



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

SILVIA HELENA DE SOUZA TIZZIANI

Nova Perspectiva Terapêutica para o Carcinoma urotelial de bexiga  
em Cães: Efeitos Toxicológicos e Clínicos da Imunoterapia com  
OncoTherad<sup>®</sup> (MRB-CFI-1)

CAMPINAS

2019

SILVIA HELENA DE SOUZA TIZZIANI

Nova Perspectiva Terapêutica para o Carcinoma urotelial de bexiga  
em Cães: Efeitos Toxicológicos e Clínicos da Imunoterapia com  
OncoTherad® (MRB-CFI-1)

A Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de Fisiopatologia Cirúrgica.

ORIENTADOR: PROF DR WAGNER JOSÉ FÁVARO

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DEFENDIDA PELA  
ALUNA SILVIA HELENA DE SOUZA TIZZIANI, E ORIENTADA PELO  
PROF. DR. WAGNER JOSÉ FÁVARO.

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências  
Médicas Maristella Soares dos  
Santos - CRB 8/8402

Tizziani, Silvia Helena de Souza, 1962-  
T546n

Nova perspectiva terapêutico para o carcinoma urotelial de bexiga em cães: efeitos toxicológicos e clínicos da imunoterapia com oncotherad (MRB-CFI-1) / Silvia Helena de Souza Tizziani. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Wagner José Fávaro.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neoplasias da bexiga urinária. 2. OncoTherad. 3. Imunoterapia. 4. Nanomedicina. I. Fávaro, Wagner José, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** New therapeutic perspective for bladder urothelial carcinoma in dogs : toxicological and clinical effects of oncotherad immunotherapy **Palavras-chave em inglês:**

Urinary bladder neoplasms

OncoTherad®

Immunotherapy

Nanomedicine

**Área de concentração:** Fisiopatologia Cirúrgica

**Titulação:** Mestra em Ciências **Banca**

**examinadora:**

Wagner José Fávaro [Orientador]

Alexandra Pinheiro Fantinatti

Raquel Franco Leal

**Data de defesa:** 27-08-2019

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências da Cirurgia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-8216-5532>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0284341555849523>

# **COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO**

**SILVIA HELENA DE SOUZA TIZZIANI**

---

**ORIENTADOR: PROF DR WAGNER JOSÉ FÁVARO**

---

## **MEMBROS:**

- 1. PROF. DR. WAGNER JOSÉ FÁVARO**
- 2. PROF. DRA. ALEXANDRA PINHEIRO FANTINATTI**
- 3. PROF. DR. RAQUEL FRANCO LEAL**
- 4. PROF. DR. RAQUEL FRANCO LEAL**

---

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

**Data de Defesa: 27/08/2019**

## **Dedicatória**

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus.

Dedico esse trabalho ao meu pai Armando Bento (in memorian), que sempre me apoiou e nunca perdeu a fé nos meus sonhos.

À minha mãe Malvina, por todo carinho e compreensão. Essa mulher guerreira sempre é a maior fonte de inspiração para mim.

Ao meu esposo Ronaldo e meu filho Renzo, que sempre foram companheiros e parceiros de todas as horas.

Ao Professor Dr. Wagner Fávaro, meu orientador, pela oportunidade, o apoio durante todo o processo de construção dessa monografia, pelo seu dinamismo e empenho na luta contra o câncer.

Ao Professor Dr. Nelson Duran, que teve papel fundamental na realização desse trabalho.

À Professora Dra Petra Böckelmann, pelo convívio, pelo apoio, pela compreensão e pela amizade.

Ao Professor Dr. Eduardo Socca pela orientação, apoio e confiança.

A todos os amigos que direta ou indiretamente participaram da minha formação, o meu eterno agradecimento.

A todos os tutores e seus cães que me fazem lutar a cada dia mais...

## RESUMO

O Carcinoma urotelial de bexiga (CUB) representa cerca de 2% de todas as malignidades relatadas em cães. Com mais de 70 milhões de cães nos EUA e o desenvolvimento de câncer em aproximadamente 25% de cães idosos, estima-se que mais de 20.000 cães são afetados por CUB. Contudo, as terapias para o CUB em cães são escassas e a sobrevida média é de apenas 130 dias. Nesse contexto, o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas que previnam a progressão da doença e permitam a qualidade de vida dos pacientes é de extrema relevância. Considerando a importância do desenvolvimento de fármacos que possam atuar como moduladores do sistema imune, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um composto sintético nanoestruturado com propriedades antitumorais e imunológicas, denominado MRB-CFI-1 (Modificador de Resposta Biológica – Complexo Fosfato Inorgânico 1), ou OncoTherad<sup>®</sup>. Assim, os objetivos deste estudo foram caracterizar e avaliar os efeitos antitumorais e os possíveis efeitos tóxicos da imunoterapia com OncoTherad<sup>®</sup> em 6 cães fêmeas com diagnóstico de CUB. Nossos resultados demonstraram que antes da primeira aplicação de OncoTherad<sup>®</sup>, todos os pacientes apresentaram massa tumoral irregular, com ecogenicidade mista e ecotextura hiperecogênica, com volume tumoral médio de 9,38 cm<sup>3</sup>. Após 6 aplicações de OncoTherad<sup>®</sup>, a massa tumoral reduziu 62,34% (3,06 cm<sup>3</sup>) do seu volume em relação ao ultrassom inicial. Ao final do tratamento, a massa tumoral reduziu 84,54% (1,37 cm<sup>3</sup>) do seu volume inicial. Após as três primeiras aplicações de OncoTherad<sup>®</sup>, 83,33% dos pacientes apresentaram doença estável e, 16,66% remissão parcial da doença. Após a 24<sup>a</sup> aplicação, final do tratamento, 100% dos pacientes apresentaram remissão parcial da doença. A taxa de sobrevida livre de recidiva/ progressão foi de 100% ao longo dos 402 dias de seguimento com OncoTherad<sup>®</sup>. Ainda, o tratamento com OncoTherad<sup>®</sup> não apresentou sinais de toxicidade sistêmica na dose terapêutica proposta. Considerando os dados em conjunto, pode-se concluir que a imunoterapia com OncoTherad<sup>®</sup> parece ser uma opção terapêutica segura e eficaz para o câncer de bexiga em cães, e pode fornecer benefícios na prevenção da recorrência do tumor.

**Palavras-chave:** Câncer de Bexiga, OncoTherad<sup>®</sup>, Imunoterapia, Nanomedicina.

## **ABSTRACT**

Bladder cancer (BC) comprehends around 2% of all spontaneously occurring cancers in dogs. With more than 70 million dogs in the US and the development of cancer in approximately 25% of older dogs, it is estimated that more than 20,000 dogs are affected by BC. However, BC therapies in dogs are scarce and the median survival is only 130 days. Our research group developed a synthetic nanostructured compound with antitumor and immunological properties, called MRB-CFI-1 (Biological Response Modifier - Inorganic Phosphate Complex 1), or OncoTherad<sup>®</sup>. We evaluated the antitumor and possible toxicological effects in 6 female dogs diagnosed with BC. Results demonstrated that all patients presented irregular tumor mass, mixed echogenicity, and hyperechoic echotexture, with a mean tumor volume of 9.38 cm<sup>3</sup>. After 6 instillations of OncoTherad<sup>®</sup>, the tumor mass reduced 62.34% of its volume. At the end of treatment, the tumor mass reduced 84.54% (1.37 cm<sup>3</sup>). After the first three applications, 83.33% of the patients presented stable disease and 16.66% partial remission. After the last 24th application, 100% of the patients presented partial remission. The relapse-free/ progression-free survival rate was 100% over the 402-day follow-up. Furthermore, treatment showed no signs of systemic toxicity at the proposed therapeutic dose. Thus, it could be concluded that OncoTherad<sup>®</sup> immunotherapy seems a safe and effective treatment option for spontaneous canine bladder cancer and may provide benefit for preventing tumor recurrence.

**Keywords:** Bladder Cancer, OncoTherad<sup>®</sup>, Immunotherapy, Nanomedicine.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1.** Ultrassonografias representativas da bexiga urinária dos Cães 1 e 2 nos seguintes tempos: antes da primeira aplicação (a, b), após a primeira aplicação (c, d) e após 3 (e, f), 6 (g, h), 18 (i, j) e 24 (k, l) aplicações do OncoTherad®.....**30**

**Figura 2.** Ultrassonografias representativas da bexiga urinária dos Cães 3 e 4 nos seguintes tempos: antes da primeira aplicação (a, b), após a primeira aplicação (c, d) e após 3 (e, f), 6 (g, h), 18 (i, j) e 24 (k, l) aplicações do OncoTherad®.....**31**

**Figura 3.** Ultrassonografias representativas da bexiga urinária dos Cães 5 e 6 nos seguintes tempos: antes da primeira aplicação (a, b), após a primeira aplicação (c, d) e após 3 (e, f), 6 (g, h), 18 (i, j) e 24 (k, l) aplicações do OncoTherad®.....**32**

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Comparação das hemácias na urina ao longo do esquema terapêutico (ANOVA para medidas repetidas com a variável resposta transformada em postos) ..... 27
- Tabela 2:** Comparação da alanina aminotransferase (ALT) ao longo do esquema terapêutico (ANOVA para medidas repetidas com a variável resposta transformada em postos)..... 28
- Tabela 3:** Comparação da uréia ao longo do esquema terapêutico (ANOVA para medidas repetidas com a variável resposta transformada em postos) ... ..... 28
- Tabela 4:** Comparação da creatinina ao longo do esquema terapêutico (ANOVA para medidas repetidas com a variável resposta transformada em postos) ... ..... 29
- Tabela 5:** Comparação da hemoglobina (Hb) ao longo do esquema terapêutico (ANOVA para medidas repetidas com a variável resposta transformada em postos). ..... 29
- Tabela 6:** Comparação dos leucócitos ao longo do esquema terapêutico (ANOVA para medidas repetidas com a variável resposta transformada em postos) ... ..... 29
- Tabela 7:** Comparação das plaquetas ao longo do esquema terapêutico (ANOVA para medidas repetidas com a variável resposta transformada em postos) ... ..... 30

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT: Alanina Aminotransferase  
BCG: *Bacillus Calmette-Guerin*  
CB: Câncer de Bexiga  
CBNMI: Câncer de Bexiga Não-Músculo Invasivo  
CUB: Carcinoma Urotelial de bexiga  
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais  
COX: Ciclooxygenase  
DAB: Diaminobenzidina  
DE: Doença Estável  
D.P.: Desvio Padrão  
EGFR: Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico  
GEE: Equações de Estimação Generalizadas  
Hb: Hemoglobina  
HE: Hematoxilina-Eosina  
ICAM: Moléculas de Adesão Intercelular  
IFN: Interferon  
ILs: Interleucinas  
MRB-CFI-1: Modificador de Resposta Biológica – Complexo Fosfato Inorgânico 1  
MAPKs: Proteínas Quinases ativadas por Mitógeno  
N: Número de Amostra  
NF-κB: Fator de Transcrição Nuclear κB  
PD: Progressão da Doença  
pTa: Tumor papilífero confinado no endotélio  
pTis: Carcinoma “*in situ*”  
pT1: Tumor papilífero que invade lâmina própria  
RC: Remissão Completa  
RP: Remissão Parcial  
STING: Fator Estimulante do Complexo Interferon  
SRD: Sem Raça Definida  
TLRs: Receptores *Toll-like*  
TNF-α: Fator de Necrose Tumoral  
TRAIL: Ligante Indutor de Apoptose relacionado ao TNF

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1. Carcinoma urotelial de bexiga (CUB) .....	12
1.2. Abordagens terapêuticas alternativas .....	15
1.3. Nova Perspectiva Terapêutica para o Câncer de Bexiga Urinária: OncoTherad® (Modificador de Resposta Biológica – Complexo Fosfato Inorgânico 1).....	18
<b>2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....	21
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	23
3.1. Seleção dos Pacientes e Procedimentos de Diagnóstico Tumoral .....	23
3.2. Tratamento com OncoTherad® (MRB-CFI-1) .....	24
3.3. Avaliação da Resposta Terapêutica com OncoTherad® (MRB-CFI-1) .....	24
3.4. Análises Toxicológicas e Bioquímicas .....	25
3.5. Análises Estatísticas .....	26
<b>4. RESULTADO</b> .....	27
4.1. Imunoterapia Intravesical com OncoTherad® foi Eficaz na Redução dos Tumores Vesicais, Promovendo Remissão Parcial em Todos Pacientes .....	27
4.2. Imunoterapia com OncoTherad® foi Eficaz na Redução da Hematúria.....	33
4.3. Imunoterapia com OncoTherad® Não Causou Toxicidade na Dose Terapêutica .....	33
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	36
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	40
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	41
<b>ANEXO 1</b> .....	46
<b>ANEXO 2</b> .....	47
<b>ANEXO 3</b> .....	48
Declaração de Consentimento .....	Erro! Indicador não definido.

## 1. Introdução

### 1.1. Carcinoma urotelial de bexiga (CUB)

A Sociedade Americana do Câncer estimou cerca de 81.190 novos casos de Carcinoma urotelial de bexiga (CUB) diagnosticados nos Estados Unidos em 2018 (62.380 homens e 18.810 mulheres) e cerca de 17.240 mortes (12.520 homens e 4.720 mulheres) (American Cancer Society, 2019). No Brasil, são estimados 6.690 novos casos de CUB em homens e 2.790 em mulheres para cada ano do biênio 2018-2019 (Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva (Inca) e Ministério Da Saúde (Ms), 2017). Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o CUB em homens ocupa a sexta posição na Região Sudeste (8,61/100 mil). Na Região Centro-Oeste (5,64/100 mil), é o sétimo mais frequente. Na Região Sul (9,23/100 mil), ocupa a nona posição e, nas demais Regiões, Nordeste (3,43/100 mil) e Norte (1,63/100 mil), ocupa a 11ª posição. Para as mulheres, é o 13º mais frequente nas Regiões Centro-Oeste (2,27/100 mil) e Norte (0,93/100 mil). Nas Regiões Sul (4,50/100 mil), Sudeste (3,02/100 mil) e Nordeste (1,70/100 mil), ocupa a 14ª posição (Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva (Inca) e Ministério Da Saúde (Ms), 2017).

Mais de 70% da incidência de CUB é superficial, confinada à camada interna da parede da bexiga urinária (pTis, pTa e pT1), tumor não-invasivo (câncer de bexiga não músculo invasivo - CBNMI) e, a ocorrência de uma doença invasiva é ocasional (Montironi e Lopez-Beltran, 2005; Alshaker e Matalka, 2011; Zhang et al., 2012). Contudo, 50% dos tumores não-músculo invasivos recorrem em 4 anos após o tratamento (ressecção transuretral e terapia intravesical) e 11% evoluem para o fenótipo invasivo (Alshaker e Matalka, 2011; Shimada et al., 2011; Zhang et al., 2012).

O câncer de bexiga urinária também afeta cães de estimação. De acordo com a Fundação Americana de Câncer Canino, o CUB representa cerca de 2% de todas as malignidades relatadas em cães. Com mais de 70 milhões de cães nos EUA e o desenvolvimento de câncer em aproximadamente 25% de cães idosos, estima-se que mais de 20.000 cães serão afetados por câncer de bexiga urinária anualmente. A maioria do CUB ocorre em cães mais velhos, variando de 9 a 11 anos de idade no momento do diagnóstico, embora a doença possa ocorrer muito mais cedo em uma minoria de cães (Knapp e Mcmillan, 2013; National Cancer Foundation Canine, 2015). Ainda, Henry (2003) descreve a maior incidência em fêmeas na faixa etária de 9 a 11 anos. Inúmeras hipóteses foram levantadas para tentar explicar tal fator. Neste contexto, Daleck et al. (2008) em seu trabalho demonstram tais hipóteses. Dentre

estas, destaca-se o comportamento de demarcação territorial dos machos, comportamento não observado em fêmeas. Com isso a bexiga urinária dos machos não se encontra constantemente repletas, ao contrário das fêmeas, que por não apresentarem este comportamento, apresentam a bexiga urinária repleta com frequência.

O CUB canino, também denominado Carcinoma de Células Transicionais (CCT), é frequentemente localizado na região do trígono da bexiga, área triangular delimitada pelos óstios dos ureteres (direito e esquerdo) e o óstio da uretra. Estas manifestações variam entre lesões proliferativas papilares de grau intermediário a alto, podendo levar à obstrução parcial ou completa das vias urinárias, além de progressão tumoral para os rins, linfonodos, pulmões, fígado e próstata (Knapp, Glickman, Denicola, et al., 2000; Patrick et al., 2006; Knapp e Mcmillan, 2013).

A causa deste tipo de câncer em cães depende de múltiplos fatores, como a exposição prolongada do urotélio aos agentes carcinogênicos presentes na urina. Os fatores ambientais comumente citados são os banhos prolongados, a castração, obesidade, produtos químicos utilizados em jardinagem e certos tipos particulares de raça (exemplos: *Terrier escocês*, *Pastor Shetland*, *Airedale Terrier*, *Beagles*, *Terrier branco de montanhas ocidentais* e *Terrier de Raposa Wirehaired*) são fatores de risco prováveis. Na maioria dos estudos, a predileção feminina tem sido encontrada como um fator preponderante (Glickman et al., 1989; Glickman et al., 2004; Raghavan et al., 2004; Bryan et al., 2007; Knapp e Mcmillan, 2013; Knapp et al., 2014). A relação fêmea/ macho de cães com CUB tem sido relatada na variação de 1,71:1 para 1,95:1, com o risco maior nos cães esterilizados ou castrados (Knapp, 2006; Bryan et al., 2007; Knapp e Mcmillan, 2013; Knapp et al., 2014).

Esses fatores podem provocar o CUB através de alterações em duas vias moleculares distintas. Câncer de bexiga de baixo grau, não invasivo, geralmente têm alterações na via de transdução de sinal da cinase da proteína Ras ativada por mitógeno, ao passo que os tumores invasivos têm desregulações nas vias das proteínas p53 e retinoblastoma (Gamblin et al., 1997; Mitra et al., 2006; Mitra et al., 2012).

O primeiro sinal clínico observado e, mais frequente, é a hematúria (presença de hemácias na urina). Inicialmente, há ausência de dor (disúria) e urgência (polaciúria) no ato de urinar. Porém, com o progresso da doença, esses fatores aparecem e se tornam constantes. Infecções do trato urinário são comuns em cães

com CUB e, às vezes, casos de osteopatia hipertrófica também são observados (Knapp e Mcmillan, 2013; Knapp et al., 2014).

Á partir destes sinais clínicos, o diagnóstico do CUB pode ser comprovado através de vários tipos de exames: exame físico completo que inclui exame retal (pode revelar espessamento da parede da uretra ou na região do trígono da bexiga, aumento dos linfonodos ilíacos, massa na bexiga ou espessamento difuso da bexiga), hemograma completo, perfil bioquímico sérico, análise e cultura de urina, radiografia do tórax e ultrassom abdominal (Knapp e Mcmillan, 2013). Além desses, o diagnóstico também pode ser feito pelo exame histológico de amostras teciduais (biópsias) coletadas através de cirurgia ou cistoscopia (Knapp e Mcmillan, 2013). No entanto, o uso de instrumentos e agulhas em procedimentos cirúrgicos e não-cirúrgicos, juntamente com a localização frequente do CUB na região do trígono da bexiga, aumenta o risco de propagação tumoral, não só nos ureteres e nos rins, mas também na parede abdominal, onde este tipo de câncer geralmente cresce de forma agressiva e pouco responsiva à terapia médica (Ramos-Vara et al., 2003; Higuchi et al., 2013; Knapp et al., 2014). A imunohistoquímica, realizada em biópsias, também é uma forma de diagnóstico de CUB, sendo a uroplaquina III (UP III) o marcador mais utilizado (Ramos-Vara et al., 2003).

Uma vez comprovado o CUB, o tratamento em cães pode incluir: cirurgia, radioterapia (desencorajada em alguns casos devido a complicações como cistite, incontinência urinária, colite e estenose do cólon), quimioterapia e outras drogas, ou a combinação desses (Anderson et al., 2002; Knapp e Mcmillan, 2013). A completa cistectomia (retirada completa da bexiga) não é normalmente realizada em cães. Isto ocorre, devido à presença frequente de tumores além da bexiga (uretra, próstata e outros órgãos), a morbidade do procedimento e as despesas envolvidas (Vilar et al., 2004; Knapp e Mcmillan, 2013).

Os tratamentos com agentes antineoplásicos incluem os agentes de platina (cisplatina e carboplatina), mitoxantrona, actinomicina D, doxorubicina e o bacilo Calmette-Guérin (BCG) (Daleck et al., 2008). No entanto estas terapias são acompanhadas de inúmeros efeitos adversos que variam de efeitos de baixa gravidade e desconforto a efeitos de alta gravidade, o que pode refletir em interrupção do protocolo terapêutico e consequentemente redução da eficácia terapêutica (Abrao et al., 2008; Ge et al., 2019; Iguchi et al., 2019; Young et al., 2019).

Outra abordagem terapêutica envolve a associação de agentes quimioterápicos à agentes inibidores de ciclooxigenases (COX) e combinações destes, são o pilar do tratamento do CUB primário e metastático em cães (Knapp e Mcmillan, 2013). As taxas de remissão são tipicamente inferiores a 20% com a terapia com um único agente, e 35-50% com tratamento quimioterápico combinado com inibidores de COX. Agentes de platina parecem ser os mais ativos no CUB canino, especialmente quando combinados com um inibidor de COX (Knapp et al., 2013; Knapp e Mcmillan, 2013), porém podem apresentar toxicidade gastrointestinal, renal e na medula óssea (Moore et al., 1990; Chun et al., 1996; Chun et al., 1997; Knapp, Glickman, Widmer, et al., 2000; Boria et al., 2005; Greene et al., 2007). O uso de vimblastina também foi avaliado em cães com CUB, apresentando uma taxa de remissão e taxa de doença estável de 36% e 50%, respectivamente (Arnold et al., 2011). De Brito Galvao et al. (2012) e Haggag et al. (2014) demonstram resultados positivos do tratamento com gencitabina associado a agentes de platina. Os autores demonstram a redução da proliferação celular, o aumento da apoptose e a interrupção do ciclo celular, além do aumento da sobrevida de pacientes tratados com este quimioterápico em associação com agentes de platina.

Outro componente importante no cuidado de cães com CUB inclui a colocação de *stents uretrais* para aliviar a obstrução urinária e tratar as infecções bacterianas secundárias cada vez mais resistentes (Childress et al., 2011; Blackburn et al., 2013; Smee et al., 2013).

Embora o CUB em cães não seja geralmente curável com as terapias atuais, a doença pode ser controlada em 75% dos casos, e esses podem desfrutar de vários meses a um ano (ou mais) de vida com boa qualidade após o diagnóstico. O fator mais consistente de prognóstico é o estadio do CUB, sendo o mais avançado associado com menor taxa de sobrevida. O tempo médio de sobrevida é de 130 a 195 dias após a monoterapia e, mais de 250 dias após tratamento combinado de drogas (Knapp e Mcmillan, 2013). Quando múltiplos tratamentos são administrados sequencialmente, a sobrevida pode se estender além de um ano.

## **1.2. Abordagens terapêuticas alternativas**

Devido aos riscos e efeitos colaterais dos tratamentos convencionais, outras opções terapêuticas estão sendo investigadas para o tratamento do CUB em cães. Dentre elas incluem-se as terapias citotóxicas, terapias com agentes de desmetilação

e em casos em que o paciente não responde às terapias convencionais, ou que não possam ser enquadrados nos protocolos terapêuticos convencionais, pode-se ainda submeter tal paciente à quimioterapia metronômica (Fulkerson e Knapp, 2015). A quimioterapia metronômica é a administração de doses baixas, e menos tóxicas, de quimioterápicos com o objetivo de atrasar ou impedir a progressão do câncer (Schrempp et al., 2013). Ao mesmo tempo, a terapia citotóxica dirigida e a terapia com agente de desmetilação vêm recebendo um enorme destaque, pois se espera oferecer maiores efeitos antitumorais com o mínimo risco de toxicidade, além de permitir um tratamento mais individualizado contra o câncer (Baylin e Jones, 2011; Dhawan et al., 2013).

Terapias com imunomoduladores também estão sendo investigadas como alternativas promissoras no tratamento do CUB em cães (Marconato et al., 2015). Compostos que modulam o sistema imunológico, através de receptores do tipo *Toll* (TLRs), podem ser uma estratégia valiosa para o tratamento do câncer, pois ativam diversas vias celulares envolvidas no recrutamento de células do sistema imune, estímulo/inibição da via proliferativa, apoptose e aumento da adesão celular. Desta forma, compostos agonistas de TLRs podem ser usados isoladamente ou em combinação com as terapias existentes (Laheru e Jaffee, 2005; Garay et al., 2007). Estes receptores desempenham papéis-chave na imunidade inata e sua ativação pode desencadear duas respostas diferentes nos tumores: estimulam o sistema imunológico a atacar as células tumorais e / ou eliminam a maquinaria inibitória do sistema imunológico (Akira e Takeda, 2004; Takeda e Akira, 2004; Pradere et al., 2014; Zhao et al., 2014).

A sinalização de TLRs induz a ativação de genes de citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-10, bem como a expressão de moléculas coestimulatórias em células dendríticas e macrófagos. Coletivamente, cada TLR recruta uma combinação específica de moléculas adaptadoras para ativar diferentes fatores de transcrição que darão origem à resposta apropriada e efetiva contra o patógeno estimulador (Akira e Takeda, 2004; Takeda e Akira, 2004; Pradere et al., 2014; Zhao et al., 2014; Satoh e Akira, 2016). A transdução de sinal de TLRs ocorre através de diferentes proteínas adaptadoras, que desencadeiam uma cascata de sinalização envolvendo o fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs), p38, proteína quinases c-jun e os fatores reguladores do interferon (IRF3, IRF5 e IRF7) (Akira e Takeda, 2004; Takeda e Akira, 2004; Satoh

e Akira, 2016). Muitos dos efeitos conhecidos da sinalização de TLR ocorrem por meio da translocação de NF- $\kappa$ B e subsequente produção de moléculas e moléculas inflamatórias para sobrevivência celular, como TNF- $\alpha$  e interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) (Akira e Takeda, 2004; Satoh e Akira, 2016). A função clássica dos TLRs é o recrutamento de leucócitos para tecidos infectados, com subsequente indução de respostas imunes adaptativas (Akira e Takeda, 2004; Satoh e Akira, 2016). Na superfície das células epiteliais induz a expressão de moléculas de adesão intercelular (ICAM), que desempenham um papel fundamental na implantação e adesão de leucócitos (Satoh e Akira, 2016).

A ativação de TLR4 em macrófagos resulta na produção de várias citocinas inflamatórias diferentes que interferem no crescimento do tumor. A sinalização de TLR4 induz a produção de interferon (IFN) que possui efeitos antitumorais pela indução de TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF), um potente indutor de morte de células tumorais (Luo et al., 2004). Shankaran et al. (2001) mostraram que a função supressora de tumor do sistema imune depende criticamente das ações do IFN- $\gamma$ , que, pelo menos em parte, são direcionadas para regular a imunogenicidade das células tumorais. O IFN- $\gamma$  estimula várias vias antiproliferativas e tumoricidas em macrófagos e em linhas de células tumorais, além de ter um impacto profundo no crescimento de tumores sólidos e metástases e aparentemente desempenha um papel precoce na proteção contra metástases (Li et al., 2007; Alshaker e Matalka, 2011; Tate et al., 2012).

O mecanismo de detecção imune inata de tumores imunogênicos que levam a respostas de células T adaptativas permanece indefinido, embora os interferons (IFNs) estejam implicados nesse processo (Woo et al., 2014). Woo et al. (2014) identificaram que a ativação espontânea de células T CD8<sup>+</sup> contra tumores era defeituosa em camundongos sem o fator estimulante do complexo interferon (STING), mas não em outras vias de sinalização inatas, sugerindo o envolvimento de uma via de detecção de DNA citosólica. *In vitro*, a produção de IFNs e a ativação de células dendríticas foram desencadeadas por DNA derivado de células tumorais, através do STING e IRF-3 (Woo et al., 2014). No microambiente tumoral *in vivo*, o DNA das células tumorais foi detectado nas células apresentadoras de antígenos do hospedeiro, as quais se correlacionaram com a ativação da via do STING e a produção dos IFNs (54). Assim, o trabalho de Woo et al. (2014) demonstraram que o

principal mecanismo para a detecção imune inata do câncer ocorre através da via do hospedeiro STING, com importantes implicações para a imunoterapia do câncer.

### **1.3. Nova Perspectiva Terapêutica para o Câncer de Bexiga Urinária: OncoTherad® (Modificador de Resposta Biológica – Complexo Fosfato Inorgânico 1)**

Considerando a importância do desenvolvimento de fármacos que possam ser administrados por via intravesical e que atuem como agonistas dos TLRs, a equipe de pesquisa do Laboratório NANOBIOSS (UNICAMP), liderada pelos Professores Nelson Durán e Wagner José Fávaro, desenvolveu um composto sintético com propriedades antitumorais e imunológicas, denominado Modificador de Resposta Biológica – Complexo Fosfato Inorgânico 1 (MRB-CFI-1), também conhecido como OncoTherad®. O OncoTherad® é um composto nanométrico de fosfato e sais metálicos associado a uma proteína glicosídica, com tamanho entre 420-530 nm, fórmula química:  $C_{14}NO_8Mg_2(PO_4)_2$  e que possui patente depositada na fase inicial nacional do PCT (**Número: BR 1020170127680**) pela agência de inovação INOVA – UNICAMP (Fávaro e Durán, 2017).

O OncoTherad® atua como um Modificador de Resposta Biológica, desencadeando a estimulação do sistema imune através da fosforilação de aminoácidos hidroxilados como serina, treonina e tirosina por compostos que apresentam sais de fosfato (Fávaro e Durán, 2017). Ainda, o OncoTherad® promove a ativação local do sistema imune no microambiente tumoral (Fávaro e Durán, 2017).

A literatura especializada tem revelado que a administração intratumoral de determinados compostos de fosfato ativam o sistema imune no microambiente tumoral, levando a uma importante regressão do processo carcinogênico (Shirota et al., 2012; Corrales et al., 2015). Shirota et al. (2012) demonstraram que a administração intratumoral de oligonucleotídeos CpG reduz a atividade imunossupressora de células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MDSC). Os mesmos autores verificaram que as MDSC monocíticas do microambiente tumoral expressaram TLR e responderam à estimulação de oligonucleotídeos CpG por intermédio da perda de sua capacidade de suprimir a função das células T, pela produção de citocinas Th1 e de sua diferenciação em macrófagos com capacidade tumoricida, contribuindo para a regressão tumoral. Similarmente, Corrales et al. (2015) demonstraram que a administração intratumoral de derivados dinucleotídeos cíclicos

sintéticos ativaram o fator estimulador do complexo de genes de interferon (STING), induzindo uma significativa regressão de tumores estabelecidos em camundongos, bem como promoveram uma substancial resposta imune sistêmica que foi capaz de eliminar/ reduzir as metástases à distância.

Para verificar se o nanofármaco OncoTherad<sup>®</sup> era capaz de deflagrar a resposta inflamatória local (ativação local do sistema imune), nosso grupo de pesquisa avaliou a administração intraperitoneal do nanofármaco em ratas Fischer 344. Após a aplicação de 3 doses, uma a cada 72 horas, as análises macroscópicas dos peritônios revelaram que os animais tratados com o OncoTherad<sup>®</sup> apresentaram sinais intensos de inflamação peritoneal, os quais foram caracterizados por rubor, aumento da vascularização e pontos hemorrágicos, além de pequenos aglomerados de cristais de fosfatos na cavidade abdominal. Assim, tais resultados revelaram que o composto OncoTherad<sup>®</sup> foi capaz de induzir a resposta inflamatória local, o que justifica sua avaliação como imunomodulador nos experimentos em animais com CBNMI induzidos quimicamente (Fávaro e Durán, 2017).

Após o experimento de indução da resposta inflamatória local em ratos saudáveis, nosso grupo de pesquisa avaliou o potencial antitumoral e imunomodulatório do OncoTherad<sup>®</sup> em ratas Fischer 334 induzidas quimicamente ao CBNMI, bem como avaliou a segurança do produto (Fávaro e Durán, 2017). Os resultados obtidos demonstraram que a toxicidade *in vitro* do nanocomposto OncoTherad<sup>®</sup> nas células de carcinoma de bexiga urinária grau II (linhagem celular 5637) foi baixa (viabilidade celular de 75%), indicando que o provável mecanismo de morte das células neoplásicas pelo OncoTherad<sup>®</sup> é dependente da ativação do sistema imune. Este estudo revelou que a imunoterapia com o nanofármaco OncoTherad<sup>®</sup>, na dose terapêutica de 20 mg/Kg, não causou efeitos colaterais, como hematúria macroscópica, hiperplasia urotelial e inflamação intensa na bexiga, ureteres e rins, bem como não mostrou sinais de inflamação e/ ou de toxicidade sistêmica no fígado, baço, estômago e pâncreas. Os tratamentos com 50 mg/Kg e 100 mg/Kg promoveram inflamação moderada e intensa, respectivamente, na bexiga, ureteres e rins. O tratamento com OncoTherad<sup>®</sup> não mostrou sinais de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade nas três doses testadas (20 mg/Kg, 50 mg/Kg e 100 mg/Kg), sendo que os níveis séricos de AST, ALT, Fosfatase Alcalina, Uréia e Creatinina estavam dentro dos limites de normalidade (Fávaro e Durán, 2017).

Em relação aos efeitos antitumorais e imunomodulatórios, nossos resultados demonstraram que roedores induzidos quimicamente ao CBNMI, quando tratados com OncoTherad<sup>®</sup> apresentaram significativa inibição da progressão tumoral em 70% – 80% dos casos. Ainda, nossos estudos demonstraram que a imunoterapia intravesical com OncoTherad<sup>®</sup> levou à ativação distinta do sistema imune inato mediada por TLRs 2 e 4, resultando no aumento da via de sinalização para interferon (TLR4, TRIF, IRF3, INF- $\gamma$ ), a qual está relacionada com a maior eficácia desse nanocomposto no tratamento do CBNMI em relação ao tratamento padrão com BCG (Fávaro e Durán, 2017; Fávaro, Iantas, Gonçalves, Dias, et al., 2019).

## 2. Justificativa e Objetivos

O câncer de bexiga em cães é normalmente muito agressivo e, anatomicamente possui duas características que dificultam o seu tratamento: i) localizam-se comumente no trígono impossibilitando a sua remoção total; e ii) provocam o chamado “*field effect*” em que as células tumorais espalham-se e revestem áreas extensas da parede da bexiga, mais uma vez impossibilitando a sua remoção total. Adicionalmente, os esquemas terapêuticos disponíveis promovem baixas taxas de remissão da doença, culminando com tempo de sobrevida em torno de 135 dias (Okajima et al., 1981; Patronek et al., 1997; Wu et al., 2006; Dietrich e Golka, 2012; Arantes-Rodrigues et al., 2013; Garcia et al., 2015; Fávaro, Iantas, Gonçalves, Dias, et al., 2019).

Em face do papel estratégico dos imunoterápicos e dos avanços da nanotecnologia para produção de novas moléculas com atividade farmacológica, destacam-se os compostos que atuam como agonistas dos TLRs, os quais representam candidatos promissores contra o câncer. Nesse contexto, destaca-se o uso do OncoTherad<sup>®</sup>, o qual tem sido proposto com resultados promissores no tratamento do CB (Fávaro e Durán, 2017). Com base nos estudos pré-clínicos e clínico-veterinários realizados nos últimos anos, a imunoterapia intravesical com OncoTherad<sup>®</sup> representa uma nova abordagem para combater lesões malignas de alto grau ainda na bexiga urinária, antes de se espalharem para tecidos e órgãos adjacentes. Experimentalmente, o OncoTherad<sup>®</sup> mostrou uma atividade antitumoral impressionante e uma clara superioridade sobre o BCG, em estudos comparativos de eficácia e segurança (Fávaro e Durán, 2017; Fávaro, Iantas, Gonçalves, Dias, et al., 2019).

Considerando uma abordagem poupadora da bexiga urinária, o OncoTherad<sup>®</sup> pode ser usado para tratar pacientes com CB refratários, recidivados e intolerantes aos tratamentos de primeira linha, eliminando lesões malignas antes que se espalhem para outros tecidos e órgãos. Notavelmente, os estudos pré-clínicos evidenciaram que o OncoTherad<sup>®</sup> também pode ser usado no tratamento das formas avançadas da doença, em associação com outras drogas, sem toxicidade adicional (Fávaro e Durán, 2017; Fávaro, Iantas, Gonçalves, Dias, et al., 2019).

Assim, os objetivos gerais deste estudo foram caracterizar e avaliar os efeitos antitumorais do nanofármaco OncoTherad<sup>®</sup> no tratamento do câncer de bexiga em cães, bem como verificar seus possíveis efeitos tóxicos.

Os objetivos gerais foram alcançados através dos seguintes objetivos específicos:

- a) Selecionar os pacientes com sintomas clínicos de câncer de bexiga;
- b) Comprovar o diagnóstico de câncer de bexiga nos pacientes selecionados através das análises ultrassonográficas e histopatológicas;
- c) Avaliar a resposta terapêutica com OncoTherad<sup>®</sup> através das análises ultrassonográficas do tumor e presença/ ausência de hematuria, bem como determinar a sobrevida livre de recidiva/ progressão;
- d) Avaliar os possíveis efeitos tóxicos sistêmicos da imunoterapia com OncoTherad<sup>®</sup> através dos exames bioquímicos de ALT (alanina aminotransferase), uréia, creatinina, eritrograma, leucograma e trombograma.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Seleção dos Pacientes e Procedimentos de Diagnóstico Tumoral

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNICAMP) com protocolo **número 4481-1/2017 (Anexo 1)**.

Neste trabalho, foram avaliados 6 cães, todos fêmeas, diagnosticados com carcinoma de células transicionais submetidos à imunoterapia com OncoTherad<sup>®</sup>. Os animais foram selecionados a partir da demanda de casos oncológicos oriundos da Clínica Veterinária “Dr. Ronaldo Tizziani” (Campinas, São Paulo, Brasil). O recrutamento de pacientes envolveu a análise clínica dos pacientes, através do preenchimento de uma Ficha Clínica (**Anexo 2**). Posteriormente os pacientes foram submetidos a biópsia vesical por cistoscopia, laparotomia, seguida por cirurgia de cistotomia.

A seguir, as amostras coletadas foram fixadas em Bouin por 12 horas. Após a fixação, os tecidos foram lavados em álcool etílico a 70%, com posterior desidratação em uma série crescente de álcoois. Posteriormente, os fragmentos foram diafanizados com xilol por 2 horas e inclusos em polímeros plásticos (Paraplast Plus, ST. Louis, MO, EUA). Em seguida, os materiais foram seccionados no micrótomo rotativo *Slee CUT5062 RM 2165* (Slee Mainz, Mainz, Alemanha) com espessura de 5 micrômetros, corados com Hematoxilina-Eosina (HE) e fotografados no fotomicroscópio *Leica DM2500* (Leica, Munich, Germany). O diagnóstico das lesões uroteliais foi realizado por um patologista sênior e classificado conforme o estadiamento proposto pelo consenso da Organização Mundial da Saúde & Unidade de Saúde Pública Veterinária/ Geneva (65).

Os **critérios de inclusão** dos pacientes foram:

- Paciente com diagnóstico de carcinoma urotelial associado exclusivamente à bexiga confirmado por ultrassonografia e histopatologia;
- Paciente com sinais clínicos do trato urinário inferior (hematúria, polaciúria, disúria, cistites recorrentes ou redicivantes) associados ao câncer de bexiga.

Os **critérios de exclusão** foram:

- Paciente sem diagnóstico de carcinoma urotelial;
- Paciente com obstrução uretral e/ ou ureteral parcial ou completa;
- Paciente com comorbidades que afetarão os objetivos do estudo ou sua própria segurança;

- Paciente com evidência de hidronefrose;
- Paciente prenha e/ ou amamentando;
- Paciente que já tenha sido submetido a outros tratamentos para câncer de bexiga.
- Após o preenchimento e assinatura do Termo de Consentimento Pós- Informado (**Anexo 3**) pelos tutores, foram selecionados os seguintes pacientes:
- Cão 1: raça Dachshund, gênero: fêmea, idade: 9 anos;
- Cão 2: raça Sem Raça Definida (SRD), gênero: fêmea; idade: 16 anos;
- Cão 3: raça Dachshund, gênero: fêmea, idade: 12 anos;
- Cão 4: raça Teckel, gênero: fêmea, idade: 11 anos;
- Cão 5: raça Lhasa Apso, gênero: fêmea, idade: 13 anos;
- Cão 6: raça Poodle, gênero: fêmea, idade: 16 anos.

### **3.2. Tratamento com OncoTherad® (MRB-CFI-1)**

Os pacientes foram submetidos ao tratamento intravesical e intramuscular com OncoTherad® (MRB-CFI-1):

- Intravesical (Sondagem ou cistocentese): uma aplicação semanal por seis semanas consecutivas (terapia de indução), na concentração de 44 mg/mL diluída em 2 mL de soro fisiológico (manter intravesical) por 40 minutos. Para a terapia de manutenção, os animais receberam uma dose quinzenal de OncoTherad® (44 mg/mL) por 6 meses e uma dose mensal por mais 6 meses, totalizando 24 aplicações intravesicais de OncoTherad® (Fávaro e Durán, 2017);

- Intramuscular: uma aplicação semanal por seis semanas consecutivas (terapia de indução), na concentração de 22 mg/mL. Para a terapia de manutenção, os animais receberam uma dose quinzenal de OncoTherad® (22 mg/mL) por 6 meses, e uma dose mensal por mais 6 meses, totalizando 24 aplicações intramusculares de OncoTherad® (Fávaro e Durán, 2017).

O tempo de tratamento/ seguimento foi de 402 dias.

### **3.3. Avaliação da Resposta Terapêutica com OncoTherad® (MRB-CFI-1)**

Os efeitos terapêuticos do OncoTherad® foram avaliados por ultrassonografia e urinálise (Urina I – presença de hemácias na urina) durante todo o ciclo de tratamento. As avaliações ultrassonográficas e urinárias foram realizadas nos

seguintes momentos: antes da primeira instilação, após a primeira instilação e após 3, 6, 18 e 24 instilações de OncoTherad®.

As ultrassonografias foram realizadas pelo mesmo médico radiologista, utilizando transdutores microconvexos (5,0 a 8,0 MHz) e lineares (10 a 12 MHz). Planos transversais e longitudinais foram utilizados para avaliar totalmente a bexiga. As avaliações ultrassonográficas da massa tumoral vesical incluíram: tamanho e forma, padrão de eco (homogêneo ou heterogêneo), localização (ápice, corpo, trígono ou todos os locais) e envolvimento da parede da bexiga. Massas vesicais com ecogenicidade uniforme ou ecogenicidade mista com áreas hiperecoicas e hipoecoicas foram registradas como “homogêneas” ou “heterogêneas”, respectivamente.

Os volumes tumorais foram calculados usando a fórmula de um elipsoide:  $V$  (Volume do tumor) =  $0,5235 \times (\text{diâmetro menor})^2 \times \text{diâmetro maior}$  (Fávaro e Durán, 2017).

O critério de avaliação de resposta ao tratamento foi classificado usando medidas ultrassonográficas de volume tumoral e presença de hemácias na urina da seguinte forma: remissão completa (RC, ausência completa de evidência tumoral), remissão parcial (RP, Redução  $\geq 50\%$  do volume tumoral e sem evidência de nova lesão tumoral), doença estável (DE,  $< 50\%$  de alteração no volume tumoral e sem novas lesões tumorais) e progressão da doença (PD, aumento de  $\geq 50\%$  no volume do tumor ou novas lesões tumorais) (Knapp et al., 2016).

### **3.4. Análises Toxicológicas e Bioquímicas**

As análises bioquímicas foram realizadas para verificar a possível toxicidade sistêmica da imunoterapia com OncoTherad®, a saber: alanina aminotransferase (ALT), marcador específico para lesão do parênquima hepático; eritrograma (hemoglobina); leucograma (leucócitos); trombograma (plaquetas); e creatinina e uréia para verificar a função renal. As determinações espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro *Pharmacia Biotech* com câmara de *cuvete* com temperatura controlada (UV/visível Ultrospec 5.000 com software de aplicações Swift II para controle de computador, 97-4213, Cambridge, Inglaterra, Reino Unido). Todos os reagentes químicos foram provenientes da empresa LaborLab (Guarulhos, São Paulo, Brasil). As análises bioquímicas foram realizadas nos seguintes momentos: antes da primeira instilação e após 6 e 24 instilações de OncoTherad®.

### 3.5. Análises Estatísticas

Foi realizada análise exploratória de dados através de medidas resumo (média, desvio padrão, mínimo, mediana e máximo). A relação do volume tumoral com as hemácias presentes na urina (hematúria) foi avaliada através de Equações de Estimção Generalizadas (GEE) com o volume transformado em postos. As comparações entre os tempos do esquema terapêutico com o volume tumoral e com os parâmetros bioquímicos (toxicologia clínica) foram avaliadas através de ANOVA para medidas repetidas com as variáveis respostas transformadas em postos. O nível de significância adotado foi de 5% (Conover e Iman, 1981; Montgomery, 2007; Draper, 2009; Tabachnick e Fidell, 2013; Brown e Prescott, 2014). O programa computacional utilizado foi: *The SAS System for Windows (Statistical Analysis System)*, versão 9.4. SAS Institute Inc, Cary, NC, USA.

## 4. Resultado

### 4.1. Imunoterapia Intravesical com OncoTherad® foi Eficaz na Redução dos Tumores Vesicais, Promovendo Remissão Parcial em Todos Pacientes

Antes da primeira aplicação de OncoTherad®, todos pacientes apresentaram massa tumoral irregular, com ecogenicidade mista e ecotextura hiperecogênica, com volume tumoral médio de  $9,38 \text{ cm}^3 \pm 4,43$  (**Figuras 1, 2, 3; Tabela 1**). Ao longo de todo o esquema terapêutico com OncoTherad® houve significativa redução do volume tumoral. Contudo, não houve diferença estatística significativa do volume tumoral após a primeira e a terceira aplicações de OncoTherad® (**Tabelas 1 e 2**).

Após 6 aplicações de OncoTherad®, a massa tumoral reduziu  $62,34\% \pm 16,38\%$  ( $3,06 \text{ cm}^3 \pm 1,46$ ) do seu volume em relação ao ultrassom inicial (**Figuras 1, 2 e 3; Tabelas 1 e 2**). Após 18 aplicações, a massa tumoral reduziu  $73,56\% \pm 13,77\%$  ( $2,09 \text{ cm}^3 \pm 0,89$ ) do seu volume inicial (**Figuras 1, 2 e 3; Tabelas 1 e 2**). Ao final de 24 instilações, a massa tumoral reduziu  $84,54\% \pm 5,23\%$  ( $1,37 \text{ cm}^3 \pm 0,78$ ) do seu volume (**Figuras 1, 2 e 3; Tabelas 1 e 2**).

Quanto ao critério de resposta ao tratamento, as análises referentes à redução do volume tumoral mostraram que 83,33% dos pacientes apresentaram doença estável e, 16,66% remissão parcial da doença após as três primeiras aplicações de OncoTherad® (**Tabela 3**). Após a 6ª aplicação de OncoTherad®, 66,66% dos pacientes apresentaram remissão parcial da doença, enquanto 33,33% apresentaram doença estável (**Tabela 3**).

Após a 18ª e 24ª aplicações, 100% dos pacientes apresentaram remissão parcial da doença, uma vez que houve redução maior que 50% do volume tumoral e sem evidência de novas lesões tumorais (**Tabela 3**).

A taxa de sobrevida livre de recidiva/ progressão foi de 100% ao longo dos 402 dias de seguimento.

**Tabela 1:** Comparação do volume tumoral (cm<sup>3</sup>) ao longo do esquema terapêutico (ANOVA para medidas repetidas com a variável resposta transformada em postos).

Variável	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
Volume tumoral_antes 1Aplic	6	9,38 <b>a</b>	4,43	4,07	9,00	14,93	<,0001
Volume tumoral_ após 1Aplic	6	6,59 <b>b</b>	2,05	3,75	6,55	9,12	
Volume tumoral_ após 3Aplic	6	5,68 <b>b</b>	2,20	3,51	5,56	9,15	
Volume tumoral_ após 6Aplic	6	3,06 <b>c</b>	1,46	1,60	2,67	5,77	
Volume tumoral_ após 18Aplic	6	2,09 <b>d</b>	0,89	1,17	1,91	3,79	
Volume tumoral_ após 24Aplic	6	1,37 <b>e</b>	0,78	0,63	1,21	2,83	

Diferentes letras minúsculas (a, b, c, d, e) indicam diferenças significativas ao longo do tratamento.

Aplic = aplicação. D.P. = desvio padrão.

**Tabela 2:** Comparação da porcentagem de redução do volume tumoral ao longo do esquema terapêutico (ANOVA para medidas repetidas com a variável resposta transformada em postos).

Variável	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
Redução tumoral_ após 1Aplic	6	22,84 <b>a</b>	20,15	3,03	15,36	52,84	<,0001
Redução tumoral_ após 3aplic	6	33,57 <b>a</b>	21,68	5,20	38,31	66,29	
Redução tumoral_ após 6Aplic	6	62,34 <b>b</b>	16,38	44,71	58,94	88,17	
Redução tumoral_ após 18Aplic	6	73,56 <b>c</b>	13,77	50,36	74,59	91,35	
Redução tumoral_ após 24Aplic	6	84,54 <b>d</b>	5,23	79,30	83,36	93,93	

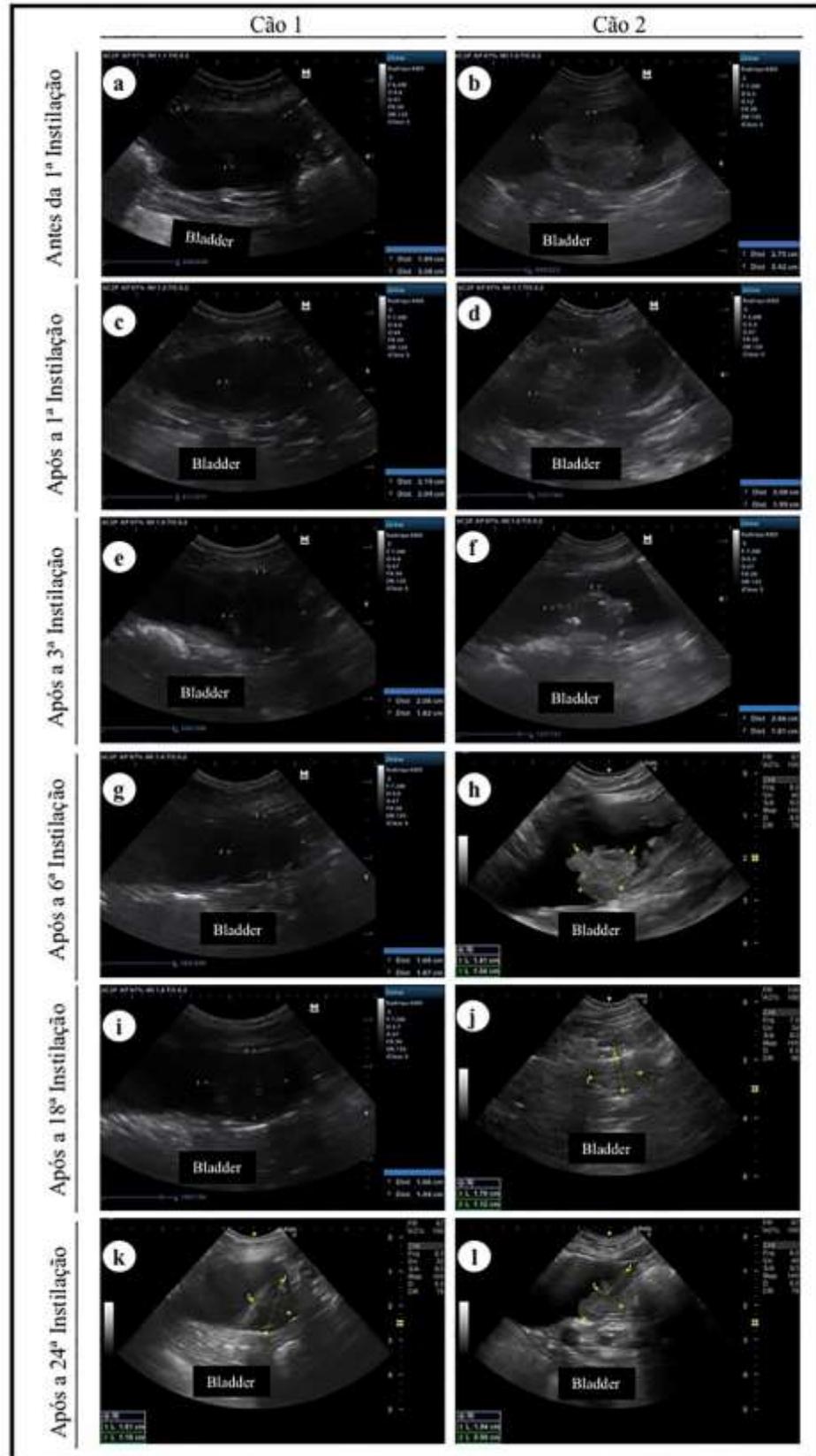
Diferentes letras minúsculas (a, b, c, d) indicam diferenças significativas ao longo do tratamento.

Aplic = aplicação. D.P. = desvio padrão.

**Tabela 3:** Resposta tumoral dos pacientes submetidos ao tratamento com OncoTheard ao longo do esquema terapêutico.

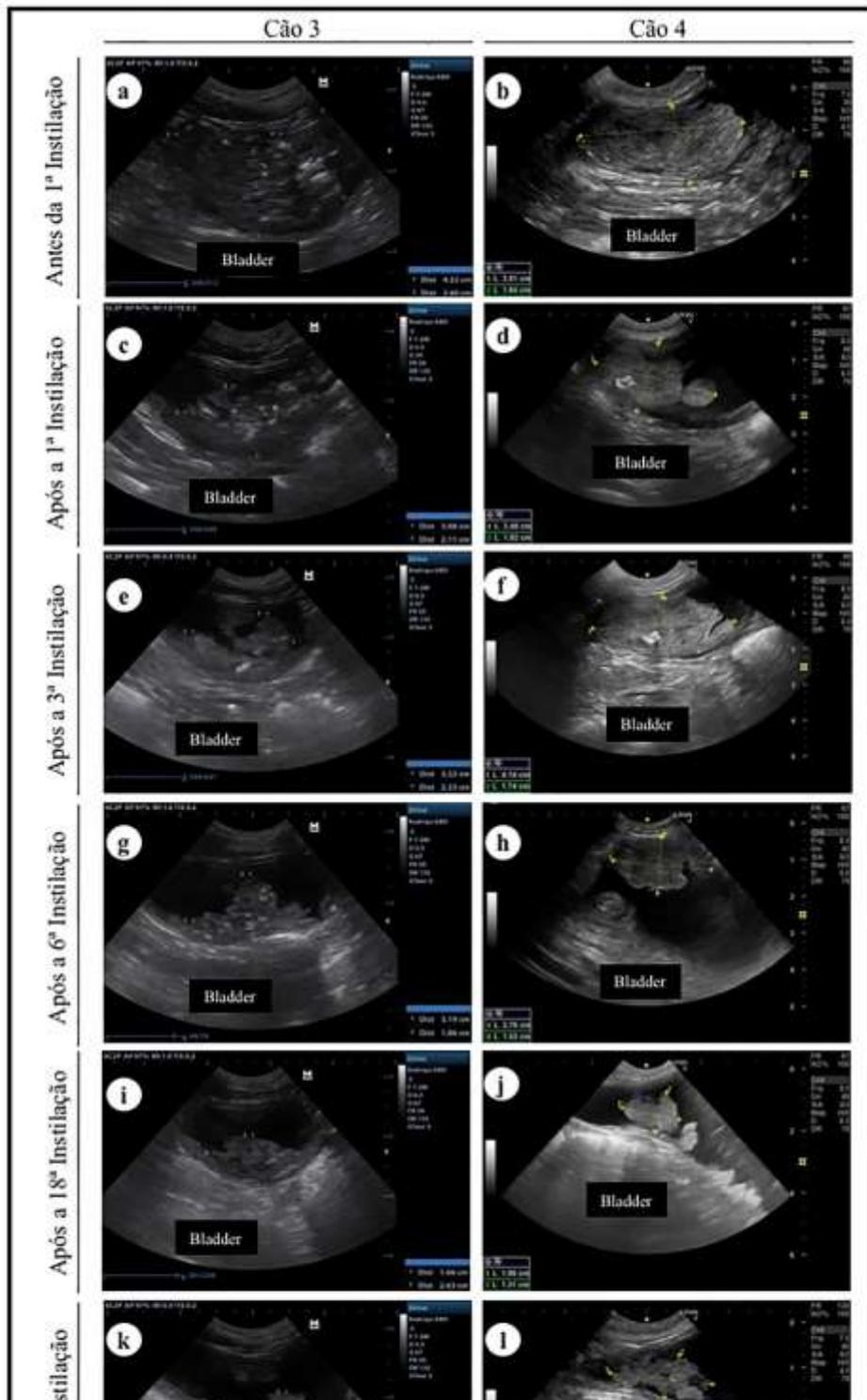
<b>Resposta Tumoral, número de pacientes (%)</b>				
<b>Esquema Terapêutico</b>	<b>Remissão Completa</b>	<b>Remissão Parcial</b>	<b>Doença Estável</b>	<b>Progressão da Doença</b>
<b>Após 1 Aplic</b>	0 (0,0%)	1 (16,66%)	5 (83,33%)	0 (0,0%)
<b>Após 3 Aplic</b>	0 (0,0%)	1 (16,66%)	5 (83,33%)	0 (0,0%)
<b>Após 6 Aplic</b>	0 (0,0%)	4 (66,66%)	2 (33,33%)	0 (0,0%)
<b>Após 18 Aplic</b>	0 (0,0%)	6 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
<b>Após 24 Aplic</b>	0 (0,0%)	6 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)

Aplic = aplicação.



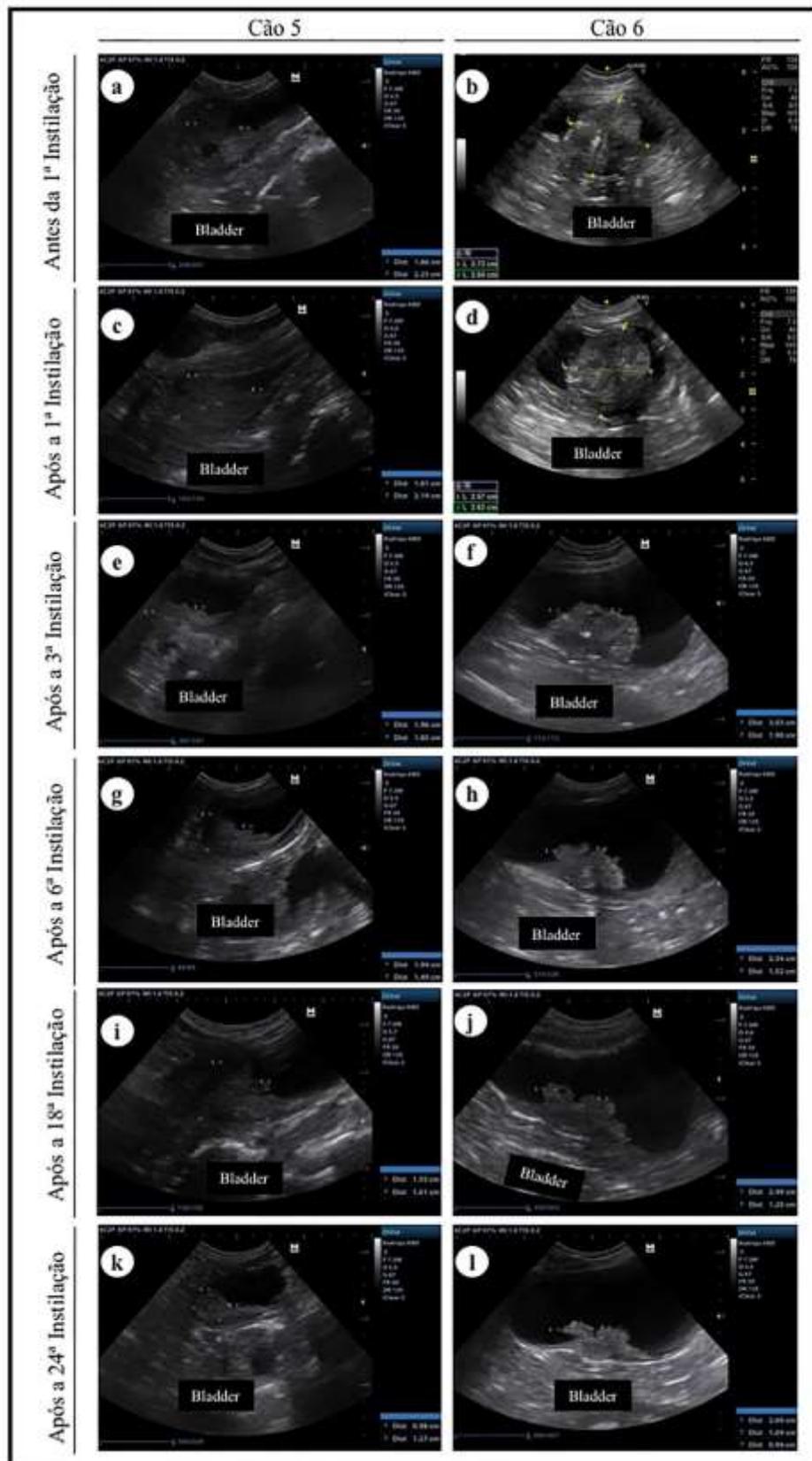
**Figura 1.** Ultrassonografias representativas da bexiga urinária dos Cães 1 e 2 nos seguintes tempos: antes da primeira aplicação (a, b), após a primeira aplicação (c, d) e após 3 (e, f), 6 (g, h), 18 (i, j) e 24 (k, l) aplicações do OncoTherad®.

**Figura 2.** Ultrassonografias representativas da bexiga urinária dos Cães 3 e 4 nos seguintes tempos: antes da primeira aplicação (a, b), após a primeira aplicação (c, d) e após 3 (e, f), 6 (g, h), 18 (i, j) e 24 (k, l) aplicações do OncoTherad®. **Figura 3.** Ultrassonografias representativas da bexiga urinária dos Cães 1 e 2 nos seguintes tempos: antes da primeira aplicação (a, b), após a primeira aplicação (c, d) e após 3 (e, f), 6 (g, h), 18 (i, j) e 24 (k, l) aplicações do OncoTherad®.



**Figura 4.** Ultrassonografias representativas da bexiga urinária dos Cães 3 e 4 nos seguintes tempos: antes da primeira aplicação (a, b), após a primeira aplicação (c, d) e após 3 (e, f), 6 (g, h), 18 (i, j) e 24 (k, l) aplicações do OncoTherad®.

**Figura 5.** Ultrassonografias representativas da bexiga urinária dos Cães 5 e 6 nos seguintes tempos: antes da primeira aplicação (a, b), após a primeira aplicação (c, d) e após 3 (e, f), 6 (g, h), 18 (i, j) e 24 (k, l) aplicações do OncoTherad®. **Figura 6.** Ultrassonografias representativas da bexiga urinária dos Cães 3 e 4 nos seguintes tempos: antes da primeira aplicação (a, b), após a primeira aplicação (c, d) e após 3 (e, f), 6 (g, h), 18 (i, j) e 24 (k, l) aplicações do OncoTherad®.



**Figura 7.** Ultrassonografias representativas da bexiga urinária dos Cães 5 e 6 nos seguintes tempos: antes da primeira aplicação (a, b), após a primeira aplicação (c, d) e após 3 (e, f), 6 (g, h), 18 (i, j) e 24 (k, l) aplicações do OncoTherad®.

#### 4.2. Imunoterapia com OncoTherad® foi Eficaz na Redução da Hematúria

A hematúria (presença de hemácias na urina) constitui um importante sinal clínico de recidiva/ progressão do câncer de bexiga. O tratamento com OncoTherad® promoveu significativa redução da hematúria, desaparecendo em média após a 18ª aplicação e, não retornando após a última aplicação (**Tabela 4**). A redução da hematúria relacionou-se diretamente com a remissão parcial do tumor observada após a 18ª e 24ª aplicações do OncoTherad® (**Tabela 3**).

**Tabela 4:** Comparação das hemácias na urina ao longo do esquema terapêutico (ANOVA para medidas repetidas com a variável resposta transformada em postos).

Variável	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
Hemácias_antes 1Aplic	6	277583,3 <b>a</b>	373197,9	1500,00	95000,00	960000,0	<b>0,0034</b>
Hemácias_após 1Aplic	6	80166,67 <b>b</b>	81290,63	1000,00	60000,00	200000,0	
Hemácias_após 3Aplic	6	43750,00 <b>b</b>	44451,94	2500,00	40500,00	98000,00	
Hemácias_após 6Aplic	6	15833,33 <b>c</b>	19054,31	500,00	9500,00	50000,00	
Hemácias_após 18Aplic	6	3866,67 <b>d</b>	4501,85	200,00	2000,00	12000,00	
Hemácias_após 24Aplic	6	1266,67 <b>d</b>	1072,69	200,00	1050,00	3000,00	

Diferentes letras minúsculas (a, b, c, d) indicam diferenças significativas ao longo do tratamento.

Aplic = aplicação. D.P. = desvio padrão.

Valor de Referência para Hemácias na Urina: até 6000 p/mL.

#### 4.3. Imunoterapia com OncoTherad® Não Causou Toxicidade na Dose Terapêutica

As análises séricas de ALT, uréia e creatinina não mostraram diferenças significativas antes do tratamento com OncoTherad®, bem como após as 24 instilações (**Tabelas 5, 6, 7**). Também, as análises de eritrograma, leucograma e trombograma em todos pacientes não mostraram diferenças significativas antes do tratamento com OncoTherad®, bem como após as 24 instilações (**Tabelas 8, 9, 10**). Portanto, esses resultados indicaram que o tratamento com OncoTherad® não apresentou sinais de toxicidade sistêmica na dose terapêutica proposta.

**Tabela 5:** Comparação da alanina aminotransferase (ALT) ao longo do esquema terapêutico (ANOVA para medidas repetidas com a variável resposta transformada em postos).

Variável	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
ALT_antes 1Aplic	6	79,67	57,08	33,00	58,00	188,00	<b>0,6472</b>
ALT_após 6Aplic	6	74,17	32,39	40,00	69,00	129,00	
ALT_após 24Aplic	6	61,17	18,99	41,00	58,00	84,00	

Aplic = aplicação. D.P. = desvio padrão.

Valor de Referência para ALT: 10 – 88 U/L.

**Tabela 6:** Comparação da uréia ao longo do esquema terapêutico (ANOVA para medidas repetidas com a variável resposta transformada em postos).

Variável	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
Uréia_antes 1Inst	6	36,50	9,81	25,00	35,00	54,00	<b>0,5549</b>
Uréia_após 6Inst	6	42,50	8,76	31,00	42,50	53,00	
Uréia_após 24Inst	6	42,50	12,96	22,00	46,00	56,00	

Aplic = aplicação. D.P. = desvio padrão.

Valor de Referência para Uréia: 15 – 65 mg/dL.

**Tabela 7:** Comparação da creatinina ao longo do esquema terapêutico (ANOVA para medidas repetidas com a variável resposta transformada em postos).

Variável	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
Creatinina_antes 1Aplic	6	1,01	0,23	0,62	1,13	1,20	<b>0,6472</b>
Creatinina_após 6Aplic	6	0,90	0,14	0,78	0,87	1,15	
Creatinina_após 24Aplic	6	0,87	0,13	0,66	0,91	1,00	

Aplic = aplicação. D.P. = desvio padrão.

Valor de Referência para Creatinina: 0,5 – 1,5 mg/dL.

**Tabela 8:** Comparação da hemoglobina (Hb) ao longo do esquema terapêutico (ANOVA para medidas repetidas com a variável resposta transformada em postos).

Variável	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
Hb_antes 1Aplic	6	12,25	1,24	10,60	12,30	14,20	<b>0,1317</b>
Hb_após 6Aplic	6	12,67	0,97	11,80	12,20	13,90	
Hb_após 24Aplic	6	13,18	1,24	12,00	12,80	14,70	

Aplic = aplicação. D.P. = desvio padrão.

Valor de Referência para Hemoglobina: 12 – 18 g/dL.

**Tabela 9:** Comparação dos leucócitos ao longo do esquema terapêutico (ANOVA para medidas repetidas com a variável resposta transformada em postos).

Variável	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
Leucócitos_antes 1Aplic	6	16866,67	9759,23	7900,00	13150,00	29900,00	<b>0,8686</b>
Leucócitos_após 6Aplic	6	12983,33	4656,79	8300,00	12950,00	18800,00	
Leucócitos_após 24Aplic	6	12166,67	3003,11	7900,00	12050,00	17000,00	

Aplic = aplicação. D.P. = desvio padrão.

Valor de Referência para Leucócitos: 6.000 – 18.000/mm<sup>3</sup>.

**Tabela 10:** Comparação das plaquetas ao longo do esquema terapêutico (ANOVA para medidas repetidas com a variável resposta transformada em postos).

Variável	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
Plaquetas_antes 1Aplic	6	476666,7	316190,9	260000,0	392500,0	1100000	<b>1,0000</b>
Plaquetas_após 6Aplic	6	432166,7	162005,5	334000,0	375000,0	759000,0	
Plaquetas_após 24Aplic	6	372500,0	47932,24	300000,0	387500,0	420000,0	

Aplic = aplicação. D.P. = desvio padrão.

Valor de Referência para Plaquetas: 150.000 – 500.000/mm<sup>3</sup>.

## 5. Discussão

O objetivo do tratamento do CUB em cães é erradicar o tumor quando possível. Contudo, isso geralmente não é possível (Valli et al., 1995; Knapp et al., 2014; Fulkerson et al., 2017). Portanto, o objetivo principal geralmente é controlar ou reduzir o tumor, e fornecer um longo período de qualidade de vida quanto possível.

Devido à localização trigonal, envolvimento uretral frequente do câncer e, em alguns casos, metástases, a ressecção cirúrgica completa do CUB comumente não é possível em cães (Valli et al., 1995; Knapp et al., 2014; Fulkerson et al., 2017). Além disso, muitos cães desenvolvem CUB multifocal, consistente com o “*field effect*” no qual se acredita que todo o revestimento da bexiga sofre uma alteração maligna em resposta a carcinógenos na urina (Knapp et al., 2014). Ainda, as opções farmacológicas de tratamento localizado geralmente são ineficazes (Knapp et al., 1994; Henry, 2003; Boria et al., 2005; Arnold et al., 2011; Mcmillan et al., 2011; Mcmillan et al., 2012). Quimioterápicos de agente único, incluindo cisplatina, carboplatina e vimblastina, têm proporcionado taxas de remissão baixas (16,0% e 36,0%, respectivamente) e os tempos medianos de sobrevida são menores que 6 meses (Knapp et al., 1994; Henry, 2003; Boria et al., 2005; Mcmillan et al., 2011; Mcmillan et al., 2012).

Medicamentos orais para o CUB em cães incluem tipicamente inibidores da COX e quimioterapia oral em baixas doses. Como agente único, o inibidor não seletivo de COX, o piroxicam (0,3 mg/Kg diariamente), pode proporcionar adequada qualidade de vida, e em uma série de 76 cães induziu remissão parcial (RP) em 18,4% dos pacientes, doença estável (DE) em 59,2% e doença progressiva (DP) em 19,7% dos cães (Knapp et al., 2014). A mediana da sobrevida livre de progressão e a média de sobrevida global foi de 120 e 176 dias, respectivamente, embora alguns cães tenham recebido outras terapias após a falha do piroxicam (Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva (Inca) e Ministério Da Saúde (Ms), 2017). Para efeito de comparação, a média de sobrevida global de 55 cães no Programa *Purdue Comparative Oncology Program Tumor Registry*, os quais não receberam qualquer terapia farmacológica, mas receberam apenas a cirurgia citorrredutora foi de 109 dias (Knapp et al., 2014).

O protocolo quimioterápico mais efetivo até o momento utiliza cisplatina e piroxicam, resultando em uma taxa de resposta geral de 71% (Nyland et al., 2002; Vignoli et al., 2007). Entretanto, o uso dessa associação leva a importante toxicidade

renal e, portanto, essa combinação não é usada de rotina na prática clínica (Nyland et al., 2002). Outros protocolos de quimioterapia relataram taxas de resposta de 0-58% (Valli et al., 1995; Nyland et al., 2002; Vignoli et al., 2007; Knapp et al., 2014; Fulkerson et al., 2017). Embora o uso de um fármaco antiinflamatório não-esteroidal (AINE) seletivo da ciclooxigenase-2 possa diminuir a nefrotoxicidade global associada à terapêutica de associação, a nefrotoxicidade da cisplatina não é diminuída e as taxas de resposta relatadas são semelhantes (Valli et al., 1995; Nyland et al., 2002; Vignoli et al., 2007; Knapp et al., 2014; Fulkerson et al., 2017).

Múltiplos agentes quimioterápicos intravenosos foram avaliados em cães com CUB. Em um estudo de 55 cães tratados com mitoxantrona ( $5 \text{ mg/m}^2 \times 5$  doses) e piroxicam, 35% deles tiveram RP com toxicidade mínima, e a sobrevida global média foi de 291 dias (Henry et al., 2003). Em um outro estudo fase II de 28 cães com CUB tratados com vimblastina, 36% deles cães tiveram RP, 50% DE, e a maioria dos cães falhou em outras terapias (Arnold et al., 2011). Em um estudo de seguimento, 51 cães com CUB foram randomizados para receber vimblastina (2 a  $2,5 \text{ mg/m}^2$ ) e piroxicam administrados concomitantemente ou apenas vimblastina seguido sequencialmente por piroxicam isolado no caso de falha apenas com vimblastina (Knapp et al., 2016). Para os cães que receberam vimblastina e piroxicam concomitantemente, as respostas tumorais incluíram 58% PR, 33% DE e 8 % DP. A resposta à vimblastina isoladamente incluiu 22% PR, 70% DE e 4% DP (Abbo et al., 2010).

A terapia intravesical é comumente usada em seres humanos com CBNMI, ou seja, tumores que não invadiram a camada muscular própria da bexiga. A terapia intravesical com mitomicina C foi investigada em cães com CUB confinado à bexiga, mas os graves efeitos tóxicos na medula óssea e trato gastrointestinal (da presumida absorção sistêmica da droga) limitam essa abordagem (Abbo et al., 2010). O tratamento com BCG intravesical, que é frequentemente usado em seres humanos, não foi estudado em ensaios clínicos formais em cães com CUB. As preocupações quanto ao seu uso incluem risco de absorção sistêmica e formação de granulomas, falta de evidência de sua eficácia em cães e disponibilidade limitada de medicamento (Abbo et al., 2010).

Considerando os dados da literatura acerca das opções terapêuticas para o CUB em cães, nosso trabalho é o único a utilizar imunoterapia para esse tipo de tumor. O OncoTherad<sup>®</sup> é um composto nanométrico que atua como um modificador de resposta biológica, promovendo a ativação local do sistema imunológico no

microambiente tumoral através da fosforilação de aminoácidos hidroxilados, como a serina, treonina e tirosina por compostos que têm sais de fosfato (Fávaro e Durán, 2017). Nossos resultados demonstraram que ao longo de todo o esquema terapêutico, 24 aplicações intravesicais e intramusculares, com OncoTherad<sup>®</sup> houve significativa redução do volume tumoral. No entanto, não houve diferença estatística significativa do volume tumoral após a primeira e a terceira aplicações de OncoTherad<sup>®</sup>. Em contrapartida, 83,33% dos pacientes apresentaram doença estável e, 16,66% remissão parcial da doença após as três primeiras aplicações de OncoTherad<sup>®</sup>.

Após 6 aplicações de OncoTherad<sup>®</sup>, a massa tumoral reduziu 62,34% do seu volume em relação ao ultrassom inicial e 66,66% dos pacientes apresentaram remissão parcial da doença, enquanto 33,33% apresentaram doença estável.

Após 18 e 24 aplicações, a massa tumoral reduziu 73,56% e 84,54%, respectivamente, sendo que 100% dos pacientes apresentaram remissão parcial ao final do tratamento.

Desta forma, tais resultados demonstraram claramente que a imunoterapia com OncoTherad<sup>®</sup> promoveu significativa resposta terapêutica, demonstrando taxa de sobrevida livre de recidiva/ progressão de 100% ao longo dos 402 dias de seguimento, o que o coloca em posição de superioridade em relação aos outros tratamentos preconizados para esse tipo de tumor.

Similarmente aos resultados verificados em cães com CUB, Fávaro, lantas, Gonçalves, Socca, et al. (2019) demonstrou os efeitos terapêuticos do OncoTherad<sup>®</sup> em um estudo monocêntrico fase I/ II em seres humanos, braço único em 15 pacientes (10 homens, 5 mulheres) com câncer de bexiga não-músculo invasivo de alto grau refratário e/ ou recidivante ( $\geq 1$  curso anterior de terapia intravesical com BCG). A mediana da idade e o seguimento foram 71 anos e 14,0 meses, respectivamente. A taxa de sobrevida livre de recidiva de 18 meses foi de 86,7%. Apenas 2 pacientes (13,3%) apresentaram recidiva durante o seguimento, porém esses pacientes apresentaram lesões malignas incipientes (*downstaging* de pT1G3 para pTaG1).

Além do seu papel na ativação dos TLRs, os importantes efeitos terapêuticos do OncoTherad<sup>®</sup> tanto em cães quanto em seres humanos podem estar relacionados ao mecanismo de modulação da via de sinalização RANK/RANKL/OPG, em referência aos seus componentes chave: o Receptor Ativador de NF- $\kappa$ B (RANK), uma proteína transmembranar, e seu ligante (RANKL). Além disso RANKL é regulada pelo seu receptor, a Osteoprotegerina (OPG), cuja ação é também regulada por diversos outros

fatores. Esta via de sinalização é essencial na homeostase óssea permitindo o crescimento e diferenciação de osteoclastos. Não obstante, esta via de sinalização é, também, atuante na modulação do sistema imunológico. Em experimentos com roedores e cães, Fávaro, Iantas, Gonçalves, Dias, et al. (2019) demonstraram que o OncoTherad<sup>®</sup> foi capaz de diminuir a expressão do sistema RANK/RANKL e, conseqüentemente impedir a formação de metástases e/ ou impedir a progressão das mesmas (Fávaro, Iantas, Gonçalves, Dias, et al., 2019).

Outro importante efeito do OncoTherad<sup>®</sup> foi a redução da hematúria ao longo do tratamento. A hematúria constitui um importante sinal clínico de recidiva/ progressão do câncer de bexiga. O tratamento com OncoTherad<sup>®</sup> promoveu significativa redução da hematúria, desaparecendo em média após a 18<sup>a</sup> aplicação e, não retornando ao final do tratamento. A redução da hematúria relacionou-se diretamente com a remissão parcial do tumor observada após a 18<sup>a</sup> e 24<sup>a</sup> aplicações do OncoTherad<sup>®</sup>.

Em relação as análises séricas de ALT, uréia e creatinina, a imunoterapia com OncoTherad<sup>®</sup> não causou toxicidades hepática e renal ao longo do tratamento. Ainda, as análises de eritrograma, leucograma e trombograma não mostraram diferenças significativas antes do tratamento com OncoTherad<sup>®</sup>, bem como após as 24 instilações. Portanto, esses resultados indicaram que o tratamento com OncoTherad<sup>®</sup> não apresentou sinais de toxicidade sistêmica na dose terapêutica proposta. Similarmente em seres humanos com CBNMI de alto grau, (Fávaro, Iantas, Gonçalves, Socca, et al. (2019)) relataram moderado evento adverso sistêmico de hipersensibilidade ao OncoTherad<sup>®</sup> em 2 pacientes (13,3%), e efeitos colaterais locais mínimos (disúria e cistite) em 6 pacientes (40,0%). Considerando os dados de toxicidade em conjunto, a imunoterapia com OncoTherad<sup>®</sup> se mostra segura aos pacientes tanto pela via intravesical quanto pela via intramuscular.

## 6. Conclusões

Considerando os dados em conjunto, é possível concluir que:

- a) A imunoterapia com OncoTherad<sup>®</sup> reduziu significativamente o volume tumoral e a hematúria ao longo de todo o tratamento, promovendo remissão parcial em 100% dos casos, o que o coloca em posição de superioridade em relação aos outros tratamentos para o câncer de bexiga;
- b) A imunoterapia com OncoTherad<sup>®</sup> demonstrou taxa de sobrevida livre de recidiva/ progressão de 100% ao longo dos 402 dias de seguimento, sendo tal taxa muito superior aos tratamentos isolados ou combinados com quimioterapia e antiinflamatórios não-esteroidais. Assim, admite-se o uso do OncoTherad<sup>®</sup> como monoterapia para o câncer de bexiga não-metastático;
- c) O tratamento com OncoTherad<sup>®</sup> se mostrou seguro aos pacientes tanto pela via intravesical quanto pela via intramuscular, uma vez que não apresentou sinais de toxicidade sistêmica na dose terapêutica proposta;
- d) A imunoterapia com OncoTherad<sup>®</sup> parece ser uma opção terapêutica segura e eficaz para o câncer de bexiga em cães, e pode fornecer benefícios na prevenção da recorrência do tumor.

## 7. Referências Bibliográficas

- 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. **J Vet Intern Med**, v. 24, n. 5, p. 1124-30.
- ABRAO, R. A. et al. Treatment for low-risk gestational trophoblastic disease: comparison of single-agent methotrexate, dactinomycin and combination regimens. **Gynecol Oncol**, v. 108, n. 1, p. 149-53.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 7, p. 499-511.
- ALSHAKER, H. A.; MATALKA, K. Z. IFN- $\gamma$ , IL-17 and TGF- $\beta$  involvement in shaping the tumor microenvironment: The significance of modulating such cytokines in treating malignant solid tumors. **Cancer cell international**, v. 11, p. 33-33.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Key Statistics for Bladder Cancer. 2019. Disponível em: < <https://www.cancer.org/content/cancer/en/cancer/bladder-cancer/about/key-statistics> >. Acesso em: June 12, 2018.
- ANDERSON, C. R. et al. Late complications of pelvic irradiation in 16 dogs. **Vet Radiol Ultrasound**, v. 43, n. 2, p. 187-92.
- ARANTES-RODRIGUES, R. et al. In vitro and in vivo experimental models as tools to investigate the efficacy of antineoplastic drugs on urinary bladder cancer. **Anticancer Res**, v. 33, n. 4, p. 1273-96.
- ARNOLD, E. J. et al. Clinical trial of vinblastine in dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. **J Vet Intern Med**, v. 25, n. 6, p. 1385-90.
- BAYLIN, S. B.; JONES, P. A. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 10, p. 726-34.
- BLACKBURN, A. L. et al. Evaluation of outcome following urethral stent placement for the treatment of obstructive carcinoma of the urethra in dogs: 42 cases (2004-2008). **J Am Vet Med Assoc**, v. 242, n. 1, p. 59-68.
- BORIA, P. A. et al. Carboplatin and piroxicam therapy in 31 dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. **Vet Comp Oncol**, v. 3, n. 2, p. 73-80.
- BROWN, H.; PRESCOTT, R. **Applied Mixed Models in Medicine, Third Edition**. 2014. 497-511 Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9781118778210.index> >.
- BRYAN, J. N. et al. A population study of neutering status as a risk factor for canine prostate cancer. **Prostate**, v. 67, n. 11, p. 1174-81.
- CHILDRESS, M. O. et al. Results of biopsy via transurethral cystoscopy and cystotomy for diagnosis of transitional cell carcinoma of the urinary bladder and urethra in dogs: 92 cases (2003-2008). **J Am Vet Med Assoc**, v. 239, n. 3, p. 350-6.
- CHUN, R. et al. Phase II clinical trial of carboplatin in canine transitional cell carcinoma of the urinary bladder. **J Vet Intern Med**, v. 11, n. 5, p. 279-83.
- CHUN, R. et al. Cisplatin treatment of transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs: 18 cases (1983-1993). **J Am Vet Med Assoc**, v. 209, n. 9, p. 1588-91.
- CONOVER, W.; IMAN, R. **[Rank Transformations as a Bridge Between Parametric and Nonparametric Statistics]: Rejoinder**. 1981. 124-129 Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00031305.1981.10479327> >.
- CORRALES, L. et al. Direct Activation of STING in the Tumor Microenvironment Leads to Potent and Systemic Tumor Regression and Immunity. **Cell Rep**, v. 11, n. 7, p. 1018-30.
- DALECK, C. R.; RODASKI, S.; DE NARDI, A. B. **Oncologia Em Cães E Gatos**. ROCA, 2008. ISBN 9788572417648. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=zX9IPgAACAAJ> >.

- DE BRITO GALVAO, J. F. et al. Effects of gemcitabine and gemcitabine in combination with carboplatin on five canine transitional cell carcinoma cell lines. **Am J Vet Res**, v. 73, n. 8, p. 1262-72.
- DHAWAN, D. et al. DNMT1: an emerging target in the treatment of invasive urinary bladder cancer. **Urol Oncol**, v. 31, n. 8, p. 1761-9.
- DIETRICH, H. G.; GOLKA, K. Bladder tumors and aromatic amines - historical milestones from Ludwig Rehn to Wilhelm Hueper. **Front Biosci (Elite Ed)**, v. 4, p. 279-88.
- DRAPER, N. R. Analysis of Messy Data Volume 1: Designed Experiments, Second Edition by George A. Milliken, Dallas E. Johnson. **International Statistical Review**, v. 77, n. 2, p. 321-322.
- FÁVARO, W. J.; DURÁN, N. **Process of obtaining a nanostructured complex (CFI-1), associated to nanostructured CFI-1 with a protein (MRB-CFI-1) and its use.** Brazil. Brazilian Patent PIBR 10.2017.012768.0. 2017.
- FÁVARO, W. J. et al. Role of OncoTherad immunotherapy in the regulation of toll-like receptors-mediated immune system and RANK/RANKL signaling: New therapeutic perspective for non-muscle invasive bladder cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 37, n. 15\_suppl, p. e16004-e16004.
- FÁVARO, W. J. et al. Single-arm phase I/II study of the safety and efficacy of OncoTherad immunomodulator in patients BCG-refractory or relapsed non-muscle invasive bladder cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 37, n. 15\_suppl, p. e16000-e16000.
- FULKERSON, C. M. et al. Naturally Occurring Canine Invasive Urinary Bladder Cancer: A Complementary Animal Model to Improve the Success Rate in Human Clinical Trials of New Cancer Drugs. **Int J Genomics**, v. 2017, p. 6589529.
- FULKERSON, C. M.; KNAPP, D. W. Management of transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs: a review. **Vet J**, v. 205, n. 2, p. 217-25.
- GAMBLIN, R. M.; SAGARTZ, J. E.; COUTO, C. G. Overexpression of p53 tumor suppressor protein in spontaneously arising neoplasms of dogs. **Am J Vet Res**, v. 58, n. 8, p. 857-63.
- GARAY, R. P. et al. Cancer relapse under chemotherapy: Why TLR2/4 receptor agonists can help. **European Journal of Pharmacology**, v. 563, n. 1, p. 1-17.
- GARCIA, P. V. et al. Alterations in ubiquitin ligase Siah-2 and its corepressor N-CoR after P-MAPA immunotherapy and anti-androgen therapy: new therapeutic opportunities for non-muscle invasive bladder cancer. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 5, p. 4427-43.
- GE, Y. et al. GMDTC Chelating Agent Attenuates Cisplatin-Induced Systemic Toxicity without Affecting Antitumor Efficacy. **Chem Res Toxicol**.
- GLICKMAN, L. T. et al. Herbicide exposure and the risk of transitional cell carcinoma of the urinary bladder in Scottish Terriers. **J Am Vet Med Assoc**, v. 224, n. 8, p. 1290-7.
- GLICKMAN, L. T. et al. Epidemiologic study of insecticide exposures, obesity, and risk of bladder cancer in household dogs. **J Toxicol Environ Health**, v. 28, n. 4, p. 407-14.
- GREENE, S. N. et al. Evaluation of cisplatin administered with piroxicam in dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. **J Am Vet Med Assoc**, v. 231, n. 7, p. 1056-60.
- HAGGAG, R. et al. Low-dose versus standard-dose gemcitabine infusion and cisplatin for patients with advanced bladder cancer: a randomized phase II trial-an update. **Med Oncol**, v. 31, n. 1, p. 811.
- HENRY, C. J. Management of transitional cell carcinoma. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 33, n. 3, p. 597-613.
- HENRY, C. J. et al. Clinical evaluation of mitoxantrone and piroxicam in a canine model of human invasive urinary bladder carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 9, n. 2, p. 906-11.
- HIGUCHI, T. et al. Characterization and treatment of transitional cell carcinoma of the abdominal wall in dogs: 24 cases (1985-2010). **J Am Vet Med Assoc**, v. 242, n. 4, p. 499-506.

- IGUCHI, N. et al. Doxorubicin induces detrusor smooth muscle impairments through myosin dysregulation, leading to a risk of lower urinary tract dysfunction. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 317, n. 1, p. F197-F206.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA); MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). ESTIMATIVA I 2018. Incidência de Câncer no Brasil., 2017. Disponível em: < <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf> >. Acesso em: June 14, 2018.
- KNAPP, D. W. **Animal models: Naturally occurring canine urinary bladder cancer**. 2006. 171-175.
- KNAPP, D. W. et al. Naturally-occurring canine transitional cell carcinoma of the urinary bladder A relevant model of human invasive bladder cancer. **Urol Oncol**, v. 5, n. 2, p. 47-59.
- KNAPP, D. W. et al. Cisplatin versus cisplatin combined with piroxicam in a canine model of human invasive urinary bladder cancer. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 46, n. 3, p. 221-6.
- KNAPP, D. W. et al. Randomized trial of cisplatin versus firocoxib versus cisplatin/firocoxib in dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. **J Vet Intern Med**, v. 27, n. 1, p. 126-33.
- KNAPP, D. W.; MCMILLAN, S. K. 29 - Tumors of the Urinary System. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M., et al (Ed.). **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology (Fifth Edition)**. Saint Louis: W.B. Saunders, 2013. p.572-582. ISBN 978-1-4377-2362-5.
- KNAPP, D. W. et al. Urinary bladder cancer in dogs, a naturally occurring model for cancer biology and drug development. **ILAR J**, v. 55, n. 1, p. 100-18.
- KNAPP, D. W. et al. Piroxicam therapy in 34 dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. **J Vet Intern Med**, v. 8, n. 4, p. 273-8.
- KNAPP, D. W. et al. A Nonselective Cyclooxygenase Inhibitor Enhances the Activity of Vinblastine in a Naturally-Occurring Canine Model of Invasive Urothelial Carcinoma. **Bladder Cancer**, v. 2, n. 2, p. 241-250.
- LAHERU, D.; JAFFEE, E. M. Immunotherapy for pancreatic cancer - science driving clinical progress. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 6, p. 459-67.
- LI, Z. et al. Cross-talk between T cells and innate immune cells is crucial for IFN-gamma-dependent tumor rejection. **J Immunol**, v. 179, n. 3, p. 1568-76.
- LUO, J. L. et al. Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation- induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression. **Cancer Cell**, v. 6, n. 3, p. 297-305.
- MARCONATO, L.; BURACCO, P.; ARESU, L. Perspectives on the design of clinical trials for targeted therapies and immunotherapy in veterinary oncology. **Vet J**, v. 205, n. 2, p. 238-43.
- MCMILLAN, S. K. et al. Antitumor effects of deracoxib treatment in 26 dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. **J Am Vet Med Assoc**, v. 239, n. 8, p. 1084-9.
- MCMILLAN, S. K. et al. Outcome of urethral stent placement for management of urethral obstruction secondary to transitional cell carcinoma in dogs: 19 cases (2007-2010). **J Am Vet Med Assoc**, v. 241, n. 12, p. 1627-32.
- MITRA, A. P.; DATAR, R. H.; COTE, R. J. Molecular Pathways in Invasive Bladder Cancer: New Insights Into Mechanisms, Progression, and Target Identification. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 35, p. 5552-5564.
- MITRA, A. P.; HANSEL, D. E.; COTE, R. J. Prognostic value of cell-cycle regulation biomarkers in bladder cancer. **Semin Oncol**, v. 39, n. 5, p. 524-33.
- MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments, 6th Edition Set**. John Wiley & Sons, Limited, 2007. ISBN 9780470225622. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=x--3PAAACAAJ> >.

- MONTIRONI, R.; LOPEZ-BELTRAN, A. The 2004 WHO classification of bladder tumors: a summary and commentary. **Int J Surg Pathol**, v. 13, n. 2, p. 143-53.
- MOORE, A. S. et al. Cisplatin (cisdiamminedichloroplatinum) for treatment of transitional cell carcinoma of the urinary bladder or urethra. A retrospective study of 15 dogs. **J Vet Intern Med**, v. 4, n. 3, p. 148-52.
- NATIONAL CANCER FOUNDATION CANINE. Urinary Bladder Cancer. 2015. Disponível em: < <http://wearethecure.org/learn-more-about-canine-cancer/canine-cancer-library/urinary-bladder-cancer> >. Acesso em: July 15, 2019.
- NYLAND, T. G.; WALLACK, S. T.; WISNER, E. R. Needle-tract implantation following us-guided fine-needle aspiration biopsy of transitional cell carcinoma of the bladder, urethra, and prostate. **Vet Radiol Ultrasound**, v. 43, n. 1, p. 50-3.
- OKAJIMA, E. et al. Urinary bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine in dogs. **Cancer Res**, v. 41, n. 5, p. 1958-66.
- 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. **J Comp Pathol**, v. 135, n. 4, p. 190-9.
- PATRONEK, G. J.; WATERS, D. J.; GLICKMAN, L. T. Comparative longevity of pet dogs and humans: implications for gerontology research. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 52, n. 3, p. B171-8.
- PRADERE, J. P.; DAPITO, D. H.; SCHWABE, R. F. The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer. **Oncogene**, v. 33, n. 27, p. 3485-95.
- RAGHAVAN, M. et al. Topical flea and tick pesticides and the risk of transitional cell carcinoma of the urinary bladder in Scottish Terriers. **J Am Vet Med Assoc**, v. 225, n. 3, p. 389-94.
- RAMOS-VARA, J. A. et al. Immunohistochemical detection of uroplakin III, cytokeratin 7, and cytokeratin 20 in canine urothelial tumors. **Vet Pathol**, v. 40, n. 1, p. 55-62.
- SATOH, T.; AKIRA, S. Toll-Like Receptor Signaling and Its Inducible Proteins. **Microbiol Spectr**, v. 4, n. 6.
- SCHREMPP, D. R. et al. Metronomic administration of chlorambucil for treatment of dogs with urinary bladder transitional cell carcinoma. **J Am Vet Med Assoc**, v. 242, n. 11, p. 1534-8.
- SHANKARAN, V. et al. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. **Nature**, v. 410, n. 6832, p. 1107-11.
- SHIMADA, K. et al. ROS generation via NOX4 and its utility in the cytological diagnosis of urothelial carcinoma of the urinary bladder. **BMC Urol**, v. 11, p. 22.
- SHIROTA, Y.; SHIROTA, H.; KLINMAN, D. M. Intratumoral injection of CpG oligonucleotides induces the differentiation and reduces the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells. **J Immunol**, v. 188, n. 4, p. 1592-9.
- SMEE, N.; LOYD, K.; GRAUER, G. F. UTIs in small animal patients: part 2: diagnosis, treatment, and complications. **J Am Anim Hosp Assoc**, v. 49, n. 2, p. 83-94.
- TABACHNICK, B. G.; FIDELL, L. S. **Using multivariate statistics**. Boston: Pearson Education, 2013. ISBN 9780205849574 0205849571 9780205890811 0205890814.
- TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. **Semin Immunol**, v. 16, n. 1, p. 3-9.
- TATE, D. J., JR. et al. Interferon-gamma-induced nitric oxide inhibits the proliferation of murine renal cell carcinoma cells. **Int J Biol Sci**, v. 8, n. 8, p. 1109-20.
- VALLI, V. E. et al. Pathology of canine bladder and urethral cancer and correlation with tumour progression and survival. **J Comp Pathol**, v. 113, n. 2, p. 113-30.
- VIGNOLI, M. et al. Needle tract implantation after fine needle aspiration biopsy (FNAB) of transitional cell carcinoma of the urinary bladder and adenocarcinoma of the lung. **Schweiz Arch Tierheilkd**, v. 149, n. 7, p. 314-8.

- VILAR, F. O.; DE ARAUJO, L. A.; LIMA, S. V. Total bladder replacement with de-epithelialized ileum. Experimental study in dogs. **Int Braz J Urol**, v. 30, n. 3, p. 237-44.
- WOO, S. R. et al. STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors. **Immunity**, v. 41, n. 5, p. 830-42.
- WU, X.-R. et al. Animal models of bladder cancer. In: LERNER, S. P.;SCHOENBERG, M., *et al* (Ed.). **Textbook of Bladder Cancer**: Taylor & Francis, 2006. cap. 14, p.157–169. ISBN 9781841843827.
- YOUNG, F. P.; ENDE, D.; EPSTEIN, R. J. Beyond BCG: the approaching era of personalised bladder-sparing therapies for non-muscle-invasive urothelial cancers. **Future Oncol**, v. 15, n. 4, p. 409-420.
- ZHANG, Y. et al. Changing patterns of bladder cancer in the USA: evidence of heterogeneous disease. **BJU Int**, v. 109, n. 1, p. 52-6.
- ZHAO, S. et al. Toll-like receptors and prostate cancer. **Front Immunol**, v. 5, p. 352.

## 8. Anexos

## ANEXO 1



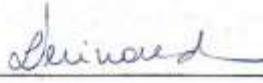
## CERTIFICADO

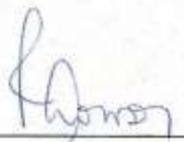
Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação Clínica do Câncer de Bexiga Urinária em Cães frente à Imunoterapia com MRB-CFI-1**, registrada com o nº **4481-1/2017**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Wagner José Fávoro e Petra Karla Böckelmann**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em **24 de fevereiro de 2017**.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/03/2017-30/06/2019
Vigência da autorização para manipulação animal:	01/03/2017-30/06/2019
Espécie / linhagem/ raça:	cães (raça: indiferente)
No. de animais:	10
Peso / Idade:	indiferente
Sexo:	05 fêmeas/05 machos
Origem:	proprietários de cães com CB: não há eutanásia.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBIO** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 24 de fevereiro de 2017.

  
 \_\_\_\_\_  
 Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud  
 Presidente

  
 \_\_\_\_\_  
 Fátima Alonso  
 Secretária Executiva

**IMPORTANTE:** Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

**ANEXO 2**  
**FICHA CLÍNICA**

**Data da Avaliação Inicial:** \_\_\_\_\_

**Nome do Proprietário:** \_\_\_\_\_

**Nome do Cão:** \_\_\_\_\_ **Raça:** \_\_\_\_\_

**Sexo:** ( ) Macho ( ) Fêmea **Idade:** \_\_\_\_\_ **Peso:** \_\_\_\_\_

**Vacinação:** \_\_\_\_\_

**Castração ou não:** \_\_\_\_\_ **Dieta:** \_\_\_\_\_

**Fezes:** \_\_\_\_\_ **Urina:** \_\_\_\_\_

**Padrão Comportamental:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Histórico Médico:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Tipo de Queixa:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Tempo de Queixa:** \_\_\_\_\_

**Dados de Imagem Ultrassom - Localização do Tumor:** \_\_\_\_\_

**Tamanho do Tumor:** \_\_\_\_\_

**Invasão Clínica Adjacente:** ( ) Não ( ) Sim **Qual local:** \_\_\_\_\_

**Dados Biópsia/Citopatologia:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Histórico:** ( ) Primeiro Tumor ( ) Recidiva **Se sim, quanto tempo:** \_\_\_\_\_

**Nos casos de recidiva, qual tratamento efetuado antes:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## ANEXO 3

### TERMO DE CONSENTIMENTO

**Título do projeto:** Avaliação Clínica do Câncer de Bexiga Urinária em Cães frente ao tratamento com o Modificador de Resposta Biológica-Complexo Fosfato Inorgânico 1 (MRB-CFI-1)

**Nome do pesquisador principal:** Silvia Helena de Souza Tizziani/Petra Karla Böckelmann

**Nome do orientador/pesquisador responsável:** Prof. Dr. Wagner José Fávaro

**Razão Social e Ciaeap instituição da Ceua que aprovou:**

**Objetivos do estudo:** Os objetivos gerais do presente estudo serão: avaliar clinicamente a possível regressão do câncer de bexiga urinária em cães, frente ao tratamento com o Modificador de Resposta Biológica-Complexo Fosfato Inorgânico 1 (MRB-CFI-1), tão bem como melhorar e desenvolver ferramentas para o diagnóstico e seguimento de pacientes com câncer de bexiga urinária, não só caninos, mas também seres humanos. Tais objetivos gerais serão alcançados através dos seguintes objetivos específicos: seleção de cães com diagnóstico comprovado de câncer de bexiga urinária; tratamento dos cães selecionados com o MRB-CFI-1 e, averiguações terapêuticas durante todo o período de tratamento, através de exames de ultrassom, sangue e urina.

**Procedimentos a serem realizados com os animais:** Permitindo que o seu cão participe deste estudo e receba o tratamento com o Modificador de Resposta Biológica-Complexo Fosfato Inorgânico 1 (MRB-CFI-1), você está sendo convidado a autorizar o estudo do material proveniente de biópsia e/ou citológico, análises de imagem e exames de sangue e urina. Estes procedimentos serão realizados para comprovação de diagnóstico tumoral e para averiguação terapêutica no tratamento do câncer de bexiga urinária com MRB-CFI-1, e apenas será aproveitado o material decorrente disto. O tratamento com o MRB-CFI-1 ocorrerá da seguinte forma: o cão receberá uma dose semanal de MRB-CFI-1, na dose de 12,5mg, instilado diretamente na bexiga urinária, por seis semanas consecutivas. Em seguida, receberá doses de manutenção como descrito a seguir: primeiramente, uma dose de MRB-CFI-1 a cada 15 dias até completar seis meses do início do tratamento (manutenção I) e, posteriormente, uma dose de MRB-CFI-1 a cada 30 dias até completar 12 meses do início do tratamento (manutenção II).

**Potenciais riscos para os animais:** O Modificador de Resposta Biológica-Complexo Fosfato Inorgânico 1 (MRB-CFI-1) deve ser evitado em pacientes veterinários durante a gestação e lactação, uma vez que não existem trabalhos avaliando completamente a sua segurança nesta situação. Também deve ser evitado ou utilizado com cautela em pacientes veterinários com história de hipersensibilidade aos componentes da fórmula, principalmente Fósforo, Amônio ou Magnésio. Os efeitos adversos relatados são: elevação de transaminases hepáticas (leve e transitória), em casos isolados; alterações das provas de função renal, em casos isolados (Observação: O risco de ocorrerem efeitos adversos pode aumentar na presença de disfunção renal e hepática).

**Cronograma:** Primeiramente, será realizada uma coleta de dados do seu cão, bem como exames prévios para o diagnóstico tumoral. Esses exames serão: análise de ultrassom para a detecção, tamanho e posição do tumor, biópsia e/ou citológico. Após a comprovação de câncer de bexiga urinária, se dará o início do tratamento do seu cão com MRB-CFI-1. O tratamento completo durará 12

meses. Durante o tratamento serão realizados exames de: ultrassom, sangue e urina para averiguar a possível regressão tumoral frente ao tratamento com o MRB-CFI-1.

**Benefícios:** É esperado que a medicação Modificador de Resposta Biológica-Complexo Fosfato Inorgânico 1 (MRB-CFI-1) possa eventualmente trazer os seguintes benefícios: melhora sintomática, aumento na capacidade imunológica e melhora na qualidade de vida. Além disso, ao permitir que o seu cão participe desta pesquisa, você estará contribuindo cientificamente para melhorar e desenvolver ferramentas para o diagnóstico e seguimento de pacientes com câncer de bexiga urinária, não só caninos, mas também seres humanos.

**Esclarecimentos ao proprietário sobre a participação do animal neste projeto:**

Sua autorização para a inclusão do seu animal neste estudo é voluntária. Seu(s) animal (is) poderá(ão) ser retirado(s) do estudo, a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo a ele(s).

A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada.

Os membros da Ceua ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações e, nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares.

O Médico Veterinário responsável pelo(s) seu(s) animal (is) será a Dra. Silvia Helena de Souza Tizziani, inscrita no CRMV sob o no 21.662. Além dele, a equipe do Pesquisador Principal (Silvia Helena de Souza Tizziani), também se responsabilizará pelo bem-estar do(s) seu(s) animal (is) durante todo o estudo e ao final dele. Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com o Pesquisador Principal ou com a sua equipe pelos contatos:

**Tel. de emergência:** (19) 32891679; (19) 996158153 (Dra. Silvia Helena de Souza Tizziani)

**Equipe:** Laboratório de Carcinogênese Urogenital e Imunoterapia e Clínica Veterinária Dr. Ronaldo Tizziani

**Endereço:** Laboratório de Carcinogênese Urogenital e Imunoterapia : Av. Bertrand Russel, s/no (Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Barão Geraldo - Campinas, SP - Brasil – CEP: 13083-865 **Telefone:** (19) 35216308

Clínica Veterinária Dr. Ronaldo Tizziani: R. José Orídes Cordeiro, 74 - Barão Geraldo, Campinas – SP - Brasil – CEP: 13084-786 **Telefone:** (19) 3289-1679

## ANEXO 4

### Declaração de Consentimento

Fui devidamente esclarecido (a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal (is) pelo(s) qual (is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal (is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal (is), identificado(s) a seguir, neste projeto.

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e a outra com o pesquisador.

Campinas, / /

Assinatura do Responsável

Assinatura do Pesquisador

Assinatura do Pesquisador Responsável

**Responsável:**

Nome:

Documento de Identidade:

**Identificação do(s) animal (is):**

Nome:

Número de/identificação:

Espécie:

Raça: