

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Desenvolvimento Tecnológico

Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Suínos como modelo animal para estudo de Câncer de Bexiga

Ana Laura Da Silva Feijó

Pelotas, 2019

Ana Laura Da Silva Feijó

Suínos como modelo animal para estudo de Câncer de Bexiga

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Tiago Veiras Collares

Orientadora de estágio: Natália Vieira Segatto

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

F297s Feijó, Ana Laura da Silva

Suínos como modelo animal para estudo de câncer de bexiga / Ana Laura da Silva Feijó ; Tiago Veiras Collares, orientador. — Pelotas, 2019.

61 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Oncopig. 2. Neoplasias de bexiga. 3. Biomodelos. I. Collares, Tiago Veiras, orient. II. Título.

CDD : 616.99262

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Ana Laura Da Silva Feijó

Suínos como modelo animal para estudo de Câncer de Bexiga

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 25/11/2019

Banca examinadora:

.....

Prof. Dr. Tiago Veiras Collares

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

.....

Dr^a. Bruna Silveira Pacheco

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

.....

Dr^a. Fernanda Severo Sabedra Sousa

Doutora em Bioquímica e Bioprospecção pela Universidade Federal de Pelotas.

Dedico este trabalho à minha família, meu noivo e amigos, pelo apoio e companhia durante meus quatro anos de graduação. Muito obrigada!

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida.

Agradeço aos meus pais, Sandro e Silvia por serem sempre um exemplo de caráter e dedicação e por não terem medido esforços para que eu chegasse até aqui.

Às minhas irmãs, Karen e Marcela, por todo o incentivo, amor, conselhos.

À minha sobrinha Érica, pelos ensinamentos e pelo amor sincero, a dinda te ama.

Ao meu noivo, William, que me incentiva a ser uma pessoa melhor todos os dias. A ti, meu amor, agradeço por todos os conselhos, companheirismo e demonstrações de amor.

Ao meu orientador professor Tiago, obrigada pela oportunidade, pelos ensinamentos, disponibilidade e confiança.

À minha orientadora de estágio Nath, obrigada pelos ensinamentos, por compartilhar seus conhecimentos e principalmente pelo empenho em tornar este trabalho possível. Obrigada, além de tudo, pela amizade e incansável disposição em me ajudar.

Aos professores do curso de Graduação em Biotecnologia, pelo aprendizado, pela amizade, pelos conselhos e pela educação de qualidade.

Aos colegas e amigos do GPO, pelo companheirismo, amizade, pela colaboração no trabalho e pelas boas conversas na hora do café.

Aos amigos, Morgs, Tia Helena, Tio Mogar, Nath, Lucas, Gui Bondan, Loana, Tales e Kaká obrigada pela amizade, pelo companheirismo e por tornar essa caminhada mais divertida e cheia de boas histórias.

Aos colegas de graduação, por dividirem este momento ímpar.

Muito obrigada!

*“Livros não mudam o mundo, quem muda o mundo são as
pessoas. Os livros só mudam as pessoas ”*

Mário Quintana

Resumo

FEIJÓ, Ana Laura da Silva. **Suínos como modelo animal para estudo de Câncer de Bexiga**. 2019. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O câncer de bexiga é o segundo tipo de câncer maligno que mais acomete o trato urinário, tem destaque em relação ao demais tipos de câncer pelo fato de representar o tratamento neoplásico de maior custo econômico para a saúde pública. As principais formas de tratamento existentes consistem na intervenção cirúrgica, quimioterapia intravesical ou imunoterapia, e essas variam de acordo com o estágio clínico do tumor, podendo ser classificado como não invasivo aos músculos e invasivo aos músculos. Apesar de que essas sejam eficazes, elas ainda são pouco seletivas e por isso apresentam um grande número de efeitos adversos. Desta forma, surge a necessidade de entender melhor esta patologia, bem como desenvolver novas abordagens terapêuticas economicamente viáveis. Os modelos animais são fundamentais para o desenvolvimento de fármacos e de novas terapias. Neste cenário, os suínos veem demonstrando ser mais preditivos de respostas a terapias em humanos do que modelos murinos, devido a similaridades entre sua anatomia, metabolismo, fisiologia e genética deste biomodelo com os humanos. Deste modo o presente trabalho teve como objetivo realizar uma revisão de literatura visando elucidar o papel dos suínos em estudos relacionados ao câncer de bexiga, bem como contribuir com a caracterização e aceitação científica do modelo suíno transgênico denominado *Oncopig*, como modelo biológico adequado para o estudo do câncer de bexiga. Com isso, a partir das informações encontradas durante a pesquisa no banco de dados *PubMed* (NCBI), bem como sites de órgãos nacionais e internacionais de referência na área oncológica, como o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (AIPC) e a Organização mundial da saúde (OMS), pode-se perceber a necessidade de novos modelos biológicos para câncer de bexiga. Assim sendo, os suínos surgem como uma plataforma alternativa atraente para estudos desta patologia.

Palavras-chave: *oncopig*; neoplasias de bexiga; biomodelos

Abstract

FEIJÓ, Ana Laura da Silva. **Swine as animal model for bladder cancer study**. 2019. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Bladder cancer is the second type of malignant cancer that affects the urinary tract, stands out in relation to other cancers because it represents the greatest economic cost neoplastic treatment for public health. The main existing forms of treatment consist of surgical intervention, intravesical chemotherapy or immunotherapy, and these vary according to the clinical stage of the tumor and can be classified as non-muscle-invasive and muscle-invasive. Although these are effective, they are still poorly selective and therefore have a large number of adverse effects. Thus, the need arises to better understand this pathology, as well as to develop new economically viable therapeutic approaches. Animal models are fundamental for drug development. In this scenario, pigs have been shown to be more predictive of responses to therapies in humans than murine models, due to similarities between anatomy, metabolism, physiology and genetics of this biomodel with humans. Thus, the present work aimed to carry out a literature review aiming at elucidating the role of pigs in studies related to bladder cancer, as well as contributing to the characterization and scientific acceptance of the transgenic pig model called Oncopig, as an appropriate biological model for the study of bladder cancer. Thus, from the information found during the research on the PubMed database (NCBI), as well as websites of national and international cancer reference such as the National Cancer Institute (INCA), the International Cancer Research Agency (IARC) and the World Health Organization. health (WHO), it is possible to realize the necessity for a novel biological models for bladder cancer. Thus, pigs appear as an attractive alternative platform for studies of this pathology.

Keywords: oncopig; bladder neoplasms; biomodel

Lista de Figuras

Figura 1	Tipos e estágios do câncer de bexiga.....	22
Figura 2	Ilustração esquemática dos estágios patológicos do câncer urotelial da bexiga e progressão e metástase.....	23
Figura 3	Desenvolvimento do modelo <i>Oncopig</i> através da transfeccção de vetores plasmidiais contendo os genes KRAS ^{G12D} e TP53 ^{R167H} em fibroblastos e a transferência nuclear de células somáticas.....	37
Figura 4	Sistema Cre-LoxP em fibroblastos isolados do OCM. Sendo A: AdCre, adenovírus que expressa Cre recombinase; B: Ação da Cre recombinase, retirada do <i>stopcodon</i> localizado entre as regiões denominadas Loxp, fazendo com que as células passam a transcrever os genes mutantes, adquirindo fenótipo tumoral.....	38
Figura 5	Ativação do modelo <i>Oncopig</i> usando o sistema induzível Cre-LoxP.....	39

Figura 6 Uso do modelo oncopig para câncer de bexiga na triagem de novas drogas com potencial ação antitumoral. Sendo A: triagem de moléculas em ensaios *in vitro*; B: triagem de moléculas em ensaios *in vivo* em roedores; C: ativação do modelo *oncopig* pelo sistema Adcre; D: triagem de moléculas em ensaios *in vivo* nos *oncopigs*; E: ensaios clínicos em humanos e F: a aprovação de um fármaco..... 41

Lista de Tabelas

Tabela 1	Principais fármacos utilizados para o tratamento de câncer de bexiga, com suas respectivas estruturas químicas e principais efeitos adivosos.....	28
-----------------	---	----

Lista de abreviaturas e siglas

3Rs	Reduzir, Reutilizar e Reciclar
AAM	Administração de Alimentos e Medicamentos
AdCRE	Adenovirus codificando a proteína cre recombinase
AIPC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
AZT	Azidotimidina
BCCL	<i>Bladder Cancer Cell Line</i>
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
CB	Câncer de Bexiga
CBMI	Carcinoma de Bexiga Músculo Invasivo
CBNMI	Carcinoma de Bexiga Não Músculo Invasivo
CCTs	Carcinoma de Células Transicionais
CCU	Carcinoma de células uroteliais
CHC	Carcinoma Hepatocelular
CRE	Proteína Cre Recombinase
CIS	Carcinoma <i>in situ</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FGFR3	Receptor 3 do Fator de Crescimento de Fibroblastos
FOSL1	<i>Fos-related antigen 1</i>
GPO	Grupo de Pesquisa em Oncologia celular e molecular
HPV	Papilomavírus Humano
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OB	<i>Oncopig Bladder</i>

OCM	<i>Oncopig Cancer Model</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
P53	Proteína p53
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RB1	Retinoblastoma 1
RT	Ressecção transuretral
SAC	Sociedade Americana de Câncer
SCNT	Transferência nuclear de células somáticas
STM	Sarcoma de tecido mole
TP53	Proteína tumoral p53

Sumário

1 Introdução.....	15
2 Objetivos.....	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivo Específicos	16
3 Metodologia.....	17
4 Revisão de Literatura.....	18
4.1 Câncer.....	18
4.1.1 Câncer de bexiga.....	19
4.1.1.1 Fatores de riscos.....	20
4.1.1.2 Estadiamento e Histologia.....	21
4.1.1.3 Tratamentos contra neoplasias de bexiga.....	23
4.1.1.3.1 Intervenções cirurgicas.....	24
4.1.1.3.2 Imunoterapia com <i>Bacilo Calmette-Guérin</i> (BCG)	25
4.1.1.3.3 Radioterapia.....	26
4.1.1.3.4 Quimioterapia.....	26
4.2 Modelos biológicos.....	29
4.2.1 Modelos biológicos para câncer de bexiga.....	30
4.2.1.1 Modelos quimicamente induzidos.....	30
4.2.1.2 Modelo de xenoenxerto derivado do paciente.....	31

4.2.1.3	Roedores como biomodelos para CB.....	31
4.2.1.4	Cães como biomodelos para CB.....	33
4.2.2	Suínos como modelo biológico.....	34
4.2.2.1	<i>Oncopig Cancer Model</i>	35
4.2.2.1.1	<i>Oncopig bladder cancer model</i>	40
5	Considerações finais.....	43
	Referências.....	44

1 Introdução

O câncer é destacado como um problema de saúde mundial (INCA, 2018). Uma vez que esse é apontado como a segunda principal causa de morte no mundo e responsável por cerca de 9,6 milhões de mortes no ano de 2018 (OMS, 2018). Dentre os diversos tipos de neoplasias, o câncer de bexiga apresenta o maior custo econômico para a saúde pública, tendo como estimativa de 430 mil casos em escala mundial em 2018 (INCA, 2018).

As principais formas de tratamento existentes consistem na intervenção cirúrgica em conjunto com quimioterapia intravesical ou imunoterapia, e essas variam de acordo com o estágio clínico do tumor, classificados como não invasivo aos músculos ou invasivo aos músculos (MISRA, 2010). Porém, alguns destes tratamentos ainda apresentam algumas restrições, devido a sua agressividade, não seletividade ou impossibilidade de aplicação em indivíduos imunocomprometidos (MIURA, 2011). Além disso, o câncer de bexiga possui um caráter altamente resistente e recidivo (YAFI, 2011).

Dessa forma, surge a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos economicamente viáveis, seletivos e com potencial ação antitumoral destinados ao tratamento de tumores de bexiga. Além disso, não foram empregados novos tratamentos para o câncer de bexiga nos últimos 30 anos (KOBAYASHI, 2015). No entanto, para que ocorra incorporação de novos compostos com potencial ação antitumoral no mercado, é necessário que esses passem por diversos testes *in vitro* e em ensaios pré-clínicos utilizando modelos biológicos animais, visando comprovar sua eficácia e segurança (JUNOD, 2014).

Neste sentido, a utilização de modelos biológicos ideais é de extrema importância para obtenção de resultados fidedignos que sejam semelhantes aos ensaios clínicos obtidos em humanos. Apesar dos roedores serem os animais comumente utilizados para a realização de estudos *in vivo* (VANDAMME, 2014), modelos suínos apresentam uma melhor eficácia em gerar respostas biológicas similares aos seres humanos e mimetizar doenças humanas (MEURENS, 2012; PRATHER, 2013) uma vez que possuem diversas similaridades genéticas em relação ao genoma humano (GROENEN, 2012). Sendo então, atrativos para a área de farmacologia e oncologia (HOELDER, 2012).

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Deste modo o objetivo do presente trabalho foi elaborar uma revisão de literatura visando elucidar o papel dos suínos em estudos relacionados ao câncer de bexiga.

2.2 Objetivos específicos

- Abordar as problemáticas relacionadas ao câncer de bexiga;
- Averiguar a importância de modelos biológicos para estudos científicos;
- Investigar a utilização de suínos como modelo biológico para triagem de novos fármacos.
- Verificar o potencial uso e relevância de uma plataforma *Oncopig* como modelo biológico para carcinomas de bexiga;
- Contribuir com a caracterização e aceitação científica do modelo suíno transgênico denominado *Oncopig*, como modelo biológico adequado para o estudo do câncer de bexiga.

3 Metodologia

Para a elaboração do presente trabalho foi realizada uma pesquisa em forma de revisão de literatura para coletar dados e informações científicas de artigos originais e de revisão, entre o período do ano de 2010 a 2019. Para isso, foram utilizados o banco de dados *PubMed* (NCBI), bem como sites de órgãos nacionais e internacionais de referência na área oncológica, como o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (AIPC) e a Organização mundial da saúde (OMS). As palavras-chaves empregadas foram: *cancer, genetically defined swine cancer model, porcine models, rodent model, bladder cancer, biological model, bladder cancer treatment, bladder cancer statistics e oncopig.*

4 Revisão de Literatura

4.1 Câncer

De acordo com a organização mundial da saúde, o câncer foi responsável por 9,6 milhões de mortes no ano de 2018, e é estimado que cerca de 1 a cada 6 casos de óbito no mundo é devido ao câncer (OMS, 2019). No Brasil, foram registrados 115.057 óbitos causados por neoplasias em homens e 103.583 em mulheres no ano de 2017 (INCA, 2019). Os números de incidência e mortalidade por câncer estão crescendo de forma rápida em todo o mundo devido à diversas razões complexas, mas que refletem o envelhecimento e crescimento populacional (GERSTEN, 2002; OMRAN, 2005).

Esta patologia tem como características a rápida criação de células anormais, bem como a perda do controle da divisão celular e o crescimento desordenado de células, que tendem a invadir outras estruturas orgânicas (INCA, 2019; OMS, 2019). Isso é causado, segundo Hanahan e Weinberg (2000), por um processo envolvendo múltiplas etapas que geram alterações genéticas, e essas afetam de forma direta ou indireta a sinalização de crescimento autossuficiente, insensibilidade aos sinais de inibição do crescimento, evasão da morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada e invasão e metástase de tecido (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Desta forma, existem inúmeras variações de neoplasias e isso ocorre de acordo com o tipo celular que dará origem a esta enfermidade, sendo denominados como carcinomas aquelas que tem início através dos tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, em contrapartida são chamados sarcomas os tumores que se desenvolvem a partir dos tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem (INCA, 2019).

As causas que levam a ocorrência do câncer são variadas, podendo ser fatores externos ou internos ao organismo, estando ambas inter-relacionadas (INCA, 2019). Apesar de que ainda não está elucidado todos os mecanismos para o desenvolvimento da doença, existem alguns fatores conhecidos que influenciam seu surgimento, como o uso de tabaco, incluindo cigarros e tabaco sem fumaça; obesidade; dieta não saudável com baixa ingestão de frutas e vegetais; falta de atividade física; consumo de álcool; infecção por HPV sexualmente transmissível; infecção por hepatite ou outras infecções cancerígenas; radiação ionizante e

ultravioleta; poluição do ar urbano e uso doméstico de combustíveis sólidos (OMS, 2019). Sendo o tabaco o fator de risco responsável por aproximadamente 22% das mortes relacionadas ao câncer em todo o mundo (GBD, 2016).

Em relação ao tratamento do câncer, este pode ser realizado através de intervenções cirúrgicas, quimioterapia, imunoterapia, radioterapia ou transplante de medula óssea. Sendo administrado de acordo com o tipo e grau de tumor, e em muitos casos, é necessário implementar a combinação de mais de uma modalidade (INCA, 2019). Porém estes tratamentos comumente apresentam reações adversas aos pacientes, o que torna necessário buscas por novas abordagens terapêuticas.

4.1.1 Câncer de bexiga

O câncer de bexiga (CB) é uma neoplasia do trato urinário, que na maioria dos casos, acomete o uretério, epitélio de transição diferenciado que reveste a bexiga, e este tipo de neoplasia denominada como carcinoma de células uroteliais (UCC) (DINNEY, 2004). Além disso, é caracterizado como uma doença heterogênea dividida em dois subtipos principais, o tipo músculo invasivo ou não-músculo invasivo, sendo aproximadamente três quartos dos casos classificados como não-músculo invasivo (DYRSKJOT et al., 2007), e esses também apresentam alta tendência à recidiva (WOLDU, 2017; ABUFARAJ, 2018). Com relação ao tipo músculo invasivo, dados demonstram que cinquenta por cento dos pacientes desenvolvem recorrência, e desses, pelo menos a metade virá a óbito por metástase dentro dois anos (WU, 2005; WITJES, 2017).

De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, o CB apresentou uma estimativa de 549.000 novos casos e 200.000 mortes em escala mundial no ano de 2018 (AIPC, 2018). Já em 2040, estima-se que esta neoplasia seja responsável por 323.450 casos de mortes anualmente (FOREMAN, 2018). Sendo então classificado como a décima forma mais comum de câncer em todo o mundo (BRAY 2018).

Além disso, este tipo de câncer possui uma alta taxa de incidência padronizada por idade no sexo masculino, apresentando uma proporção de 3,5 homens para cada mulher (FERLAY, 2015; ANTONI, 2017), ocorrendo, na maior parte, em pessoas idosas (RIES, 2007). Fora isso, o tratamento para esta neoplasia apresenta uma falha

em 95% dos pacientes com doença avançada, e uma taxa de apenas 6% de sobrevivência em 5 anos para pacientes com câncer de bexiga metastático. Desta forma, o CB tem destaque em relação aos demais tipos de câncer, visto que este apresenta o maior custo econômico para a saúde pública, devido aos longos períodos de tratamento e as altas taxas de recorrência, acometendo aproximadamente 70% dos pacientes (SIEGEL, 2013).

4.1.1.1 Fatores de riscos

Com relação aos fatores externos que influenciam no desenvolvimento do câncer de bexiga, temos o tabagismo como principal agente (FREEDMAN, 2011). Sendo a associação entre este fator e neoplasias de bexiga alvo de diversos estudos epidemiológicos e os resultados obtidos demonstraram que existe um risco cerca de 2 a 3 vezes maior de câncer de bexiga em pessoas que já foram fumantes ou são fumantes em comparação com não fumantes (JANKOVIC, 2007). Além disso, dados mostram que o risco de desenvolver a patologia aumenta de uma forma diretamente proporcional ao número de cigarros e anos que o indivíduo esteve em contato com as substâncias tóxicas do tabaco (ZEEGERS, 2000).

Apesar do tabagismo apresentar uma influência em cerca de cinquenta por cento no risco de desenvolver a doença (FREEDMAN, 2011; AGUDO, 2012; CUMBERBATCH, 2016), outros elementos ambientais estão diretamente relacionados com esta neoplasia como produtos químicos industriais (VLAANDEREN, 2014). Estudos demonstram que hidrocarbonetos aromáticos, tintas domésticas, fungicidas, plásticos, metais pesados (LETASIOVA, 2012; ANDREW, 2004; JANKOVIC, 2007) e compostos nitrosos que são usados para preservar quimicamente alguns produtos alimentícios estão associados ao risco de câncer de bexiga (CATSBURG, 2014). Por fim, outro exemplo é a esquistossomose urinária, que está relacionada com 5 a 10 por cento dos cânceres de bexiga (JANKOVIC, 2007), e esta relação se tem através da irritação crônica do urotélio que gera altos níveis de metabólitos cancerígenos na urina (AIPC, 1994).

Além disso, vários fatores e vias genéticas propiciam o desenvolvimento de neoplasias de bexiga (MALMSTROMI, 2002; BURGER, 2013). Tumores classificados como não músculos invasivos e de baixo grau foram associados à superexpressão

e/ou mutações no receptor 3 do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR3) e no oncogene KRAS. Já o carcinoma *in situ* (CIS) e BC de alto grau e músculo invasivo estão associados a mutações e/ou mutações na proteína tumoral p53 (TP53), no retinoblastoma 1 (RB1) e no homólogo da fosfatase e tensina (PTEN) (GOEBELL, 2010).

4.1.1.2 Estadiamento e Histologia

Quanto ao estadiamento do câncer de bexiga, deve ser utilizado o Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos, que é aceito pela União Internacional Contra o Câncer (UICC). E esse tem como base as características do tumor primário (T), linfonodos regionais (N) e a presença ou ausência de metástase à distância (M). Porém, esta classificação somente é aplicável aos carcinomas (SOBIN, 2009).

Além disso, existem divisões com relação ao grau de cada tumor, sendo grau 1 os tumores bem diferenciados; grau 2 os moderadamente diferenciados e grau 3 os pouco diferenciados (OMS, 1973), bem como subdivisões de tipos de acordo com o tipo de célula que sofre a alteração maligna primordialmente. Desta forma, tem-se três principais tipos de tumores de bexiga: carcinoma de células transicionais (CCTs), adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas (INCA, 2017). Sendo a maior parte de CB classificados como CCT, também conhecidos por carcinomas uroteliais (MOSCHINI, 2017), e este subtipo engloba tumores que iniciam nas células do tecido mais interno da bexiga (INCA, 2017).

Com relação às características histológicas, os CCTs podem ser subdivididos em câncer de bexiga músculo invasivos (CBMI) ou câncer de bexiga não-músculo invasivos (CBNMI) (figura 1). Aproximadamente, 75% dos pacientes apresentam tumores não-músculo invasivos, e esse podem ser divididos em tumores que são limitados à mucosa (Ta e Tis) ou que atingem no máximo a submucosa (T1) (KAMAT, 2016). Os tumores Ta são considerados de baixo grau e raramente progridem para tumores invasivos, porém, esses apresentam taxas de recorrentes em torno de 70%, resultando em longos períodos de tratamento da doença (BABJUK, 2015; DYRSKJOT et al., 2007; KAMAT et al., 2016).

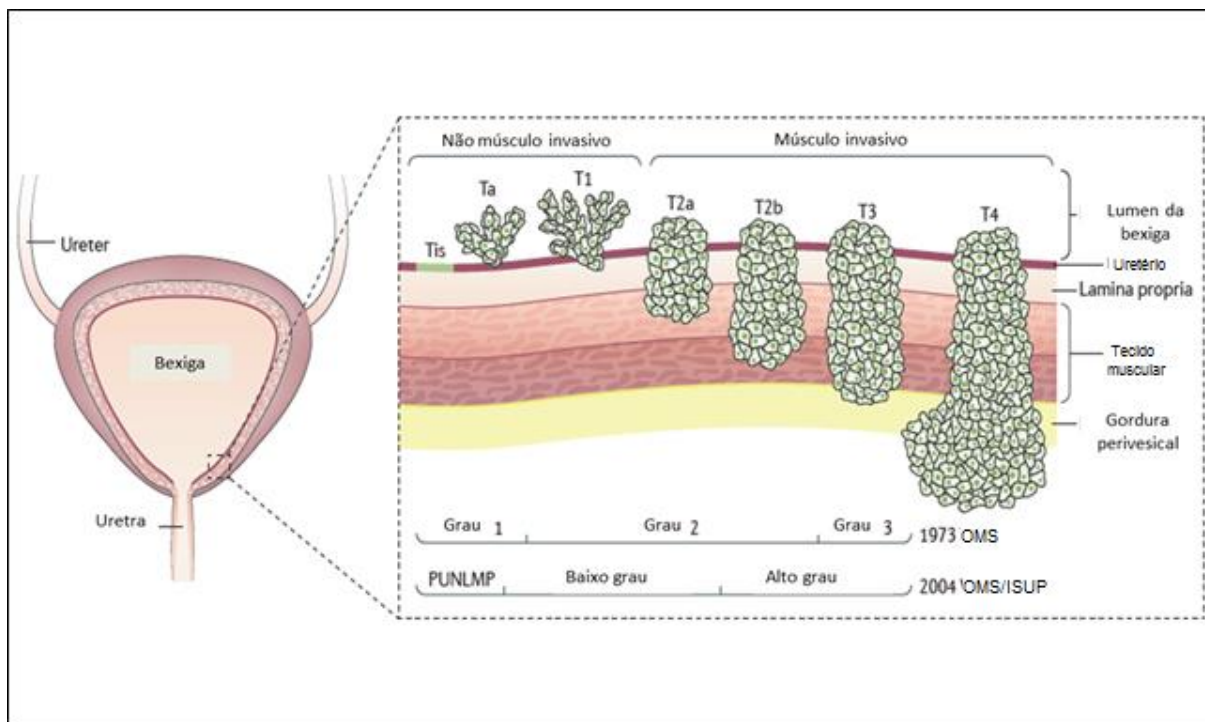


Figura 1 - Tipos e estágios do câncer de bexiga.

Fonte: Adaptado de SANLI, 2017.

Em contrapartida, os tumores sólidos que invadem outras camadas de tecido atingem em torno de 20 a 25% dos pacientes. Sendo que a maior parte dos casos apresentam uma alta tendência a originar metástases distantes, sendo então denominadas como neoplasias intra-uroteliais de alto grau (MCCONKEY, 2010). Os tumores de estágio T1 apresentam quadros de evolução frequentemente invadindo a musculatura vesical e resultando em um prognóstico menos favorável ao paciente, gerando em menos de 50% os casos um com sobrevida de apenas cinco anos (KAMAT, 2016).

Além disso, as neoplasias também podem ser classificadas como não papilar, quando esses apresentam uma camada plana, e atingindo o epitélio superficial com células de citologia maligna. Já os tumores papilares são neoplasias uroteliais baixo potencial maligno, ou como carcinomas uroteliais (OMS, 2004), conforme visto na figura 2. Desta forma, classificar cada caso, de acordo com a extensão do tumor (estadiamento), é extremamente necessário visto que isso permite que o especialista utilize o tratamento mais adequado para cada paciente.

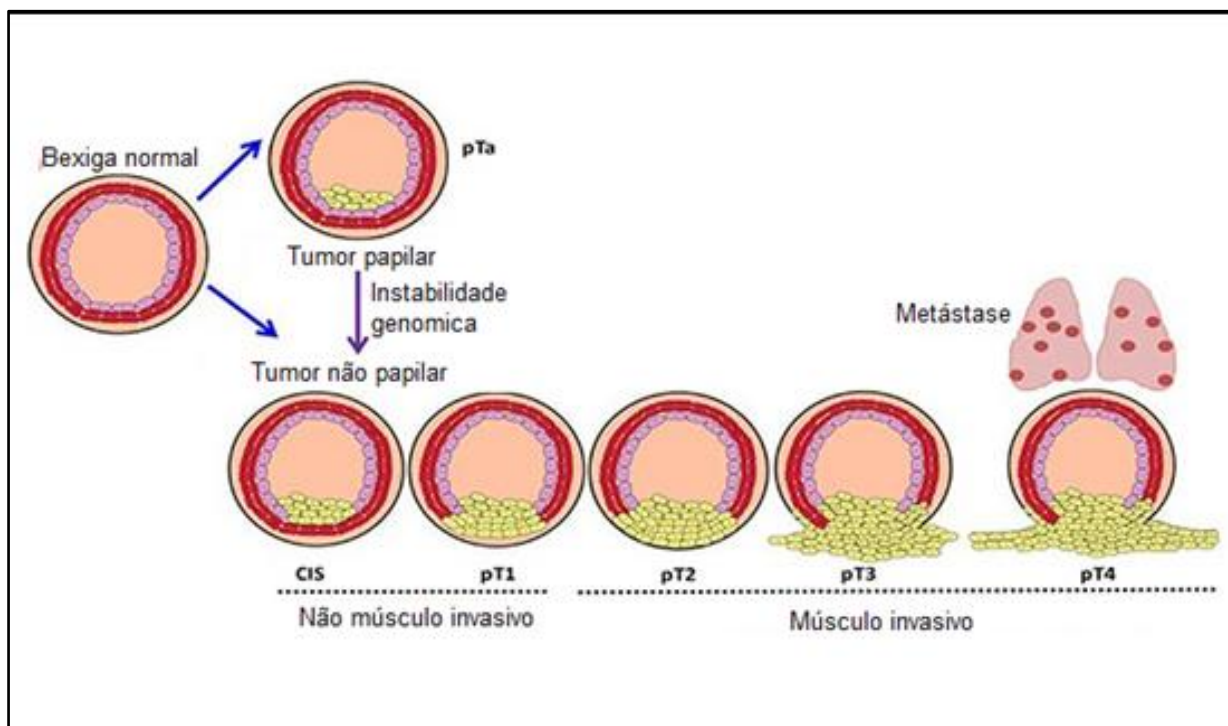


Figura 2- Ilustração esquemática dos estágios patológicos do câncer urotelial da bexiga e progressão e metástase.

Fonte: Adaptado de JOHN, 2017.

4.1.1.3 Tratamentos contra neoplasias de bexiga

As abordagens terapêuticas para o câncer de bexiga e a eficácia deste tratamento variam profundamente, dependendo do estágio clínico e dos fatores de risco associados (KAUFMAN, 2009; PRASAD, 2011; RESNICK, 2013). Sendo comumente empregado para o tratamento primário dos tipos não músculo invasivo a cirurgia de ressecção transuretral de tumores da bexiga (TURBT) (CLARK, 2013), logo após é realizada a terapia intravesical com *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) (GONTERO, 2010; REDELMAN-SIDI, 2014). Estes tratamentos resultam em maior sobrevida livre de doença para os pacientes com a doença de baixo grau, mas a recorrência é comum em pacientes com doença de alto grau com progressão para doença metastática e invasora muscular localmente avançada (GONTERO, 2010; REDELMAN-SIDI, 2014).

Pacientes de alto risco ou com recorrência após TURBT são tratados com vários ciclos de BCG (HERR, 2008). O tratamento com BCG requer vigilância

frequente por longos períodos de tempo com efeitos adversos, incluindo urocistite grave ou tuberculose sistêmica (ELMAMOUN,2014; POMMIER, 2015). Porém a terapia com BCG é considerada o tratamento padrão ouro para CBNMI após a realização da RT do tumor (HERR, 1992).

Quanto ao tratamento do CBMI, normalmente é empregado a técnica cistectomia que consiste na remoção cirúrgica da bexiga, podendo essa ser uma remoção total ou parcial do órgão, juntamente com quimioterapia neoadjuvante ou adjuvante e/ou radioterapia (DASH 2008; ZARGAR, 2015). Já o câncer de bexiga metastático é geralmente tratado com quimioterapia de multidrogas que consiste na utilização de metotrexato, vinblastina, adriamicina e cisplatina ou a combinação de gemcitabina mais cisplatina (CLARK, 2013). Porém, além destes tratamentos apresentarem diversos efeitos adversos, o câncer de bexiga possui um caráter altamente resistente e recidivo (YAFI, 2011).

Além disso, nos últimos 30 anos não houve aprovação de novos tratamentos para o câncer de bexiga (KOBAYASHI, 2015). Desta forma, surge uma extrema necessidade de entender melhor esta patologia, bem como desenvolver novas abordagens terapêuticas. Para isso, a utilização de modelos experimentais para estudos relacionados ao câncer de bexiga demonstra grande importância visto que são ferramentas úteis para análises moleculares e funcionais e avaliação farmacológica pré-clínica.

4.1.1.3.1 Intervenções cirurgicas

As intervenções cirurgicas são comumente aplicadas como tratamento para pacientes com neoplasias de bexiga. Para os casos de CBMI não metastático, é recomendado a cistectomia radical (WITJES, 2014). Este consiste na remoção total do órgão, bem como, de forma padrão, ocorre a remoção de órgãos adjacentes, como a próstata e as vesículas seminais nos homens e o útero, as trompas de falópio, os ovários e a parede vaginal nas mulheres.

Desta forma, este tratamento apresenta um alto índice de complicações, tanto agudas quanto crônicas (SHABSIGH, 2009; LOWRANCE, 2008). Este fator é extremamente crítico, uma vez que os pacientes submetidos à cistectomia geralmente são idosos e apresentam múltiplas condições comórbidas (CHANG, 2017). Além

disso, com este tratamento os pacientes precisam utilizar um desvio urinário, e este tem impacto significativo na qualidade de vida a longo prazo (CHANG, 2017).

Outras técnicas cirúrgicas empregadas são a cistectomia parcial e a ressecção transuretral. Sendo a primeira, empregada quando o tumor invade a camada muscular, mas não é muito grande e está bem localizado, podendo então, ser removido sem retirar toda a bexiga (SAC, 2019). Esta técnica apresenta como principal vantagem a conservação da bexiga e o fato de não ser necessária uma cirurgia de reconstrução, porém a retirada de parte do órgão implica numa micção mais frequente (SAC, 2019).

Já a técnica de ressecção transuretral é geralmente realizada para tumores superficiais e em estágio inicial. (SAC, 2019). Os efeitos colaterais desta técnica são geralmente leves e normalmente desaparecem em um curto período de tempo. Alguns pacientes podem ter efeitos colaterais, como micção frequente ou mesmo incontinência (SAC, 2019).

4.1.1.3.2 Imunoterapia com *Bacilo Calmette-Guérin* (BCG)

O BCG é um agente imunoterapêutico que promove a imunorreação contra células cancerígenas (HERR, 2008) através da ação da fibronectina (DONIN, 2017) e foi desenvolvido a partir de *Mycobacterium Bovis*, mas seu mecanismo de ação ainda não é completamente elucidado. Existem alguns casos podem ter contra-indicações para BCG, como indivíduos imunossuprimidos. Além disso Ensaio in vitro realizados pelo nosso grupo de pesquisa (Grupo de Pesquisa em Oncologia celular e molecular-GPO) mostram que a utilização de BCG recombinante pode ser uma estratégia biotecnológica com potencial ao avanço dos estudos pré-clínicos (BEGNINI, 2013; BEGNINI, 2015).

No Brasil, estes medicamentos à base de BCG são produzidos exclusivamente pela Fundação Atauípho de Paiva (FAP), laboratório situado no estado do Rio de Janeiro desde 1900. Porém em dezembro de 2016, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) interditou os trabalhos da fundação devido a irregularidades de boas práticas de produção de medicamentos, o que gerou a paralisação da produção destes fármacos (BBC, 2019), resultando na falta de tratamento para diversos

pacientes, visto que os estoques de Imuno BCG praticamente ficaram zerados no Sistema Único de Saúde (SUS) e na iniciativa privada. Segundo a FAP, a previsão para retomar a produção de Imuno BCG será apenas no primeiro trimestre de 2020 (BBC, 2019).

4.1.1.3.3 Radioterapia

A radioterapia é uma das duas principais modalidades utilizadas no tratamento do câncer de bexiga invasivo aos músculos (POS, 2010; ZHANG, 2015). Esta técnica consiste na utilização de radiações ionizantes para eliminar um tumor ou impedir que as células desse aumentem. Podendo ser administrada em combinação com a quimioterapia ou outros tratamentos (INCA, 2019)

Tratamento com radioterapia é reservado para aqueles pacientes com tumores inoperáveis ou que são clinicamente incapazes de se submeter a cirurgia de cistectomia (COLLINS, 2018). Ademais, pode ser indicado para tumores de estágios inferiores ou recorrentes após tratamento local. Bem como podem ser proposto em situação de pós-operatório em caso de ressecção transuretral (RIOU, 2016).

Alem disso, esta terapia é indicada em casos de tumores metastáticos com palição local (RIOU, 2016). Em contrapartida, sempre que possível, deve ser proposta a quimioterapia concomitante por radiosensibilização na ausência de contraindicações. Além disso, a radioterapia radical está associada a uma taxa relativamente alta de resposta incompleta ou recorrência local (até 50%) (COOKE, 2000).

4.1.1.3. 4 Quimioterapia

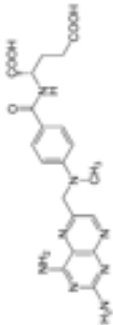
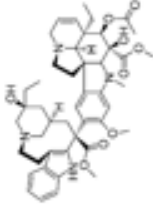
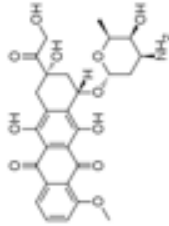
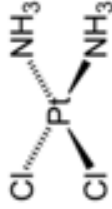
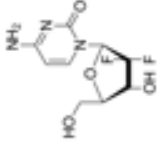
A quimioterapia se define pela utilização de fármacos que resultam na morte celular de células cancerígenas (JOHNSTONE, 2002). Esta abordagem terapêutica é comumente empregada para o controle de neoplasias invasivas, visto que possui ação em todo o corpo, atingindo as células metastáticas, já as intervenções cirúrgicas e a radioterapia são aplicadas apenas de modo local (SAC, 2010). Desta forma os principais objetivos da quimioterapia incluem a cura da doença, o controle do avanço e a ação paliativa dos sintomas (MASOOD, 2016). Para a aplicação deste método, é

necessário que diversos fatores sejam analisados, como o tipo e o estágio do câncer, a idade e a saúde geral do paciente, bem como tratamentos passados, para prescrever uma estratégia ideal e individualizada (SAC, 2016).

Com relação aos tipos de quimioterápicos, podem ser classificados de acordo com a sua atuação sobre o ciclo celular. Deste modo, é denominado como ciclo-inespecíficos, aqueles que atuam em células que estão ou não no ciclo proliferativo; ciclo-específicos, os que atuam somente nas células que se encontram em proliferação e por fim os fase-específicos, sendo os que atuam em fases específicas do ciclo celular (BRUCE, 1966). Além disso, tais agentes também podem ser classificados quanto à estrutura química e função celular (SAC, 2016)

Com relação ao câncer de bexiga, a utilização de quimioterapia é realizada em casos de tumores não músculo invasivo associado a cirurgia de RT (CLARK, 2013). Quanto aos casos de CBMI, a administração dos fármacos também é relacionada a uma técnica cirúrgica (DASH, 2008; ZARGAR, 2015). Porém com relação ao câncer de bexiga metastático o tratamento consiste na quimioterapia de multidrogas, sendo mais utilizado o etotrexato, vinblastina, doxorubicina e cisplatina ou a combinação de gemcitabina mais cisplatina (CLARK, 2013).

Tabela 1- Principais fármacos utilizados para o tratamento de câncer de bexiga, com suas respectivas estruturas químicas e principais efeitos adivesos.

FÁRMACOS	ESTRUTURA QUÍMICA	MECANISMO DE AÇÃO	PRINCIPAIS EFEITOS ADVERSOS
Metotrexato		Inibe o metabolismo do ácido fólico e a dihidrofolate redutase	Neutropenia, parestesia e estomatite ulcerativa
Vimblastina		Inibe polimerização das proteínas do fuso mitótico, parando a divisão celular na metáfase	Pressão alta, leucopenia e trombocitopenia
Doxorrubicina		Liga-se ao DNA da célula impedindo a síntese de DNA, RNA e proteínas e produz radicais livres de hidroxila (OH)	Cardiotoxicidade, mielodepressão e reações cutâneas
Cisplatina		Inibe a transcrição e replicação, induzindo a apoptose	Nefrotoxicidade, ototoxicidade e mielodepressão
Gencitabina		Substitui um dos blocos de construção dos ácidos nucleicos, durante a replicação do DNA inibe a função normal da célula	Mielossupressão, mialgia e edema periférico

4.2 Modelos biológicos

Os modelos biológicos vêm apresentando grande importância nas investigações científicas há séculos (HAU, 2008). Sendo inicialmente empregados com a finalidade de visualizar e compreender sistemas biológicos, e posteriormente usados em pesquisa experimental (DANIELSKI, 2011). Dados demonstram que aproximadamente dois terços dos ganhadores do prêmio Nobel de fisiologia ou medicina desde o ano de 1901 contaram com resultados provenientes de experimentos em modelos animais para suas pesquisas (BURGGREN, 2007).

Com a realização de experimentos com animais, surgiram também, questões envolvendo a responsabilidade ética, que impulsionaram a criação de organizações internacionais para o desenvolvimento de técnicas alternativas para reduzir e melhorar a experimentação animal (MARAFANTE, 1994; STOKES, 2002). Bem como a proposta dos 3 Rs, do inglês “*Reduce, Replace and Refine*” (FENWICK, 2005). Essa exige que o número de animais utilizados para experimentos seja reduzido ao número mínimo necessário, a utilização de métodos alternativos e, por fim, os testes devem ser refinados com a finalidade de diminuir o sofrimento dos modelos biológicos (RUSSELL E BURCH, 1959).

Estes modelos biológicos necessitam demonstrar conformidades a anatomia normal e fisiologia dos órgãos e tecidos humanos de interesse, bem como refletir com precisão aspectos fisiológicos e bioquímicos da patogênese estudada (DENAYER, 2014). No entanto, em alguns casos é comum encontrar uma dificuldade para relacionar as respostas obtidas nos estudos laboratoriais com o animal pré-clínico e os humanos (MAK, 2014).

Esta problemática ocorre de forma frequente em pesquisas relacionadas a área de oncologia, uma vez que retratar a heterogeneidade e características complexas do tumor em modelos animais apresenta algumas dificuldades (HUSZTHY, 2012; VAN MARION, 2016). Sendo assim, surgem casos onde terapias candidatas que apresentam bons resultados nas fases de estudo e experimentação animal, porém acabam falhando em ensaios clínicos (WILLIAMS, 2013; LEDFORD, 2011). Neste

cenário, a terapêutica contra o câncer apresenta a maior taxa de proporção dessas falhas (ARROWSMITH, 2011).

4.2.1 Modelos biológicos para câncer de bexiga

Como visto anteriormente, modelos animais ideais para estudos relacionados ao câncer de bexiga são extremamente necessários tanto para o desenvolvimento de novos fármacos quanto para elucidar as características destas neoplasias. Desta forma, estes animais devem apresentar características histopatológicas semelhantes, curso natural do crescimento e progressão do tumor semelhantes aos humanos. Porém, além disso, outras características como possuir uma alta reprodutibilidade também são importantes e levados em consideração quando é feita a escolha do biomodelo.

Estes modelos animais de câncer de bexiga podem ser divididos em dois tipos principais: a autóctone, também conhecidos como espontâneos; e não autóctone ou transplantável (JOHN, 2017). Sendo os primeiros modelos induzidos quimicamente ou modelos geneticamente modificados. Já os modelos transplantáveis podem ainda ser subclassificados como singeneicos, quando são gerados pela implantação de células cancerígenas da bexiga de um animal em outro da mesma espécie imunocompetentes ou transgênicos, ou como xenoenxertos, quando células cancerígenas da bexiga humana são implantadas em animais imunodeficientes (AHMAD, 2012; BERNARDO, 2016; JOHN, 2017) Além disso, podem ainda ser divididos com base no local do tumor, sendo denominados como ortotópico quando o crescimento do tumor ocorre dentro da bexiga e heterotópico quando o crescimento do tumor ocorre fora da bexiga (JOHN, 2017).

4.2.1.1 Modelos quimicamente induzidos

Os modelos de câncer de bexiga quimicamente induzidos por agentes cancerígenos foram inicialmente explorados na década de 1960, sendo os primeiros modelos usados para avaliar as ações da quimioterapia para câncer de bexiga (DRUCKREY, 1964; SOLOWAY, 1975). Nestes modelos, as neoplasias no urotélio foi induzida através da exposição destes animais a agentes cancerígenos, como N-butil-

N- (4-hidroxibutil) nitrosamina (BBN), N- [4- (5-nitro-2-furil) -2-tiazolil] -formamida (FANFT) e N-metil-N-nitrosourea. Estes agentes cancerígenos podem ser administrados sistemicamente, através da técnica de gavagem ou na água potável, ou localmente, por injeção ou por instilação (BERNARDO, 2016).

Esta técnica é comumente empregada em roedores uma vez que esses não desenvolvem tumores espontâneos da bexiga urinária em condições normais. Como por exemplo, em alguns estudos os ratos C3H/He foram expostos ao BBN, um carcinógeno genotóxico completo derivado metabolicamente de um composto encontrado na fumaça do tabaco, resultando no desenvolvimento de hiperplasia, displasia, UBC, CIS e CBMI papilares de baixo e alto grau no urotélio de roedores expostos (OLIVEIRA, 2006b). Porém, o grau de divisão celular e a extensão da invasão tumoral aumentaram de forma proporcional aos níveis de doses do carcinógeno e período prolongado de exposição (OLIVEIRA, 2006a). Exposição de ratos Fischer 344 ao BBN também resultou em tumores papilares (OLIVEIRA, 2006b).

Por outro lado, este biomodelo também apresenta algumas limitações. Sendo uma delas, um problema de saúde e de segurança em torno da equipe do laboratório que realiza o manejo destes modelos, visto que é necessária a manipulação dos agentes cancerígenos para serem administrados através da técnica de gavagem ou na água potável, ou localmente, por injeção ou por instilação (BERNARDO, 2016). Além disso, outra desvantagem deste sistema é que a indução e progressão do tumor leva em torno de 8 a 14 meses, dependendo do agente cancerígeno e da dosagem utilizada (AHMAD, 2012)

4.2.1.2 Modelo de xenoenxerto derivado do paciente

Os modelos de tumor xenoenxertos derivados de pacientes são obtidos através da implantação de células tumorais provenientes de humanos em camundongos imunocomprometidos. Os tumores que se desenvolvem nestes animais derivam diretamente de amostras de tumores de pacientes com manipulação mínima e recapitulam as características biológicas do tumor humano de origem. Desta forma, esses modelos preservam a estrutura celular e os marcadores moleculares dos

tumores originais e possuem alto poder preditivo (FICHTNER, 2004; RUBIO-VIQUEIRA, 2009; DONG, 2010).

As principais limitações deste modelo estão relacionadas ao longo período de latência antes do início do crescimento do tumor e a baixa taxa de aceitação, especialmente na primeira passagem. Visto que o estroma e o suprimento sanguíneo são fornecidos pelo hospedeiro e o tumor não está crescendo no órgão de origem. O microambiente artificial do tumor pode explicar a rara ocorrência de metástase tumoral observada nesses modelos subcutâneos (HOFFMAN, 2015). A ausência do sistema imunológico do hospedeiro também é um fator importante a ser considerado, pois influencia o comportamento do tumor (YANG, 2004), além de impossibilitar a realização de imunoterapias como o tratamento com BCG.

Portanto, como mencionado nos tópicos anteriores, no geral, modelos de roedores utilizados atualmente apresentam limitações quanto ao seu uso como modelo biológico para o estudo do câncer de bexiga. Deste modo, acredita-se que o modelo adequado para estudos relacionados ao câncer sejam animais grandes, como os suínos (SCHOOK, 2015).

4.2.1.3 Roedores como biomodelos para CB

As espécies mais comumente usadas para pesquisa com animais são roedores de pequeno porte, como camundongos e ratos, uma vez que estes apresentam baixo custo de manutenção e a genética bem conhecida, além de poderem ser geneticamente modificados com facilidade (VANDAMME, 2014). No entanto, estes animais costumam ser utilizados em alguns estudos mesmo não sendo o biomodelo ideal e não adequado para as doenças humanas estudadas (BURNS, 2015; SEOK, 2013), incluindo para o câncer (DE JONG, 2010).

Linhagens de camundongos como C57B6, BALBC e ICR e linhagens de ratos como Wistar, Sprague-Dawley e Fisher são comumente empregadas em pesquisas relacionadas ao câncer de bexiga (VASCONCELOS-NOBREGA, 2012). Visto que algumas linhagens de ratos, como Brown Norway e DA/Han, apresentam uma baixa incidência de tumores espontâneos da bexiga e, portanto, podem ser usadas como

modelos experimentais sem tratamento com carcinógenos químicos (VAN MOORSELAAR, 1993). Porém, o câncer de bexiga não é muito comum em roedores, sendo necessária a indução de tumores, como por exemplo através de carcinogênicos químicos (CLAYSON, 1995) ou oncogenes (OLIVEIRA, 2006a).

Apesar de que estes modelos de camundongos geneticamente modificados sejam boas alternativas para estudar a biologia do câncer (JEONG, 2016; JIANG, 2017; PEREZ-GUIJARRO, 2017) e apresentarem resultados melhores em relação aos modelos de camundongos selvagens, eles ainda possuem diversas limitações (LIMITAÇÕES). Um exemplo dessas são as dificuldades encontradas no processo de utilizar os resultados obtido nos estudos pré-clínicos com estes biomodelos para realizar os próximos testes clínicos, visto que algumas respostas geradas por estes demonstram divergências quando comparadas as humanas

4.2.1.4 Cães como biomodelos para CB

O câncer de bexiga ocorre cães de maneira natural e compreende aproximadamente 2% de todos os cânceres que acomete estes animais, apresentando taxas semelhantes em humanos (WITHROW, 2019; LERNER, 2006). O diagnóstico desta patologia é realizado por exame histológico de biópsias de tecido que é coletadas por cirurgia, cistoscopia ou biópsia por cateter (WITHROW, 2019). A grande maioria de CB em cães (> 90% dos casos) consiste em CB invasivo de grau intermediário a alto (PATRICK, 2006; VALLI, 1995).

Desta forma, por apresentarem estas neoplasias de forma natural estes animais podem ser utilizados como pacientes em estudos de tratamento, onde esses recebem tratamento que é esperado para ajudá-lo (KNAPP, 2014). Com isso, os resultados destes tratamentos de estudos podem ajudar outros cães, bem como podem ajudar nas buscas de novos tratamentos para os seres humanos. Além disso, estes testes de tratamento para cães de estimação contam com financiamento de patrocinadores, o que permite que os donos possam continuar o tratamento de seu cão, mesmo que não consigam pagar outras terapias (KNAPP, 2014).

Estes estudos utilizam amostras de sangue, urina, tecidos tumorais e a maioria dos donos de animais também permite a necropsia do cachorro quando ele morre ou é sacrificado (KNAPP, 2014). Isso fornece informações cruciais sobre o processo da doença e a resposta à terapia e a oportunidade de depositar amostras de tecido para estudos futuros (ABBO, 2010). Porém a utilização destes animais como modelos biológicos, apresentam algumas implicações como a disponibilidade dos cães e o fato que estas neoplasias ocorrem de forma espontânea, não sendo possível o controle destas em meio laboratorial.

4.2.2 Suínos como modelo biológico

Nos últimos anos, os suínos surgiram como um importante modelo biológico, visto que esses apresentam diversas semelhanças anatômicas, genéticas e fisiológicas com os seres humanos (SCHOOK, 2008; KUZMUK, 2011, GROENEN, 2012). E esses animais demonstram um melhor desempenho em relação à tratamentos terapêuticos quando comparados aos roedores (MEURENS et al., 2012) uma vez que os suínos são capazes de metabolizar drogas e causar respostas mais similar aos humanos (ADAM, 2007; POLLOCK, 2007). Além disso, esses possuem uma alta homologia com o genoma humano da mesma forma que exibem regulação epigenética altamente conservada com padrões genômicos de metilação semelhantes aos humanos (SCHACHTSCHNEIDER, 2015), e estes fatores ajudaram na aceitação dos suínos como modelo biológico de grande porte para doenças humanas (PRATHER, 2013; SCHOOK et al, 2015).

Devido a estas características, suínos dispõem de grande aplicabilidade sendo considerados modelos ideais para a engenharia de tecidos, estudos de imagem (LUNNEY, 2007; SPURLOCK, 2008) cirurgia, quimioterapia e radiação (KUZMUK, 2009), tendo também, uma grande importância para estudos relacionados à obesidade, nutrição e doença transmissível (SCHOOK, 1997). Além disso, por possuírem o sistema cardiovascular normal semelhantes ao dos humanos (MCKENZIE, 1996), são utilizados como modelos para doenças cardiovasculares (JENSEN, 2010).

Os suínos também são destaques no setor cirúrgico por possuírem características anatômicas próximas com seres humanos. De modo a serem o modelo cirúrgico geral na arena internacional de treinamento e pesquisa (SCHOOK, 20015). Sendo utilizado como biomodelo em diversos procedimentos, incluindo cirurgia geral, laparoscopia e endoscopia, transplante, procedimentos de trauma, dispositivos de implantação e transplantes, são realizados em porcos (SWINDLE, 2009).

Por fim, a oncologia é outra área em que modelo suíno vem sendo empregados, visto que as células suínas são bastante resistentes a transformação, e assim como em células humanas, essas requerem múltiplas alterações genéticas para o desenvolvimento de neoplasias (ADAM, 2007), também podem desenvolver tumores de tamanho semelhante aos humanos, diferentemente dos roedores, (ADAM, 2007; POLLOCK, 2007). Além disso, mutações que estão frequentemente presentes em cânceres humanos também induzem tumorigênese em células suínas (PATHAK, 2000).

Deste modo, este biomodelo fornece um sistema ideal para estudos relacionados à oncologia (SCHOOK, 2008). Podendo ser também uma boa ferramenta para área de farmacologia, buscando melhorar e solucionar falhas existente entre o processo de testes de potenciais novos tratamentos ou produtos e as respostas geradas pelos pacientes (SEGATTO, 2017).

4.2.2.1 *Oncopig cancer model*

Com o surgimento da técnica da engenharia genética, surgiu também, a possibilidade de desenvolver modelos transgênicos de animais (AIGNER, 2010). Sendo esses, produzidos através de técnicas, como a microinjeção de DNA no pronúcleo de oócitos fertilizados, transgênese lentiviral, transferência de genes mediada por espermatozóide e transferência nuclear de células somáticas (SCNT) usando células doadoras nucleares geneticamente modificadas (AIGNER, 2010).

Dentre estes biomodelos transgênicos, tem destaques os suínos, uma vez que esses são capazes de reproduzir alterações genéticas particulares encontradas em doenças humanas, de modo a serem vistos como modelo biológico ideal para diversas

doenças humanas (AIGNER, 2010). Os mesmos estão estabelecidos como modelos para doenças neurodegenerativas (KRAGH et al., 2009), fibrose cística (ROGERS, 2008), doenças cardiovasculares (HAO, 2006), diabetes mellitus (RENNER, 2010) e até mesmo câncer (FLISIKOWSKA, 2012; SCHOOK, 2015).

Deste modo, foi desenvolvido pela Universidade de Illinois e o Centro Nacional de Recursos e Pesquisa em Suínos, um modelo suíno induzível pelo sistema Cre-LoxP, denominado como *Oncopig Cancer Model (OCM)*. Este contém em seu genoma um LSL- cassete com TP53 negativo dominante (mutação R167H) e KRAS ativado (mutação G12D) (SCHOOK, 2015). O que torna possível mimetizar, nestes animais, o processo de formação de tumores espontâneos que ocorrem nos seres humanos, sendo esses, análogos do mouse KRAS/p53 (HINGORANI, 2005).

Para o desenvolvimento deste biomodelo, foi primeiramente realizada a construção genica, conforme a figura 3, que apresenta os genes KRAS e TP53 com as respectivas mutações, além de conter um *stopcodon* entre duas regiões Loxp, que impede que ocorra a transcrição destes genes de forma espontânea. Em seguida foi realizada a transfecção destes plasmídeos em fibroblastos e a comprovação, pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), que estas células contiam, em seu material genético, os genes KRAS e TP53 mutados. Por fim, foi realizada a transferência nuclear de células somáticas (SCNT), que consiste na transferência do núcleo da célula transfectada para um oócito enucleado para que ocorra o desenvolvimento do biomodelo (SCHOOK, 2015) (Figura 3).

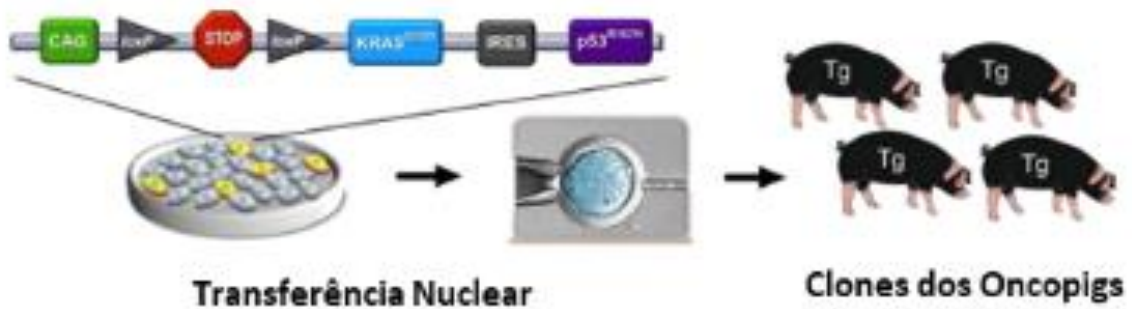


Figura 3- Desenvolvimento do modelo *Oncopig* através da transfeccção de vetores plasmidiais contendo os genes $KRAS^{G12D}$ e $TP53^{R167H}$ em fibroblastos e a transferência nuclear de células somáticas.

Fonte: Adaptado de SCHOOK, 2016.

Posterior a criação dos OCM, as células de fibroblastos foram isoladas e expostas ao sistema Cre-LoxP, para verificar se essas são capazes de desenvolver fenótipo tumoral. Este sistema permite que a expressão de ambas as mutações, em qualquer célula do suíno, ocorra somente após adição de AdCre, que se caracteriza por um adenovírus que expressa Cre recombinase (figura 4 A). Esta por sua vez, é capaz de retirar as informações genicas contidas entre as regiões denominadas Loxp, que neste caso é um *stopcodon* que estava impedido a transcrição dos genes KRAS e TP53 mudatos. Desta forma, após a retirada do *stopcodon*, as células passam a transcrever os genes mutantes, adquirindo assim, um fenótipo tumoral (figura 4 B).

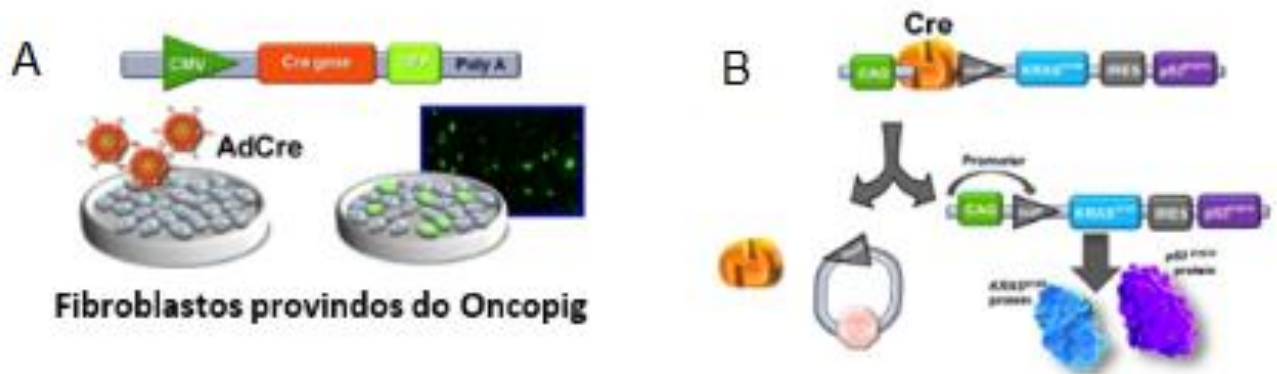


Figura 4- Sistema Cre-LoxP em fibroblastos isolados do OCM. Sendo A: AdCre, adenovírus que expressa Cre recombinase; B: Ação da Cre recombinase, retirada do *stopcodon* localizado entre as regiões denominadas Loxp, fazendo com que as células passam a transcrever os genes mutantes, adquirindo fenótipo tumoral.

Fonte: Adaptado de SCHOOK, 2016.

Deste modo, os animais gerados por este sistema possuem um fenótipo normal durante as etapas do seu desenvolvimento. Estes quando forem ser utilizados como modelos de estudo, através da administração do sistema Adcre, passaram a adquirir um fenótipo tumoral. Sendo assim, estes biomodelos apresentam um caráter induzível, conforme mostra a figura 5.

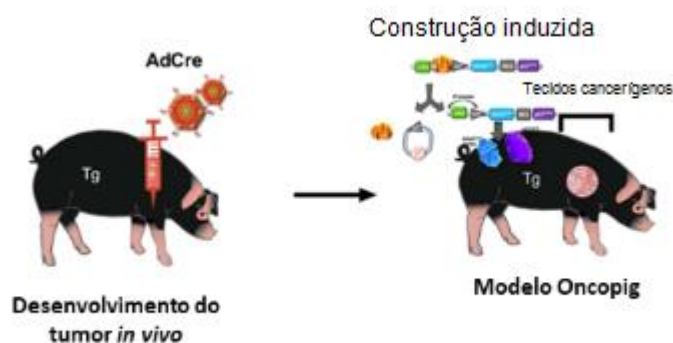


Figura 5- Ativação do modelo Oncopig usando o sistema induzível Cre-LoxP.

Fonte: Adaptado de SCHOOK, 2016.

Quando submetidos aos testes os OCM demonstram a presença de tumores semelhantes quando comparado aos tumores humanos. Além disso, as células de fibroblastos de *Oncopig* cultivadas em laboratório, apresentaram a expressão de KRAS e TP53 mutantes (SCHOOK, 2015). Já as células provindas de um sarcoma de tecido mole (STM) do OCM, demonstraram indícios de sinalização do TP53 alterados e ativação de sinalização destes indícios de reprogramação epigenética, sendo essas, características transcricionais encontradas em sarcoma de tecido mole humano, além disso, o regulador transcricional FOSL1 de STM humano também foi encontrado regulando as células provindas do *Oncopig* (SCHACHTSCHNEIDER, 2017a).

Também foi desenvolvido os dois histotipos de câncer pancreático mais predominantes (exócrino e neuroendócrino) por meio da entrega de AdCre no ducto pancreático principal (DIAZ, 2016). Por fim, recentemente foi validado um protocolo para desenvolver fibrose METAVIR F3 – F4 no OCM, apoiando então o potencial do OCM como modelo para carcinoma hepatocelular (GABA, 2018).

Desta forma, os OCM apresentam várias aplicações, sendo uma plataforma inovadora na área da oncologia, tendo potencial para triagem e desenvolvimento terapêutico e no desenvolvimento de modalidades de diagnóstico por imagem (SCHACHTSCHNEIDER, 2017). Além de demonstrar inúmeras vantagens em relação aos outros modelos biológicos que são geralmente utilizados (SCHACHTSCHNEIDER, 2017).

4.2.2.1.1 *Oncopig Bladder Cancer Model*

Visto que os suínos possuem potencial de utilização como biomodelo em diversas áreas, devido suas similaridades com os humanos, a utilização destes como modelos de tradução vem ganhando destaque. Hipotetiza-se assim, que a utilização dos mesmos melhoraria o processo de *screening* de novas drogas, de modo a serem utilizados para averiguar a eficácia de novas terapias com resultados promissores em triagens *in vitro* e em testes em animais pequenos, sendo utilizados antes de ensaios clínicos humanos, diminuindo, assim, as taxas de falha (SEGATTO, 2017).

Nosso grupo de pesquisa vem testando a atividade antitumoral de diversos compostos em linhagens celulares de câncer de bexiga, incluindo própolis vermelha brasileira (BEGNINI et al., 2014), derivados de AZT (DA ROSA et al., 2017) e derivados de pirazolina (TESSMANN et al., 2017), demonstrando resultados promissores com uma potencial ação antitumoral frente às linhagens *in vitro* (BEGNINI et al., 2014; DA ROSA et al., 2017; TESSMANN et al., 2017). Porém, uma plataforma de modelo animal adequada, como a OCM, poderia auxiliar e melhorar os ensaios *in vivo* de diversos compostos promissores selecionados previamente em testes *in vitro*.

Desta forma, surgiu o interesse de desenvolver um modelo animal humanizado de câncer de bexiga altamente valioso na plataforma *Oncopig Cancer Model*, aqui denominado como *Oncopig Bladder* (OB). De modo a ser utilizado como uma transição dos ensaios pré-clínicos *in vitro* para ensaios pré-clínicos em sistemas robustos biologicamente. Portanto, os OB serviriam como uma plataforma translacional de teste de moléculas com potencial terapêutico após a realização de triagem fenotípica dos compostos e posterior teste em modelos animais de pequeno porte, como os roedores (figura 4), a fim de comprovar a eficácia da terapia antes de iniciar os ensaios clínicos em humanos (SEGATTO, 2017), uma vez que é exigido que testes de toxicidade sejam realizados em pelo menos duas espécies animais relevantes, pelo comitê internacional de harmonização (FDA, 2010).

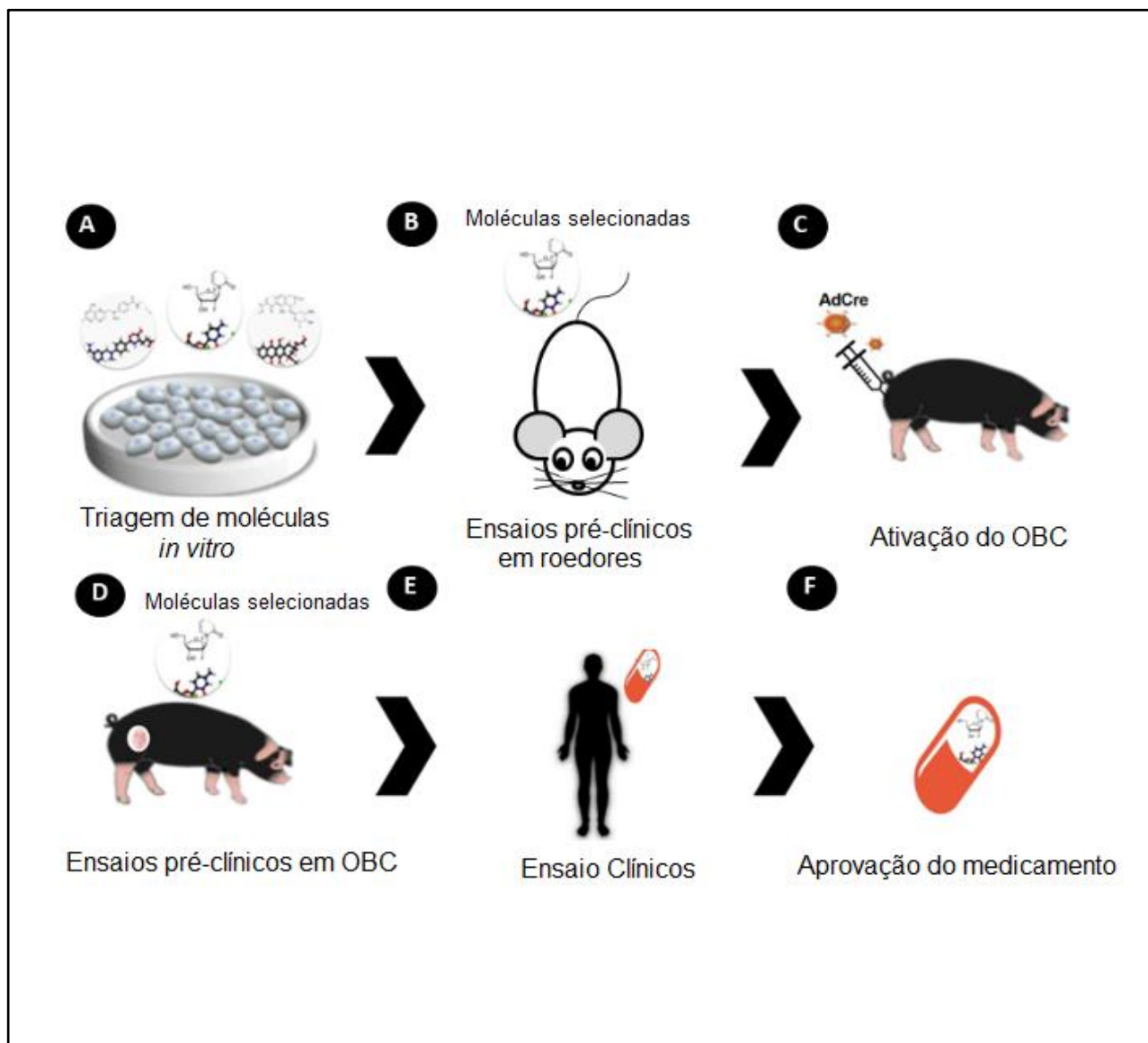


Figura 4- Uso do modelo oncopig para câncer de bexiga na triagem de novas drogas com potencial ação antitumoral. Sendo A: triagem de moléculas em ensaios *in vitro*; B: triagem de moléculas em ensaios *in vivo* em roedores; C: ativação do modelo *oncopig* pelo sistema Adcre; D: triagem de moléculas em ensaios *in vivo* nos *oncopigs*; E: ensaios clínicos em humanos e F: a aprovação de um fármaco.

Fonte: Adaptado de SEGATTO, 2017.

Deste modo, está sendo desenvolvido no Grupo de Pesquisa em Oncologia celular e molecular do laboratório de Biotecnologia do Câncer a tese de doutorado intitulada “*Oncopig cancer model*” como modelo biológico para câncer de bexiga” da doutoranda Natália Vieira Segatto. Esta visa contribuir com a caracterização e aceitação científica do modelo suíno transgênico denominado *Oncopig Cancer Model* como modelo biológico adequado para o estudo do câncer, bem como desenvolver

um modelo animal humanizado de câncer de bexiga altamente valioso na plataforma *oncopig cancer model*, visando sua utilização em uma forma de transição dos ensaios pré-clínicos *in vitro* para ensaios pré-clínicos em sistemas robustos biologicamente. Mais especificamente, identificar o mimetismo de células suínas frente a quimioterápicos antitumorais comerciais utilizados no tratamento de neoplasias de bexiga, como cisplatina, doxorubicina e gencitabina, comparando linhagens tumorais humanas de bexiga com as células transformadas de bexiga provindas do modelo suíno *oncopig*. Além de desenvolver na plataforma *Oncopig Cancer Model* um modelo translacional para câncer de bexiga.

Assim, estudos preliminares realizados compararam a linhagem celular *bladder cancer cell line* (BCCL) provindas do modelo *oncopig*, com linhagens celulares de câncer de bexiga humano, a 5637 e a T24, frente às diferentes concentrações dos quimioterápicos comerciais, doxorubicina, gencitabina e cisplatina e ao tratamento com cepas de BCG e BCG recombinantes. Com o objetivo de verificar o efeito antiproliferativo dos fármacos, bem como avaliar a resposta das células BCCL e tumorais humanas de bexiga, visando comprovar se os resultados apresentados pelas células BCCL serão semelhantes às células 5637 e T24.

Os resultados obtidos até o momento indicam que as células provenientes do OCM são capazes de demonstrar respostas similares às células tumorais de câncer de bexiga humano, em diferentes aspectos analisados, e também apresentaram a capacidade de internalização celular dos BCGs (DADOS NÃO PUBLICADOS). Desta forma, isso poderia indicar que a utilização de um modelo *oncopig* para o câncer de bexiga, o *Oncopig Bladder*, possibilita resultados mais parecido com as respostas humanas, além de permitir a utilização de imunoterapias com BCGs. Apesar de já apresentar repercussões promissoras, a realização de mais estudos para caracterizar e propiciar a aceitação científica do modelo é necessária e está sendo realizada.

Considerações finais

Como destacado no presente trabalho, o desenvolvimento e a validação de novas abordagens terapêuticas para o câncer de bexiga é de extrema importância. Uma vez que os tratamentos atualmente empregados apresentam um alto custo e numerosos efeitos adversos. Deste modo os modelos biológicos adequados para o estudo de neoplasias de bexiga possuem grande relevância, visto que a experimentação animal é um passo fundamental para o processo de desenvolvimento e triagem de novas drogas.

O modelo suíno possui diversas características semelhantes aos humanos. Desta forma, demonstra ser uma plataforma ideal tanto para o estudo do câncer em geral, quanto para estudos de CB e para testes de potenciais terapias antitumorais em estudos pré-clínicos. Com isso, após as análises das problemáticas relacionadas ao câncer de bexiga e seus tratamentos, em adição às limitações dos modelos biológicos comumente utilizados, vimos que o uso do *Oncopig Bladder* para o estudo e triagem de drogas contra neoplasias de bexiga iria beneficiar a pesquisa e o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para esta patologia.

Referências

ABBO, A. H. et al. Phase I clinical trial and pharmacokinetics of intravesical mitomycin C in dogs with localized transitional cell carcinoma of the urinary bladder. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 24, n. 5, p. 1124-1130, 2010.

ABEN, Katja KH et al. Segregation analysis of urothelial cell carcinoma. **European journal of cancer**, v. 42, n. 10, p. 1428-1433, 2006.

ABUFARAJ, Mohammad et al. The role of surgery in metastatic bladder cancer: a systematic review. **European urology**, v. 73, n. 4, p. 543-557, 2018.

ADAM, S. J. et al. Genetic induction of tumorigenesis in swine. **Oncogene**, v. 26, n. 7, p. 1038, 2007.

AGÊNCIA INTERNACIONAL PARA PESQUISA EM CÂNCER (AIPC), 2018. Disponível em: <https://www.iarc.fr/>. Acessado em 11 de novembro de 2019.

AGUDO, Antonio et al. Impact of cigarette smoking on cancer risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 36, p. 4550-4557, 2012.

AHMAD, Imran; SANSOM, Owen J.; LEUNG, Hing Y. Exploring molecular genetics of bladder cancer: lessons learned from mouse models. **Disease models & mechanisms**, v. 5, n. 3, p. 323-332, 2012.

AIGNER, Bernhard et al. Transgenic pigs as models for translational biomedical research. **Journal of molecular medicine**, v. 88, n. 7, p. 653-664, 2010.

AIPC. Iarc Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk To Humans. v. 61, p. 220, 1994.

SOCIEDADE AMERICANA DO CÂNCER. Breast Cancer Staging 7th Edition. **American Joint Committee on Cancer**, p. 1–2, 2010.

SOCIEDADE AMERICANA DO CÂNCER. **Chemotherapy Side Effects**. 2016. Disponível em:. Acesso em: 11 de novembro de 2019.

ANDREW, Angeline S. et al. Bladder cancer risk and personal hair dye use. **International journal of cancer**, v. 109, n. 4, p. 581-586, 2004.

ANTONI, Sebastien et al. Bladder cancer incidence and mortality: a global overview and recent trends. **European urology**, v. 71, n. 1, p. 96-108, 2017.

ARROWSMITH, John. Trial watch: phase III and submission failures: 2007–2010. 2011.

BABJUK, M., BÖHLE, A., BURGER, M., COMPÉRAT, E., KAASINEN, E., PALOU, J., ROUPRÊT, M., VAN RHIJN, B. W. G., SHARIAT, S., SYLVESTER, R., AND ZIGEUNER, R Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (Ta, T1 and CIS). **European association of urology**, v. 1, n. 2, p. 1–42, 2015.

BBC NEWS/ BRASIL . Disponível em: <https://www.bbc.com/portuguese/brasil-50243246>. Acessado em 11 de novembro de 2019.

BEGNINI, K. R.; BUSS, J. H.; COLLARES, T.; SEIXAS, F. K. Recombinant Mycobacterium bovis BCG for immunotherapy in nonmuscle invasive bladder cancer. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 99, n. 9, p. 3741–3754, 2015.

BEGNINI, Karine Rech et al. Brazilian red propolis induces apoptosis-like cell death and decreases migration potential in bladder cancer cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

BEGNINI, K.R.; RIZZI, C.; CAMPOS, V.F.; BORSUK, S.; SCHULTZE, E.; YURGEL, V.C.; NEDEL, F.; DELLAGOSTIN, O.A.; COLLARES, T.; SEIXAS, F.K. Auxotrophic

recombinant *Mycobacterium bovis* BCG over expressing Ag85B enhances cytotoxicity on superficial bladder cancer cells in vitro. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.97, p. 1545-53, 2013.

BERNARDO, Carina et al. What we have learned from urinary bladder cancer models. **Journal of Cancer Metastasis and Treatment**, v. 2, n. 2, p. 51-8, 2016.

BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

BRUCE, W. R.; MEEKER, B. E.; VALERIOTE, F. A. Comparison of the sensitivity of normal hematopoietic and transplanted lymphoma colony-forming cells to chemotherapeutic agents administered in vivo. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 37, n. 2, p. 233-245, 1966

BURGER, Maximilian et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. **European urology**, v. 63, n. 2, p. 234-241, 2013.

BURGGREN, Warren W.; WARBURTON, Stephen. Amphibians as animal models for laboratory research in physiology. **ILAR journal**, v. 48, n. 3, p. 260-269, 2007.

BURNS, T. C.; LI, M. D.; MEHTA, S.; AWAD, A. J.; MORGAN, A. A. Mouse models rarely mimic the transcriptome of human neurodegenerative diseases: A systematic bioinformatics-based critique of preclinical models. **European Journal of Pharmacology**, v. 759, p. 101–117, 2015.

CATSBURG, Chelsea E. et al. Dietary sources of N- nitroso compounds and bladder cancer risk: Findings from the Los Angeles bladder cancer study. **International journal of cancer**, v. 134, n. 1, p. 125-135, 2014.

CHANG, Sam S. et al. Treatment of non-metastatic muscle-invasive bladder cancer: AUA/ASCO/ASTRO/SUO guideline. **The Journal of urology**, v. 198, n. 3, p. 552-559, 2017.

CLARK, Peter E. et al. Bladder cancer. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 11, n. 4, p. 446-475, 2013.

CLAYSON, D. B.; FISHBEIN, L.; COHEN, Samuel Monroe. Effects of stones and other physical factors on the induction of rodent bladder cancer. **Food and chemical toxicology**, v. 33, n. 9, p. 771-784, 1995

COLLINS, Shane D.; LEECH, Michelle M. A review of plan library approaches in adaptive radiotherapy of bladder cancer. **Acta Oncologica**, v. 57, n. 5, p. 566-573, 2018

COOKE, P. W. et al. Long-Term Risk of Salvage Cystectomy after Radiotherapy for Muscle-Invasive Bladder Cancer. **European urology**, v. 38, n. 3, p. 279-286, 2000.

CUMBERBATCH, Marcus G. et al. The role of tobacco smoke in bladder and kidney carcinogenesis: a comparison of exposures and meta-analysis of incidence and mortality risks. **European urology**, v. 70, n. 3, p. 458-466, 2016.

DANIELSKI, J. C. R.; BARROS, D. M.; CARVALHO, H. A. H. O. Animal use for teaching and research purposes: pros and cons. R. **Eletr. De. Com. Inf. Inov. Saúde. Rio de Janeiro**, v. 5, p. 72, 2011.

DA ROSA, Raquel Mello et al. Synthesis, antioxidant and antitumoral activities of 5'-arylchalcogeno-3-aminothymidine (ACAT) derivatives. **MedChemComm**, v. 8, n. 2, p. 408-414, 2017.

DASH, Atreya et al. A role for neoadjuvant gemcitabine plus cisplatin in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: a retrospective experience. **Cancer**, v. 113, n. 9, p. 2471-2477, 2008.

DE JONG, M.; MAINA, T. Of mice and humans: are they the same?--Implications in cancer translational research. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 51, n. 4, p. 501-504, 2010

DENAYER, Tinneke; STÖHR, Thomas; VAN ROY, Maarten. Animal models in translational medicine: Validation and prediction. **New Horizons in Translational Medicine**, v. 2, n. 1, p. 5-11, 2014.

DIAZ, Andrew et al. Pigs as a new weapon against cancer: modeling solid tumors in porcine. 2016.

DINNEY, Colin PN et al. Focus on bladder cancer. **Cancer cell**, v. 6, n. 2, p. 111-116, 2004.

DONG, Xin et al. Patient-Derived First Generation Xenografts of Non–Small Cell Lung Cancers: Promising Tools for Predicting Drug Responses for Personalized Chemotherapy. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 5, p. 1442-1451, 2010.

DONIN, N. M.; LENIS, A. T.; HOLDEN, S.; DRAKAKI, A.; PANTUCK, A., BELLDEGRUN, A.; CHAMIE, K. Review Article Immunotherapy for the Treatment of Urothelial Carcinoma. **Journal of Urology**, v. 197, n. 1, p. 14–22, 2017.

DRUCKREY, H. Selective induction of bladder cancer in rats by dibutyl- and N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. **Z Krebsforsch**, v. 66, p. 280-290, 1964.

DYRSKJØT, Lars et al. Gene expression signatures predict outcome in non–muscle-invasive bladder carcinoma: a multicenter validation study. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 12, p. 3545-3551, 2007.

ELMAMOUN, Mamoun H.; CHRISTMAS, Tim J.; WOODHOUSE, Christopher R.J. Destruction of the bladder by single dose Mitomycin C for low- stage transitional cell carcinoma (TCC)–avoidance, recognition, management and consent. **BJU international**, v. 113, n. 5b, p. E34-E38, 2014.

FENWICK, Nicole Patricia. **The Three Rs in the pharmaceutical industry: perspectives of scientists and regulators**. 2005. Tese de Doutorado. University of British Columbia.

FERLAY, Jacques et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-E386, 2015.

FICHTNER, I. et al. Anticancer drug response and expression of molecular markers in early-passage xenotransplanted colon carcinomas. **European journal of cancer**, v. 40, n. 2, p. 298-307, 2004.

FLISIKOWSKA, Tatiana et al. A porcine model of familial adenomatous polyposis. **Gastroenterology**, v. 143, n. 5, p. 1173-1175.7, 2012.

Food and Drug Administration (FDA). (2010). Guidance on M3(R2) Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals. *In: International Conference on Harmonisation 75*, 1-25. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm073246.pdf>

FOREMAN, Kyle J. et al. Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016–40 for 195 countries and territories. **The Lancet**, v. 392, n. 10159, p. 2052-2090, 2018.

FREEDMAN, Neal D. et al. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. **Jama**, v. 306, n. 7, p. 737-745, 2011.

GABA, Ron C. et al. Characterization of an Inducible Alcoholic Liver Fibrosis Model for Hepatocellular Carcinoma Investigation in a Transgenic Porcine Tumorigenic Platform. **Journal of Vascular and Interventional Radiology**, v. 29, n. 8, p. 1194-1202. e1, 2018.

GBD 2015 RISK FACTORS COLLABORATORS et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet**, v. 388, n. 10053, p. 1659-1724, 2016.

GERSTEN, Omer; WILMOTH, John R. The cancer transition in Japan since 1951. **Demographic Research**, v. 7, p. 271-306, 2002.

GOEBELL, Peter J.; KNOWLES, Margaret A. Bladder cancer or bladder cancers? Genetically distinct malignant conditions of the urothelium. In: **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**. Elsevier, 2010. p. 409-428.

GONTERO, Paolo et al. The role of bacillus Calmette-Guérin in the treatment of non-muscle-invasive bladder cancer. **European urology**, v. 57, n. 3, p. 410-429, 2010.

GROENEN, Martien AM et al. Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. **Nature**, v. 491, n. 7424, p. 393, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

HAO, Y. H. et al. Production of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) over-expressing piglets. **Transgenic research**, v. 15, n. 6, p. 739-750, 2006.

HAU, Jann. Animal models for human diseases. In: **Sourcebook of models for biomedical research**. Humana Press, 2008. p. 3-8.

HERR, H.W. Chemoprevention of premalignant and early malignant lesions of the bladder. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.50, p.111, 1992

HERR, Harry W.; MORALES, Alvaro. History of bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer: an immunotherapy success story. **The Journal of urology**, v. 179, n. 1, p. 53-56, 2008.

HINGORANI, Sunil R. et al. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. **Cancer cell**, v. 7, n. 5, p. 469-483, 2005.

HOELDER, Swen; CLARKE, Paul A.; WORKMAN, Paul. Discovery of small molecule cancer drugs: successes, challenges and opportunities. **Molecular oncology**, v. 6, n. 2, p. 155-176, 2012.

HOFFMAN, Robert M. Patient-derived orthotopic xenografts: better mimic of metastasis than subcutaneous xenografts. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 8, p. 451, 2015.

HUSZTHY, Peter C. et al. In vivo models of primary brain tumors: pitfalls and perspectives. **Neuro-oncology**, v. 14, n. 8, p. 979-993, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA), 2018. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>. Acessado em 11 de novembro de 2019.

JANKOVIĆ, Slavenka; RADOSAVLJEVIĆ, Vladan. Risk factors for bladder cancer. **Tumori Journal**, v. 93, n. 1, p. 4-12, 2007.

JENSEN, Tor W. et al. A cloned pig model for examining atherosclerosis induced by high fat, high cholesterol diets. **Animal biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 179-187, 2010.

JEONG, J. H. Inducible Mouse Models for Cancer Drug Target Validation. **Journal of Cancer Prevention**, v. 21, n. 4, p. 243–248, 2016.

JIANG, Y.; YU, Y. Transgenic and gene knockout mice in gastric cancer research. **Oncotarget**, v. 8, n. 2, p. 3696–3710, 2017.

JOHN, Bincy Anu; SAID, Neveen. Insights from animal models of bladder cancer: recent advances, challenges, and opportunities. **Oncotarget**, v. 8, n. 34, p. 57766, 2017.

JOHNSTONE, Ricky W.; RUEFLI, Astrid A.; LOWE, Scott W. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. **Cell**, v. 108, n. 2, p. 153-164, 2002.

JUNOD, Suzanne White. FDA and clinical drug trials: a short history. **US Food and Drug Administration**, 2014.

KAMAT, A. M.; HAHN, N. M.; EFSTATHIOU, J. A.; LERNER, S. P.; MALMSTRÖM, P. U.; CHOI, W.; GUO, C. C.; LOTAN, Y.; KASSOUF, W. Bladder cancer. **The Lancet**, v. 388, n. 10061, p. 2796–2810, 2016.

KANTOR, Arlene F. et al. Familial and environmental interactions in bladder cancer risk. **International journal of cancer**, v. 35, n. 6, p. 703-706, 1985.

KAUFMAN, Donald S.; SHIPLEY, William U.; FELDMAN, Adam S. Bladder cancer. **The Lancet**, v. 374, n. 9685, p. 239-249, 2009.

KNAPP, Deborah W. et al. Urinary bladder cancer in dogs, a naturally occurring model for cancer biology and drug development. **ILAR journal**, v. 55, n. 1, p. 100-118, 2014.

KOBAYASHI, Takashi et al. Modelling bladder cancer in mice: opportunities and challenges. **Nature reviews Cancer**, v. 15, n. 1, p. 42-54, 2015.

KRAGH, Peter M. et al. Hemizygous minipigs produced by random gene insertion and handmade cloning express the Alzheimer's disease-causing dominant mutation APP^{sw}. **Transgenic research**, v. 18, n. 4, p. 545-558, 2009.

KUZMUK, Kristy N. et al. Animal models for elucidating human disease: confronting cancer and other chronic diseases. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 4, n. 032, p. 1-9, 2009.

LEDFORD, Heidi. 4 ways to fix the clinical trial. **Nature**, v. 477, n. 7366, p. 526, 2011.

LERNER, Seth P.; SCHOENBERG, Mark; STERNBERG, Cora (Ed.). **Textbook of bladder cancer**. CRC Press, 2006

LETAŠIOVÁ, Silvia et al. Bladder cancer, a review of the environmental risk factors. **Environmental Health**, v. 11, n. 1, p. S11, 2012.

LOWRANCE, William T. et al. Contemporary open radical cystectomy: analysis of perioperative outcomes. **The Journal of urology**, v. 179, n. 4, p. 1313-1318, 2008.

LUNNEY, Joan K. Advances in swine biomedical model genomics. **International journal of biological sciences**, v. 3, n. 3, p. 179, 2007.

Mak, I. W., Evaniew, N., and Ghert, M. (2014). Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am J Transl Res* 6, 114–118. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24489990>.

MALMSTRÖM, Per-Uno et al. Early metastatic progression of bladder carcinoma: molecular profile of primary tumor and sentinel lymph node. **The Journal of urology**, v. 168, n. 5, p. 2240-2244, 2002.

MARAFANTE, E.; SMYRNIOTIS, T.; BALLS, M. ECVAM: the European centre for the validation of alternative methods. **Toxicology in vitro**, v. 8, n. 4, p. 803-805, 1994.

MASOOD, Farha. Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. **Materials Science and Engineering: C**, v. 60, p. 569-578, 2016.

MCCONKEY, David J. et al. Molecular genetics of bladder cancer: Emerging mechanisms of tumor initiation and progression. In: **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**. Elsevier, 2010. p. 429-440.

MCKENZIE, Jack E. et al. Effects of soman (pinacolyl methylphosphonofluoridate) on coronary blood flow and cardiac function in swine. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 29, n. 1, p. 140-146, 1996.

MEURENS, François et al. The pig: a model for human infectious diseases. **Trends in microbiology**, v. 20, n. 1, p. 50-57, 2012.

MISRA, Ranjita; ACHARYA, Sarbari; SAHOO, Sanjeeb K. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. **Drug discovery today**, v. 15, n. 19-20, p. 842-850, 2010.

MIURA, Koh et al. Inhibitor of apoptosis protein family as diagnostic markers and therapeutic targets of colorectal cancer. **Surgery today**, v. 41, n. 2, p. 175-182, 2011.

MOSCHINI, M.; D'ANDREA, D.; KORN, S.; IRMAK, Y.; SORIA, F.; COMPÉRAT, E.; SHARIAT, S. F. Characteristics and clinical significance of histological variants of bladder cancer. **Nature Reviews Urology**, v. 14, n. 11, p. 651–668, 2017.

MURTA-NASCIMENTO, Cristiane et al. Risk of bladder cancer associated with family history of cancer: do low-penetrance polymorphisms account for the increase in risk?. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 16, n. 8, p. 1595-1600, 2007.

OLIVEIRA, P. A. et al. Experimental bladder carcinogenesis—rodent models. **Experimental oncology**, 2006a.

Oliveira PA, Palmeira C, Colaço A, De La Cruz P LF, Lopes C. DNA content analysis, Ki-67 and p53 expression in rat urothelial lesions induced by N-butyl-N- (4-hydroxybutyl) nitrosamine and treated with mitomycin C and Bacillus Calmette-Gue'rin. **Anticancer Res** 2006; 26: 2995-3004b.

OMRAN, Abdel R. The epidemiologic transition: a theory of the epidemiology of population change. **The Milbank Quarterly**, v. 83, n. 4, p. 731-757, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. O.M.S. World Cancer Report. Geneva: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr27/en/>>.

PATHAK, S. et al. Spontaneous regression of cutaneous melanoma in sinclair swine is associated with defective telomerase activity and extensive telomere erosion. **International journal of oncology**, v. 17, n. 6, p. 1219-1243, 2000.

PATRICK, D. J. et al. Classification of canine urinary bladder urothelial tumours based on the World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification. **Journal of comparative pathology**, v. 135, n. 4, p. 190-199, 2006

PEREZ-GUIJARRO, E.; DAY, C. P.; MERLINO, G.; ZAIDI, M. R. Genetically engineered mouse models of melanoma. **Cancer**, v. 123, n. S11, p. 2089–2103, 2017.

POLLOCK, Callie B.; ROGATCHEVA, Margarita B.; SCHOOK, Lawrence B. Comparative genomics of xenobiotic metabolism: a porcine-human PXR gene comparison. **Mammalian Genome**, v. 18, n. 3, p. 210-219, 2007.

POMMIER, J. D. et al. Complications following intravesical bacillus Calmette-Guerin treatment for bladder cancer: a case series of 22 patients. **Infectious Diseases**, v. 47, n. 10, p. 725-731, 2015.

POS, Floris; REMEIJER, Peter. Adaptive management of bladder cancer radiotherapy. In: **Seminars in radiation oncology**. WB Saunders, 2010. p. 116-120.

PRASAD, Sandip M.; DECASTRO, G. Joel; STEINBERG, Gary D. Urothelial carcinoma of the bladder: definition, treatment and future efforts. **Nature Reviews Urology**, v. 8, n. 11, p. 631, 2011.

PRATHER, Randall S. Pig genomics for biomedicine. **Nature biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 122, 2013.

PROUT JR, George R. et al. Treated history of noninvasive grade 1 transitional cell carcinoma. **The Journal of urology**, v. 148, n. 5, p. 1413-1419, 1992.

REDELMAN-SIDI, Gil; GLICKMAN, Michael S.; BOCHNER, Bernard H. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer—a current perspective. **Nature Reviews Urology**, v. 11, n. 3, p. 153, 2014.

RENNER, Simone et al. Glucose intolerance and reduced proliferation of pancreatic β -cells in transgenic pigs with impaired glucose-dependent insulinotropic polypeptide function. **Diabetes**, v. 59, n. 5, p. 1228-1238, 2010.

RESNICK, Matthew J.; BASSETT, Jeffrey C.; CLARK, Peter E. Management of superficial and muscle-invasive urothelial cancers of the bladder. **Current opinion in oncology**, v. 25, n. 3, p. 281-288, 2013.

RIES, L. A. G. et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2004. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2007. 2007.

RIOU, O. et al. Radiothérapie des cancers de vessie. **Cancer/Radiothérapie**, v. 20, p. S196-S199, 2016

ROGERS, Christopher S. et al. Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. **Science**, v. 321, n. 5897, p. 1837-1841, 2008.

RUBIO- VIQUEIRA, B.; HIDALGO, M. Direct in vivo xenograft tumor model for predicting chemotherapeutic drug response in cancer patients. **Clinical pharmacology & therapeutics**, v. 85, n. 2, p. 217-221, 2009.

RUSSELL, William Moy Stratton; BURCH, Rex Leonard; HUME, Charles Westley. **The principles of humane experimental technique**. London: Methuen, 1959.

SANLI, Oner et al. Bladder cancer. **Nature reviews Disease primers**, v. 3, p. 17022, 2017.

SCHACHTSCHNEIDER, Kyle M. et al. Adult porcine genome-wide DNA methylation patterns support pigs as a biomedical model. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 743, 2015.

SCHACHTSCHNEIDER, Kyle M. et al. The oncopig cancer model: an innovative large animal translational oncology platform. **Frontiers in oncology**, v. 7, p. 190, 2017.

SCHOOK, Lawrence B. et al. DNA-based animal models of human disease: from genotype to phenotype. In: **Animal Genomics for Animal Health**. Karger Publishers, 2008. p. 15-25.

SCHOOK, Lawrence B. et al. Emerging technologies to create inducible and genetically defined porcine cancer models. **Frontiers in Genetics**, v. 7, p. 28, 2016.

SCHOOK, Lawrence B. et al. Unraveling the swine genome: implications for human health. **Annu. Rev. Anim. Biosci.**, v. 3, n. 1, p. 219-244, 2015.

SCHOOK, Lawrence B.; TUMBLESON, Mike E. (Ed.). **Advances in swine in biomedical research**. Springer Science & Business Media, 1997.

SEGATTO, Natalia V. et al. The oncopig cancer model as a complementary tool for phenotypic drug discovery. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 894, 2017.

SEOK, J. et al. Xu. W., Richards DR, McDonald-Smith GP, Gao H., Hennessy L., Finnerty CC, Lopez CM, Honari S., Moore EE, Minei JP, Cuschieri J., Bankey PE, Johnson JL, Sperry J., Nathens AB, Billiar TR, West MA, Jeschke MG, Klein MB, Gamelli RL, Gibran NS, Brownstein BH, Miller-Graziano C., Calvano SE, Mason PH, Cobb JP, Rahme LG, Lowry SF, Maier RV, Moldawer LL, Herndon DN, Davis RW, Xiao W., Tompkins RG Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 110, n. 9, p. 3507, 2013.

SHABSIGH, Ahmad et al. Defining early morbidity of radical cystectomy for patients with bladder cancer using a standardized reporting methodology. **European urology**, v. 55, n. 1, p. 164-176, 2009.

SIEGEL, Rebecca; NAISHADHAM, Deepa; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2013. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 63, n. 1, p. 11-30, 2013.

SOBIN, L. H.; GOSPODARIWICZ, M.; WITTEKIND, C. TNM: Classification of Malignant tumours. UICC International Union Against Cancer. **Wiley-Blackwell**, v. 1, n. 7, p. 208–211, 2009.

SOLOWAY, Mark S. Single and combination chemotherapy for primary murine bladder cancer. **Cancer**, v. 36, n. 2, p. 333-340, 1975.

SPURLOCK, Michael E.; GABLER, Nicholas K. The development of porcine models of obesity and the metabolic syndrome. **The Journal of nutrition**, v. 138, n. 2, p. 397-402, 2008.

STOKES, William S.; SCHECHTMAN, Leonard M.; HILL, Richard N. The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM): a review of the ICCVAM test method evaluation process and current international collaborations with the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 30, n. 2_suppl, p. 23-32, 2002.

SWINDLE, M. M. Swine as surgical models in biomedical research. In: **Proceedings of the 2009 ACVP/ASVCP Annual Meetings—Monterey, CA, USA**. 2009.

TESSMANN, Josiane Weber et al. Antitumor potential of 1-thiocarbamoyl-3, 5-diaryl-4, 5-dihydro-1H-pyrazoles in human bladder cancer cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 94, p. 37-46, 2017.

WILLIAMS, Robert. Discontinued drugs in 2012: oncology drugs. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 22, n. 12, p. 1627-1644, 2013.

WITHROW, Stephen J. et al. **Withrow and Macewen's Small Animal Clinical Oncology-E-Book**. Saunders, 2019

WITJES, J. Alfred et al. Updated 2016 EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer. **European urology**, v. 71, n. 3, p. 462-475, 2017.

WOLDU, Solomon L.; BAGRODIA, Aditya; LOTAN, Yair. Guideline of guidelines: non- muscle- invasive bladder cancer. **BJU international**, v. 119, n. 3, p. 371-380, 2017.

WU, Xue-Ru. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 9, p. 713, 2005.

VALLI, V. E. et al. Pathology of canine bladder and urethral cancer and correlation with tumour progression and survival. **Journal of comparative pathology**, v. 113, n. 2, p. 113-130, 1995

VANDAMME, Thierry F. Use of rodents as models of human diseases. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, v. 6, n. 1, p. 2, 2014.

VAN MARION, Denise MS et al. Studying cancer metastasis: existing models, challenges and future perspectives. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 97, p. 107-117, 2016.

VAN MOORSELAAR, R. J. A. et al. The rat bladder tumor model system RBT resembles phenotypically and cytogenetically human superficial transitional cell carcinoma. **Urological research**, v. 21, n. 6, p. 413-421, 1993.

VASCONCELOS-NÓBREGA, C. et al. BBN as an urothelial carcinogen. **In Vivo**, v. 26, n. 4, p. 727-739, 2012.

VLAANDEREN, Jelle et al. Tetrachloroethylene exposure and bladder cancer risk: a meta-analysis of dry-cleaning-worker studies. **Environmental health perspectives**, v. 122, n. 7, p. 661-666, 2014.

YAFI, Faysal A.; NORTH, Scott; KASSOUF, Wassim. First-and second-line therapy for metastatic urothelial carcinoma of the bladder. **Current Oncology**, v. 18, n. 1, p. e25, 2011.

YANG, Li; CARBONE, David P. Tumor-host immune interactions and dendritic cell dysfunction. **Advances in cancer research**, v. 92, p. 14-29, 2004.

ZARGAR, Homayoun et al. Multicenter assessment of neoadjuvant chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer. **European urology**, v. 67, n. 2, p. 241-249, 2015.

ZHANG, Shuo et al. Radiotherapy in muscle-invasive bladder cancer: the latest research progress and clinical application. **American journal of cancer research**, v. 5, n. 2, p. 854, 2015.

ZEEGERS, M. P. A.; TAN, F. E. S.; DORANT, E.; VAN DEN BRANDT, P. A. The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk. **Cancer**, v. 89, n. 3, p. 630–639, 2000.