ou físicos.

Este trabalho envolveu três estudos que visavam evidenciar possíveis agentes cancerígenos que levariam ao desenvolvimento de melanoma oral em cães.

No primeiro estudo, foi aplicado um questionário epidemiológico a tutores de cães portadores de melanoma e controles. Nenhuma diferença foi obtida quando se indagou sobre o ambiente ou hábitos de cães portadores de melanoma quando comparados aos controles. Uma fragilidade deste estudo refere-se ao pequeno número de animais envolvidos (quinze em cada grupo, num total de trinta cães). Zanini et al., 2013, avaliaram oitenta cães portadores de linfoma e oitenta controles, e foi possível associar a ocorrência de linfomas não-Hodgkin com o fato de morar próximos a avenidas movimentadas da cidade de São Paulo.

A gengiva foi a localização anatômica mais frequente em que o melanoma oral foi encontrado (47% dos animais), isso pode levar a uma investigação da doença periodontal como causa base da doença por provocar inflamação crônica e acúmulo de material mineralizado e bactérias no espaço subgengival.

Todos os animais envolvidos neste estudo eram idosos e apresentaram acúmulo de tártaro dentário em maior ou menor grau; estes animais tendem a desenvolver tártaro,

e também acumular microrganismos nestas placas. Fatores genéticos e familiares devem ser também levados em consideração na carcinogênese do melanoma oral canino, com maior número de animais nas amostras para garantir confiabilidade dos resultados.

O segundo estudo realizado referiu-se à análise comparativa do microbioma de cães portadores e não portadores de melanoma oral. Apesar da associação entre algumas espécies de bactérias e o câncer bucal já tenha sido estabelecida em humanos, a complexidade da relação que ocorre entre o câncer e a microbiota oral permanece inexplicada.

Além de não existirem protocolos analíticos padronizados para análise do microbioma, considera-se difícil estabelecer padrões microbianos associados à cavidade oral em pacientes com câncer e indivíduos saudáveis. Consequentemente, faltam novos biomarcadores microbianos para a identificação precoce do câncer oral (LA ROSA, 2020).

Os resultados da análise do microbioma oral dos trinta cães avaliados neste estudo indicaram que as bactérias mais abundantes na cavidade oral canina são pertencentes aos filos Bacteroidetes e Proteobacteria, e corroboram a caracterização do microbioma oral canino feita por Dewhirst e colaboradores em 2011.

No presente estudo os cães do grupo melanoma apresentaram bactérias do filo Bacteroidetes em quantidade aproximadamente 8% superior em relação ao encontrado nos cães do grupo controle. Esse fato pode tanto ser consequência da intensa doença periodontal e inflamação, contaminação por pus e sangue promovidas pelo câncer, quanto estarem cronicamente na cavidade oral destes animais, sendo a doença periodontal anterior ao câncer.

A bactéria *Tannerella forsythia* pertence ao filo bacteroidetes e sintetiza a proteína serpina, que protege bactérias contra os efeitos proteolíticos dos neutrófilos. Sua adesão epitelial e proliferação no hospedeiro são garantidos por meio das S-glicoproteínas em sua camada superficial e pelas proteínas BspA, que se ligam à fibronectina extracelular e fibrinogênio.

As lipoproteínas expostas à superfície bacteriana levam à apoptose de fibroblastos da gengiva pela ativação da caspase-8 e indução formação de citocina IL-6, MALINOWSKI, 2019.

As glicosidases hidrolisam oligossacarídeos e proteoglicanos e fornecem nutrientes para *T. forsythia*. Na presença de glicose, ela acumula grandes quantidades de toxinas do metil glioxálico, promovendo dano tecidual. Ela também aumenta a população de *P. gingivalis* por sua capacidade de reduzir fumarato para *succinato*. *P. gingivalis*, devido à sua alta atividade proteolítica, fornece peptídeos e aminoácidos de *T. forsythia* que são liberados de tecidos danificados do hospedeiro. MALINOWSKI, 2019.

T. forsythia e *P. gingivalis* são bactérias fundamentais no desenvolvimento da doença periodontal em humanos, e há relatos de que podem contribuir para o desenvolvimento do câncer de esôfago. MALINOWSKI, 2019. Ambas foram encontradas em expressivamente maior quantidade nos cães do grupo caso. Estamos cientes de que este estudo não avalia o potencial cancerígeno de bactérias presentes no microbioma oral de cães, mas evidencia a presença diferencial de microrganismos em cães portadores de melanoma oral.

A importância deste estudo é a descrição minuciosa do microbioma existente na cavidade oral de cães com melanoma oral, que trouxe resultados pioneiros neste campo de pesquisa com tanta relevância na atualidade. O questionário epidemiológico aplicado neste estudo demanda um número maior de animais para a obtenção mais informações. Salientamos ainda a necessidade de mais estudos relacionados ao microbioma canino e humano, com o acompanhamento dos pacientes com câncer durante o desenvolvimento da doença com estudos comparativos.

Em 2021 Hanahan e Weiberg estabeleceram em seu estudo que o microbioma é um nova característica promotora do câncer. Em 2000 a mesma dupla de pesquisadores definiu pela primeira vez as características do câncer, que compreendem seis capacidades biológicas adquiridas durante o desenvolvimento de várias etapas de tumores humanos. Foi estabelecido que eventos inflamatórios que respondem a lesões teciduais podem favorecer consequências tumorais das respostas inflamatórias. Na versão mais recente da série, Hanahan, 2021, os autores reforçam o papel da inflamação na promoção de tumores e incorpora características do microbioma como fator que promove a proliferação tumoral, somando às características já descritas, como o desbloqueio de plasticidade fenotípica, reprogramação epigenética não mutacional e células senescentes.

O vírus do papiloma já foi evidenciado em neoplasias orais de cães, em especial em carcinoma de células escamosas oral (Fernando, 2016), e o terceiro experimento deste trabalho visou avaliar a presença deste vírus em melanomas orais caninos. Utilizando metodologia apropriada, não se amplificou sequências de papilomavirus nas amostras de melanoma estudadas.

Este estudo visou, portanto, avaliar aspectos epidemiológicos e etiológicos do melanoma oral canino. Perguntas foram feitas, e foi utilizada metodologia adequada para respondê-las. Alguns achados interessantes e inéditos foram obtidos, como a presença diferencial de microrganismos em cavidade oral de cães portadores ou não de melanoma oral, e este aspecto merece nova investigação, envolvendo, desejavelmente, maior número de animais.

6 Conclusões

O questionário epidemiológico não revelou diferenças significantes entre os fatores ambientais e hábitos de cães portadores de melanoma oral e controles.

Não houve amplificação de material genético de papilomavírus nas amostras de melanoma oral canino incluídas neste estudo.

Este estudo é o primeiro a descrever o microbioma oral de cães com melanoma, e os resultados apresentados neste trabalho são inéditos, sendo verificada a presença das bactérias *Tannerella forsythia* e *Peptostreptococcus spp* em quantidades estatisticamente significativamente maiores em cães com melanoma, em comparação ao grupo controle.

Tecnologias experimentais e computacionais cada vez mais poderosas fornecem uma revolução de "big data" sobre as inúmeras doenças envolvidas no processo do câncer. A compreensão sobre haver múltiplos fatores causais ajuda a uma melhor compreensão dos mecanismos de desenvolvimento e progressão do câncer, o que traz avanços à medicina tanto na prevenção quanto no tratamento oncológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ascierto PA, Accorona R, Botti G, Farina D, Fossati P, Gatta G, Gogas H, Lombardi D, Maroldi R, Nicolai P, Ravanelli M, Vanella V. Mucosal melanoma of the head and neck. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017 Apr;112:136-152.

Atherton MJ, Morris JS, McDermott MR, Lichty BD. Cancer immunology and caninemalignant melanoma: A comparative review. *Vet Immunol Immunopathol*. 2016 Jan;169:15-26.

Baumgartner A, Thurnheer T, Lüthi-Schaller H, Gmür R, Belibasakis GN. The phylum Synergistetes in gingivitis and necrotizing ulcerative gingivitis. *J Med Microbiol*. 2012 Nov;61(Pt 11):1600-1609.

Bhandari V, Gupta RS. Molecular signatures for the phylum Synergistetes and some of its subclades. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2012 Nov;102(4):517-40.

Cohen Goldemberg, D., de Melo, AC., de Melo Pino, LC. Santos T., LC. Epidemiological profile of mucosal melanoma in Brazil. *Sci Rep*. 2020; 10 (505).

Cunha S C S, et al. Radiation therapy for oral melanoma in dogs: A retrospective study. *CLINIC AND SURGERY. Cienc. Rural* 48 (04) 2018.

Chattopadhyay I, Verma M, Panda M. Role of Oral Microbiome Signatures in Diagnosis and Prognosis of Oral Cancer. *Technol Cancer Res Treat*. 2019 Jan 1;18:1533033819867354.

Chen Y, Chen X, Yu H, Zhou H, Xu S. Oral Microbiota as Promising Diagnostic Biomarkers for Gastrointestinal Cancer: A Systematic Review. *Onco Targets Ther*. 2019;12:11131-11144.

Dahlén G, Charalampakis G, Abrahamsson I, Bengtsson L, Falsen E. Predominant bacterial species in subgingival plaque in dogs. *J Periodontal Res*. 2012 Jun;47(3):354-64.

da Luz, JCS; Carrilho, MC; Dagi MLZ *Oncologia Comparativa*. In: In: Roger Chammas; Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira; Luisa Lina Villa. (Org.). *Oncologia: da molécula à clínica*. 1ed.São Paulo: Editora dos Editores, 2022, v. 1, p. 605

de Alcântara BK, Alfieri AA, Wagner B. Rodrigues, Otonel RA, Lunardi M, Selwyn A. Identification of canine papillomavirus type 1 (CPV1) DNA in dogs with cutaneous papillomatosis. *Pesq. Vet. Bras*. 34(12):1223-1226, dez 2014.

Dewhirst FE, Klein EA, Thompson EC, Blanton JM, Chen T, et al. Correction: The Canine Oral Microbiome. *PLOS ONE*, 2012, 7(6): 10.1371/annotation/c2287fc7-c976-4d78-a28f-1d4e024d568f.

Fernando, DVX; Azevedo, SCS; Oliveira V. Carcinoma de células escamosas em cão: relato de caso. *Revista Saber Digital, [S.l.]*, v. 9, n. 01, p. 115-128, nov. 2017

Forslund O, Antonsson A, Nordin P, Stenquist B, Hansson BG. A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. *J Gen Virol* 1999, 80, 2437-2443.

Fuller MG. O Impacto da Microbiota Oral no Desenvolvimento de Cancro Oral. [dissertação].

- Porto, Portugal. Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade Fernando Pessoa; 2019.
- Irani S, Barati I, Badiei M. Periodontitis and oral cancer – current concepts of the etiopathogenesis. *Oncol Rev.* 2020;14(1):465.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74.
- Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022 Jan;12(1):31-46.
- Holanda, L. C. de .; SILVA, B. P. e .; Pinheiro Júnior, J. W. .; Oliveira, A. A. da F. . Canine lymphoma: a case control study in Metropolitan Region of Recife-PE, Brazil. *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 11, n. 3, p. e34611326495, 2022.
- Joubert KE. Pre-anaesthetic screening of geriatric dogs. *J S Afr Vet Assoc.* 2007 Mar;78(1):31-5.
- Kafka UC, Carstens A, Steenkamp G, Symington H. Diagnostic value of magnetic resonance imaging and computed tomography for oral masses in dogs. *J S Afr Vet Assoc.* 2004 Dec;75(4):163-8.
- Kavarthapu A, Gurumoorthy K. Linking chronic periodontitis and oral cancer: A review. *Oral Oncol.* 2021 Oct;121:105375.
- Lafontaine DL, Tollervey D. The function and synthesis of ribosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Jul;2(7):514-20.
- La Rosa GR, Gattuso G, Pedullà E, Rapisarda E, Nicolosi D and Salmeri M: Association of oral dysbiosis with oral cancer development (Review). *Oncol Lett* 19: 3045-3058, 2020
- Narama I, Kobayashi Y, Yamagami T, Ozaki K, Ueda Y. Pigmented cutaneous papillomatosis (pigmented epidermal nevus) in three pug dogs; histopathology, electron microscopy and analysis of viral DNA by the polymerase chain reaction. *J Comp Pathol* 2005, 132, 132-138.
- Machado, JB. Uso da biblioteca genômica RNAr 16S como ferramenta para o estudo da microbiota fecal humana. 2013. [dissertação] São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- Malinowski B, Węsierska A, Zalewska K. The role of *Tannerella forsythia* and *Porphyromonas gingivalis* in pathogenesis of esophageal cancer. *Infect Agent Cancer.* 2019;14:3.
- Meleti M, Leemans CR, Mooi WJ, Vescovi P, van der Waal I. Oral malignant melanoma: a review of the literature. *Oral Oncol.* 2007_Feb;43(2):116-21.
- Mikiewicz M, Paździor-Czapula K, Gesek M, Lemishevskiy V, Otrocka-Domagala I. Canine and Feline Oral Cavity Tumours and Tumour-like Lesions: a Retrospective Study of 486 Cases (2015-2017). *J Comp Pathol.* 2019 Oct;172:80-87.

Modiano JF, Ritt MG, Wojcieszyn J, Smith R 3rd. Growth arrest of melanoma cells is differentially regulated by contact inhibition and serum deprivation. *DNA Cell Biol.* 1999 May;18(5):357-67.

Nishiya AT, Massoco CO, Felizzola CR, Perlmann E, Batschinski K, Tedardi MV, Garcia JS, Mendonça PP, Teixeira TF, Zaidan Dagli ML. Comparative Aspects of Canine Melanoma. *Vet Sci.* 2016 Feb 19;3(1):7.

Owen, L. N, World Health Organization. Veterinary Public Health Unit & WHO Collaborating Center for Comparative Oncology. (1980). TNM Classification of Tumours in Domestic Animals/ edited by L.N. Owen. World Health Organization.

Pang, L. Y., Argyle, D. J. (2016). Veterinary oncology: Biology, big data and precision medicine. *The Veterinary Journal*, 2016, 213, 38–45.

Pinello K., Baldassarre V., Steiger K., Paciello O., Pires I., Laufer-Amorim R., Oevermann A., Niza-Ribeiro J., Aresu L., Rous B, Znaor A, Cree I, Guscetti F, Palmieri C, Dagli, MLZ. Vet-ICD-O-Canine-1, a System for Coding Canine Neoplasms Based on the Human ICD-O-3.2 Cancers, 2022, accepted.

Prouteau A, André C. Canine Melanomas as Models for Human Melanomas: Clinical, Histological, and Genetic Comparison. *Genes (Basel).* 2019 Jun 30;10(7):501.

Ramos-Vara JA, Beissenherz ME, Miller MA, Johnson GC, Pace LW, Fard A, Kottler SJ. Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. *Vet Pathol.* 000Nov;37(6):597608.

Sarowitz BN, Davis GJ, Kim S. Outcome and prognostic factors following curative-intent surgery for oral tumours in dogs: 234 cases (2004 to 2014). *J Small Anim Pract.* 2017 Mar;58(3):146-153.

Schiffman JD, Breen M. Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015;370(1673):20140231.

Simpson RM, Bastian BC, Michael HT, Webster JD, Prasad ML, Conway CM, Prieto VM, Gary JM, Goldschmidt MH, Esplin DG, Smedley RC, Piris A, Meuten DJ, Kiupel M, Lee CC, Ward JM, Dwyer JE, Davis BJ, Anver MR, Molinolo AA, Hoover SB, Rodriguez-Canales J, Hewitt SM. Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014 Jan;27(1):37-47.

Sohal RJ, Sohal S, Wazir A, Benjamin S. Mucosal Melanoma: A Rare Entity and Review of the Literature. *Cureus.* 2020 Jul 30;12(7):e9483.

Teixeira T.F. Melanomas melânicos e amelânicos da cavidade bucal de cães: aspectos epidemiológicos e moleculares. [dissertação]. São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo; 2011. Tyrrell H, Payne M. Combatting mucosal melanoma: recent advances and future perspectives. *Melanoma Manag.* 2018 Oct 8;5(3).

Tellado NM, Maglietti FH, Michinski SD, Marshall GR, Signori E. Predictive factors of response to electrochemotherapy in canine oral malignant melanoma. *BioRxiv*; 2020 727164.

Sanschagrín S, Yergeau E. Next-generation sequencing of 16S ribosomal RNA gene amplicons. *J Vis Exp*. 2014 Aug 29;(90):51709.

Sobczyńska-Rak A, Żylińska B, Polkowska I, Szponder T. Elevated EGF Levels in the Blood Serum of Dogs with Periodontal Diseases and Oral Tumours. *In Vivo*. 2018, MayJun;32(3):507-515.

Teifke JP, Löhr CV, Shirasawa H. Detection of canine oral papillomavirus-DNA in canine oral squamous cell carcinomas and p53 overexpressing skin papillomas of the dog using the polymerase chain reaction and non-radioactive in situ hybridization. *Vet Microbiol* 1998, 60, 119-130.

Thomas F, Hehemann JH, Rebuffet E, Czjzek M, Michel G. Environmental and gut bacteroidetes: the food connection. *Front Microbiol*. 2011 May 30;2:93.
Ul-Hassan, E.M. Wellington, in *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*, 2009.

Verganti S, Berlato D, Blackwood L, Amores-Fuster I, Polton GA, Elders R, Doyle R, Taylor A, Murphy S. Use of Oncept melanoma vaccine in 69 canine oral malignant melanomas in the UK. *J Small Anim Pract*. 2017 Jan;58(1):10-16.

VICCINI, Fernanda Investigação molecular de papilomavírus em carcinoma de células escamosas em pele e mucosa de c es. / Fernanda Viccini - Cuiab , MT 2019 Xi. f.; cm. 55 p.

Vos, P; et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2011.

Zanini, D. A., Kimura, K. C., Nishiya, A. T., Ubukata, R., Leandro, R. M., Brito, C. P., Trombetti, M., Lagoa, A. C., Macedo, T. R., Rodrigues, L. C. S., Rosendo, J. A.

Zito PM, Scharf R. Melanoma Of The Head And Neck. 2021 Jun 23. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan.

Williams MD, Franchi A, Helliwell T, M ller S, Thompson LDR. Data Set for the Reporting of Mucosal Melanomas of the Head and Neck: Explanations and Recommendations of the Guidelines From the International Collaboration on Cancer Reporting. *Arch Pathol Lab Med*. 2019 May;143(5):603-609.

Wouda RM, Hocker SE, Higginbotham ML. Safety evaluation of combination carboplatin and toceranib phosphate (Palladia) in tumour-bearing dogs: A phase I dose finding study. *Vet Comp Oncol*. 2018 Mar;16(1):E52-E60.

ANEXO I – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) assinado pelos tutores dos animais incluídos neste projeto.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



Projeto de Pesquisa: Aspectos etiológicos e epidemiológicos do melanoma de mucosa oral de cães

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

- 1- Avaliação do risco da pesquisa: (X) Sem risco
- 2- Duração da pesquisa: 2 anos

QUESITOS NECESSÁRIOS PARA PREENCHIMENTO DO TCLE

- 1 – Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que testará a hipótese de o microbioma oral ter relação com a etiologia do melanoma oral canino;
- 2- Em vista deste objetivo, uma amostra de saliva e fragmentos tumorais (obtidos na cirurgia feita durante o tratamento), serão coletados de cada cão participante deste projeto de pesquisa, além da aplicação de um questionário com os responsáveis pelo animal;
- 3- Não haverá desconforto ou qualquer risco aos animais participantes dos procedimentos do item 2;
- 4- Não haverá benefício direto ao tutor ou animal, trata-se de um estudo experimental testando a hipótese de que o microbioma oral de cães tenha papel importante no desenvolvimento do melanoma bucal. A partir dos resultados, poderemos observar algum benefício;
- 5- Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimentos de eventuais dúvidas. O principal investigador e a médica veterinária Joyce Pires de Carvalho, que pode ser encontrada na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, São Paulo, SP, 05508-270. Telefone: (11) 99767-2504;
- 6- É garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo a continuidade de tratamento do animal na instituição;
- 7- Direito de confidencialidade: As informações obtidas (relativas tanto ao responsável quanto ao animal) serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum animal ou responsável;
- 8- A pesquisadora compromete-se a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa ou após a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUAVET) da Universidade de São Paulo;

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo Investigação da etiologia do melanoma bucal canino: Análise de microbioma oral e questionário epidemiológico.

Eu discuti com a Medica Veterinária Joyce Pires de Carvalho sobre a minha decisão em incluir meu(s) animai(s) nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados em meu(s) animai(s), seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Concordo voluntariamente que meu(s) animai(s) participe(m) deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu ou meu(s) animai(s) possa(m) ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Nome e assinatura do tutor ou responsável
(Caso seja o responsável, descrever o vínculo)

Nome e assinatura da testemunha

Para casos de tutores analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável pelo projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste tutor para a participação de seu(s) animai(s) neste estudo.

Nome e assinatura da responsável pelo estudo

Data ____/____/____

ANEXO II – Questionário epidemiológico aplicado a todos os responsáveis pelos animais incluídos neste projeto.

Esse questionário epidemiológico foi formulado com variadas perguntas sucintas e objetivas, de fácil visualização, e adaptado neste projeto de mestrado para investigar a possível correlação entre o ambiente e modo de vida dos animais com o melanoma bucal canino. O questionário epidemiológico é apresentado a seguir:

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP)

MELANOMA BUCAL CANINO. EXISTE CORRELAÇÃO COM O AMBIENTE E ESTILO DE VIDA DO ANIMAL?

Bolsista de Mestrado: Joyce Pires de Carvalho
Orientadora: Profª. Drª. Maria Lúcia Z. Dagli

Laboratório de Oncologia Experimental, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

**Nome da clínica veterinária ou hospital: _____

**Número do prontuário/Ficha clínica: _____

1. Nome do Tutor /Telefone

2. Nome do cão/ Idade

3. Raça

4. Endereço () casa () apartamento

5. CEP e nome do BAIRRO

6. Seu cão teve ou tem melanoma bucal?

sim não

7. O cão toma água de

3x/semana ↑3x/semana

19. O cão pode ter acesso aos materiais de construção que contém tinta, solvente, formol, amianto ou outro produto?

não frequentemente não sei
 ocasionalmente raramente sim,
qual? _____

20. O cão tem contato com herbicida (armazenado no jardim)

não não sei frequentemente
 ocasionalmente raramente

21. O cão tem contato com fungicidas (para eliminar fungos, doenças das plantas devido ao fungo) que são armazenados ou pulverizados sobre as plantas no jardim ou casa?

não não sei frequentemente
 ocasionalmente raramente

22. O cão tem contato com inseticidas em casa, nos armários, no chão, plantas ou outro local?

não não sei frequentemente
 ocasionalmente raramente

23. Existe wireless (wi-fi) no quarto onde o cão dorme? não sim

13. Em qual local o cão passa 2/3 do seu tempo por dia?

24. Existe algum telefone sem fio no quarto onde o cão dorme?

não sim não sei

25. O cão tem contato com produtos domésticos usados ou produtos biológicos para a manutenção da casa? não não sei frequentemente
 ocasionalmente raramente

26. Você usa incenso, velas, fragrâncias, óleos perfumados onde o cão circula?

não não sei frequentemente
 ocasionalmente raramente

27. O cão fica no mesmo ambiente de pessoas que fumam cigarro charuto
 cachimbo

28. O cão tem contato com pessoas que fumam (dentro de casa ou em outros lugares fechados ou dentro do carro)?

não não sei frequentemente
 ocasionalmente raramente

•Quantidade de maços por dia:

↓1 1 2 3 4 5 6 7 8

Há quanto tempo fuma ou fumava no mesmo local do cão?

anos meses

ANEXO III - Certificado de aprovação da CEUA FMVZ USP



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação da etiologia do melanoma bucal de cães: Questionário epidemiológico e análise de microbioma oral", protocolada sob o CEUA nº 8614150218 (ID 006430), sob a responsabilidade de **Maria Lucia Zaidan Dagli** e equipe; *Joyce Pires de Carvalho* - 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 - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 17/04/2019.

We certify that the proposal "Investigation of the canine buccal melanoma etiology: epidemiological questionnaire and analysis of the oral microbioma.", utilizing 40 Dogs (males and females), protocol number CEUA 8614150218 (ID 006430), under the responsibility of **Maria Lucia Zaidan Dagli and team; Joyce Pires de Carvalho** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 04/17/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **03/2018** a **12/2020** Área: **Oncologia**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Cães** sexo: **Machos e Fêmeas** idade: **5 a 15 anos** N: **40**

Linhagem: **diversas** Peso: **5 a 35 kg**

Local do experimento: Os materiais serao colhidos em clinicas veterinarias particulares.

São Paulo, 17 de abril de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo