

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Centro de Desenvolvimento Tecnológico**  
**Curso de Graduação em Biotecnologia**



**Trabalho de Conclusão de Curso**

**Câncer de Bexiga: ensaios *in vitro* e a busca de novos modelos biológicos**

**Natália Vieira Segatto**

**Pelotas, 2017**

**Natália Vieira Segatto**

**Câncer de Bexiga: ensaios *in vitro* e a busca de novos modelo biológicos**

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

Orientador: Tiago Veiras Collares  
Orientadora de estágio: Mariana Souza Sonego

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

S454c Segatto, Natália Vieira

Câncer de bexiga: ensaios in vitro e a busca de novos modelos biológicos / Natália Vieira Segatto ; Tiago Veiras Collares, Mariana Souza Sonego, orientadores ; Fabiana Seixas, coorientador. — Pelotas, 2017.

70 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Suíno. 2. Oncopig. 3. Neoplasias de bexiga. 4. Pdd. 5. Ocm. I. Collares, Tiago Veiras, orient. II. Sonego, Mariana Souza, orient. III. Seixas, Fabiana, coorient. IV. Título.

CDD : 636.089699462

**Natália Vieira Segatto**

**Câncer de Bexiga: ensaios *in vitro* e a busca de novos modelos biológicos**

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

Data da Defesa: 20/12/17

Banca examinadora:

.....

Prof. Dr. Tiago Veiras Collares

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

.....

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Kömmling Seixas

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

.....

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Priscila Marques de Leon

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

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

*“Educação é uma descoberta progressiva de nossa própria  
ignorância.”*

Voltaire

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente a minha mãe, Mônica, e meu pai, Carlos Auri, por serem sempre um exemplo de caráter e dedicação e por não terem medido esforços para que eu chegasse até aqui. A minha irmã, Giulia, por todo o incentivo, amor, conselhos e por ter segurado as pontas nos momentos em que precisei de ajuda.

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

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

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

Aos demais colegas e funcionários e colegas da Biotecnologia pela boa convivência e aprendizado.

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

Aos amigos, obrigada pela amizade, pelo companheirismo e por tornar essa caminhada mais divertida e cheia de boas histórias.

Aos colegas de graduação, por dividirem este momento ímpar.

**Muito obrigada!**

## Resumo

SEGATTO, Natália Vieira. **Câncer de Bexiga: ensaios *in vitro* e a busca de novos modelos biológicos**. 2017. 70f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O câncer de bexiga é o nono tumor mais comum no mundo, e merece destaque pelo fato de representar o tratamento neoplásico de maior custo econômico para a saúde pública. Dentre as abordagens terapêuticas comumente utilizadas para tratar este tipo de neoplasia, estão a ressecção transuretral (RT) do tumor da bexiga, terapia intravesical com *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), quimioterapia adjuvante e neoadjuvante, cistectomia parcial ou radical e radioterapia. A abordagem a ser utilizada é escolhida de acordo com as características do tumor de cada paciente. Embora sejam eficientes, elas ainda são pouco seletivas e por isso apresentam uma ampla gama de efeitos adversos. Assim, o desenvolvimento de novos compostos economicamente viáveis com potencial ação antitumoral constitui um desafio da terapêutica para neoplasias de bexiga. Os modelos animais são um passo essencial no processo de desenvolvimento de drogas. Plataformas suínas já demonstraram ser mais preditivas de respostas a terapias em humanos do que modelos murinos, devido a similaridades entre suínos e humanos em relação à sua anatomia, metabolismo, fisiologia e genética. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo realizar uma revisão de literatura visando contribuir com a caracterização e aceitação científica do modelo suíno transgênico denominado Oncopig como modelo biológico adequado para o estudo do câncer. Para tal, foram abordados os temas “câncer de bexiga” e “importância de modelos biológicos” separadamente, dando ênfase a suínos como modelos biológicos. Por fim, foi discutido o potencial do uso e relevância da plataforma *Oncopig* como modelo biológico para carcinomas de bexiga. A partir das informações coletadas durante a pesquisa, obteve-se como principal resultado a publicação de uma revisão relatando o potencial do modelo Oncopig cancer model na descoberta fenotípica de drogas.

Palavras-chave: suíno; oncopig; neoplasias de bexiga; PDD; OCM



## Abstract

SEGATTO, Natália Vieira. **Bladder Cancer: *in vitro* tests and the search for new biological models.** 2017. 70p. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Bladder cancer is the ninth most common tumor in the world, and it is worth mentioning because it represents the neoplastic treatment with the greatest economic cost to public health. Among the therapeutic approaches commonly used to treat this type of neoplasia are transurethral resection (RT) of the bladder tumor, intravesical therapy with Bacillus Calmette-Guérin (BCG), adjuvant and neoadjuvant chemotherapy, partial or radical cystectomy and radiotherapy. The approach to be used is chosen according to each patient tumor characteristics. Although effective, they are still poorly selective and therefore have a wide range of adverse effects. Thus, the development of novel economically viable compounds with potential antitumor action is a challenge of therapy for bladder neoplasms. Animal models are an essential step in the drug development process. Swine platforms have already been shown to be more predictive of responses to therapies in humans than murine models, due to similarities between pigs and humans in relation to their anatomy, metabolism, physiology, and genetics. In this context, the present work aimed to carry out a literature review aiming to contribute to the characterization and scientific acceptance of the transgenic swine model called Oncopig as a suitable biological model for the study of cancer. To this end, the themes "bladder cancer" and "importance of biological models" were addressed separately, with emphasis on pigs as biological models. Finally, the potential of the use and relevance of the Oncopig platform as a biological model for bladder carcinomas was discussed. Based on the information collected during the research, the main result was the publication of a review on the Oncopig cancer model potential in phenotypic drug discovery (PDD).

Keywords: swine; oncopig; bladder neoplasia; PDD; OCM

## Lista de Figuras

Figura 1	Tipos e estágios do câncer de bexiga. Adaptado de SANLI et al. (2017).....	23
Figura 2	Desenvolvimento do Oncopig usando o sistema induzível Cre-LoxP. Adaptado de SCHOOK et al. (2016).....	32

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Exemplos de terapias disponíveis comercialmente para o tratamento de neoplasias de bexiga. Fonte: Nacional Cancer Institute, 2017.....	25
Tabela 2	Linhagens celulares comerciais de câncer de bexiga e seus respectivos tipos tumorais.....	26

## Lista de abreviaturas e siglas

- ACS – American Cancer Society (Sociedade Americana de Câncer)
- AdCRE – Adenovirus codificando a proteína cre recombinase
- APC - *Adenomatous polyposis coli*
- ATCC - American Type Culture Collection
- AZT – Azidotimidina
- BCG - *Bacillus Calmette-Guérin*
- BRCA1 - Breast Cancer type 1 (Câncer de mama tipo 1)
- CBMI - Carcinoma de bexiga musculo invasivo
- CBNMI – Carcinoma de bexiga não musculo invasivo
- CCT – Carcinoma de células transicionais
- CHC – Carcinoma hepatocelular
- CRE – Proteína Cre Recombinase
- CYP - *Cytochrome P450* (Citocromo P450)
- CYP3A - *Cytochrome P450 3A* (Citocromo P450 3A)
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- FDA – Food and drug administration
- FOSL1 - Fos-related antigen 1
- HAP - Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
- IARC - International Agency for Research on Cancer (Agencia Internacional para Pesquisa em Câncer)
- INCA – Instituto Nacional do Câncer
- KRAS - *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*
- mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro
- NCBI - *National Center for Biotechnology Information*
- NCI – *Nacional Cancer Institute* (Instituto nacional do câncer)
- OCM – *Oncopig Cancer Model*
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- P53 - *Protein p53*
- rAAV – *Recombinant Adeno-Associated Virus* (adenovírus associado recombinante)
- RNA – *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)
- RT – Ressecção transuretral

SCNT – *Somatic cell nuclear transfer* (transferência nuclear de células somáticas)

STM – Sarcoma de tecido mole

SV40LT – *Simian Vacuolating Virus 40 large T antigen*

TERT - *Telomerase Reverse Transcriptase* (Transcriptase reversa de telomerase)

TP53 - *Tumor protein p53*

UICC - União Internacional Contra o Câncer

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

## Sumário

1 Introdução .....	16
2 Objetivos .....	18
2.1 Objetivo geral .....	18
2.2 Objetivos específicos .....	18
3 Métodos.....	19
4 Revisão bibliográfica .....	20
4.1 Câncer de bexiga .....	20
4.1.1 Fatores de risco.....	21
4.1.2 Estadiamento e Histologia.....	22
4.1.3 Terapias contra neoplasias de bexiga.....	23
4.2 Importância de modelos biológicos .....	27
4.2.1 Roedores como modelos biológicos.....	29
4.2.2 Suínos como modelo biológico.....	30
4.2.2.1 Suínos transgênicos como modelo biológico .....	32
4.2.2.1.1 <i>Oncopig Cancer Model</i> .....	32
4.2.2.1.2 Outras plataformas suínas geneticamente definidas de câncer .....	35
4.3 Potencial da plataforma <i>Oncopig Cancer Model</i> para carcinomas de bexiga .....	36
5 Considerações finais .....	38
Referências .....	39
Anexo .....	51

## 1 Introdução

As características do câncer, postuladas por Hanahan e Weinberg (2000), indicam que a transformação de células normais em células cancerosas malignas é um processo de múltiplas etapas que reflete alterações genéticas que afetam seis processos fisiológicos. Estes processos incluem sinalização de crescimento auto-suficiente, insensibilidade aos sinais de inibição do crescimento, evasão da morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada e invasão e metástase de tecido (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Atualmente, o câncer é o nome geral dado a um conjunto de mais de 100 doenças, que se caracterizam pela perda do controle da divisão celular e o crescimento desordenado de células, que tendem a invadir outras estruturas orgânicas (INCA, 2017).

O câncer de bexiga se desenvolve a partir do epitélio da superfície interna da bexiga (urotélío) sendo especificamente chamado de carcinoma "urotelial" (SANLI et al., 2017). Este representa o segundo tumor urológico de maior ocorrência (INCA, 2015). Embora existam diversos tratamentos disponíveis aos pacientes que sofrem desta enfermidade, como intervenções cirúrgicas, quimioterapia, radioterapia e imunoterapia (MISRA; ACHARYA; SAHOO, 2010), alguns destes tratamentos ainda são restritos, devido a sua agressividade, não seletividade e impossibilidade de aplicação em indivíduos imunocomprometidos (MIURA et al., 2011).

Sendo assim, o desenvolvimento de novos compostos economicamente viáveis, seletivos e com potencial ação antitumoral destinados ao tratamento de tumores de bexiga constitui um desafio da terapêutica para este tipo de neoplasia (BEGNINI et al., 2013). O grupo de pesquisa em Oncologia Celular e Molecular do Laboratório de Biotecnologia do Câncer, do Centro de Desenvolvimento Tecnológico

da UFPel, tem desenvolvido e avaliado *in vitro* uma série de compostos contra o câncer de bexiga (BEGNINI et al., 2014; DA ROSA et al., 2017; TESSMANN et al., 2017). Porém, para que fármacos com potencial ação antitumoral venham a ser incorporados à clínica, eles devem primeiro comprovar sua eficácia e segurança em ensaios *in vitro* e em ensaios pré-clínicos utilizando modelos biológicos animais (JUNOD, 2013).

Assim, o desenvolvimento e validação de modelos biológicos adequados para o estudo do câncer possuem extrema importância no âmbito do descobrimento de novos fármacos. Embora roedores sejam a plataforma mais utilizada para estudos *in vivo* no geral (VANDAMME, 2014), modelos porcinos já demonstraram ser mais preditivos da resposta a terapias em humanos do que os modelos murinos (MEURENS et al., 2012).

Suínos têm sido considerados modelos úteis para estudos biomédicos, devido suas semelhanças anatômicas e fisiológicas com os humanos. Deste modo, modelos porcinos vêm sendo cada vez mais apreciados pelo seu potencial em mimetizar doenças humanas (PRATHER, 2013). Suínos são animais onívoros, assim como os humanos, e o sequenciamento de seu genoma demonstrou que ambas espécies possuem também diversas similaridades genéticas (GROENEN et al., 2012).

Deste modo, tais características os tornam modelos atrativos para a descoberta de novas drogas. Descobrir e aprovar novas terapias eficientes contra o tratamento de neoplasias é um desafio (HOELDER; CLARKE; WORKMAN, 2012), principalmente porque o câncer é uma doença altamente heterogênea com múltiplos mecanismos de ação.

A oncologia é, na verdade, um mercado enorme para as indústrias farmacêuticas e tornou-se a maior área terapêutica em termos de número de projetos, investimentos em pesquisa e desenvolvimento (P & D) e número de ensaios clínicos (ARROWSMITH, 2012). Portanto, é de extrema importância o desenvolvimento e validação de modelos biológicos adequados para o teste de novas drogas oncológicas.



## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

O presente trabalho teve como objetivo realizar uma revisão de literatura visando contribuir com a caracterização e aceitação científica do modelo suíno transgênico denominado Oncopig, como modelo biológico adequado para o estudo do câncer de bexiga, em uma forma de transição dos ensaios pré-clínicos *in vitro* para ensaios pré-clínicos em sistemas robustos biologicamente.

### **2.2 Objetivos específicos**

Abordar os tópicos “câncer de bexiga” e “importância de modelos biológicos” separadamente e, após o relato da importância e problemática de cada assunto, realizar uma hipotetização do potencial uso e relevância da plataforma *Oncopig* como modelo biológico para carcinomas de bexiga.

### **3 Métodos**

Uma pesquisa em forma de revisão de literatura foi realizada para a identificação de artigos originais e de revisão. Para tal, foram utilizados o banco de dados PubMed (NCBI) e sites de órgãos nacionais e internacionais de referência na área oncológica, como o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a *American Cancer Society* (ACS) e a *World Health Organization* (WHO). As palavras-chaves empregadas foram: cancer, *genetically defined swine cancer model*, *porcine models*, *rodent model*, *bladder cancer*, *biological model*, *bladder cancer treatment*, *bladder cancer statistics* e *oncopig*.

## **4 Revisão bibliográfica**

### **4.1 Câncer de bexiga**

De acordo com estimativas da organização mundial da saúde (OMS), neoplasias foram responsáveis por aproximadamente 8,8 milhões de óbitos no ano de 2015, representando quase uma em cada seis mortes que ocorreram no mundo neste período (WHO, 2017). Projeções indicam que os índices de indivíduos que virão a ser acometidos por esta enfermidade ainda deve subir nos próximos anos, principalmente devido ao envelhecimento da população. É estimado que no ano de 2020, o número de novos casos de neoplasias alcance os 15 milhões, representando o dobro do ocorrido no ano de 2000 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

Dentre os vários tipos de câncer, o câncer de bexiga merece destaque pelo fato de representar o tratamento neoplásico de maior custo econômico para a saúde pública, devido suas altas taxas de recorrência, acometendo aproximadamente 70% dos pacientes, e seus longos períodos de tratamento (SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2013).

Com relação a sua epidemiologia, o câncer de bexiga é o nono tumor mais comum no mundo (FERLAY et al., 2015). Representa o segundo tipo de tumor do trato geniturinário de maior ocorrência, onde é precedido apenas pelo câncer de próstata (INCA, 2017). No ano de 2012, foi estimada a ocorrência de 429.000 casos de câncer de bexiga mundialmente (FERLAY et al., 2015).

Esta neoplasia afeta mais homens do que mulheres, em uma proporção de 3,5 homens para cada mulher (FERLAY et al., 2015). Só para o ano de 2016, foram estimados 9.670 novos casos da doença no Brasil, sendo destes 7.200 em homens

e 2.470 em mulheres (INCA, 2016). Além disso, ocorre principalmente em pessoas idosas, onde aproximadamente 80% dos novos casos acometem indivíduos com 60 anos ou mais (RIES et al., 2007). O envelhecimento natural do ser humano, por si só, já traz mudanças nas células e, somado ao fato de pessoas idosas terem sido expostas por mais tempo aos diferentes fatores de risco para o câncer, aumenta-se ainda mais sua suscetibilidade à transformação maligna. Isso explica, em parte, as razões para o câncer ser mais frequente nessa fase da vida (INCA, 2017).

#### **4.1.1 Fatores de risco**

A presença dos agentes cancerígenos, por si só, não pode ser responsabilizada pelo desenvolvimento dos tumores, visto que o câncer é uma doença multicausal. Porém, existem fatores que podem influenciar no risco de desenvolvimento de neoplasias, sendo assim chamados de fatores de risco.

O tabagismo é o principal fator de risco relacionado ao câncer de bexiga. A associação entre tabagismo e neoplasias de bexiga tem sido objeto de uma série de estudos epidemiológicos e os resultados obtidos demonstram um risco em torno de 2 a 3 vezes maior de câncer de bexiga em pessoas que já foram fumantes ou são fumantes em comparação com não fumantes (JANKOVIC; RADOSAVLJEVIC, 2007). Este risco aumenta de uma forma diretamente proporcional ao número de cigarros e anos que o indivíduo esteve em contato com as substâncias tóxicas do tabaco (ZEEGERS et al., 2000).

Outros exemplos incluem as exposições ocupacionais e a esquistossomose urinária, as quais estão relacionados com 5 a 10 por cento dos cânceres de bexiga (JANKOVIC; RADOSAVLJEVIC, 2007). Aminas aromáticas, utilizadas na fabricação de corantes químicos e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) são as substâncias mais relacionadas ao aumento de risco em desenvolver a doença (BURGER et al., 2012). No que concerne à esquistossomose, sua relação com neoplasias de bexiga foi explicada pela irritação crônica do urotélio que, conseqüentemente, gera altos níveis de metabolitos cancerígenos na urina (IARC, 1994).

Algumas alterações genéticas também são bem estabelecidas como fatores de risco para o desenvolvimento de neoplasias de bexiga. Como exemplo, destaca-

se variações em genes envolvidos no metabolismo celular, como a N-acetiltransferase 2 e a glutathione S-transferase M1, que realizam a biotransformação de fase dois de diversas substâncias, incluindo produtos citotóxicos e carcinogênicos (BURGER et al., 2012).

Cânceres de bexiga estão associados também com alterações que geram instabilidade genômica nas células, como mutações no gene supressor de tumor p53 (MALMSTROM et al., 2002).

Por fim, indivíduos brancos possuem duas vezes mais chance de desenvolver câncer de bexiga quando comparados às pessoas negras, hispânicas e asiáticas (WANG; SUN, 2014).

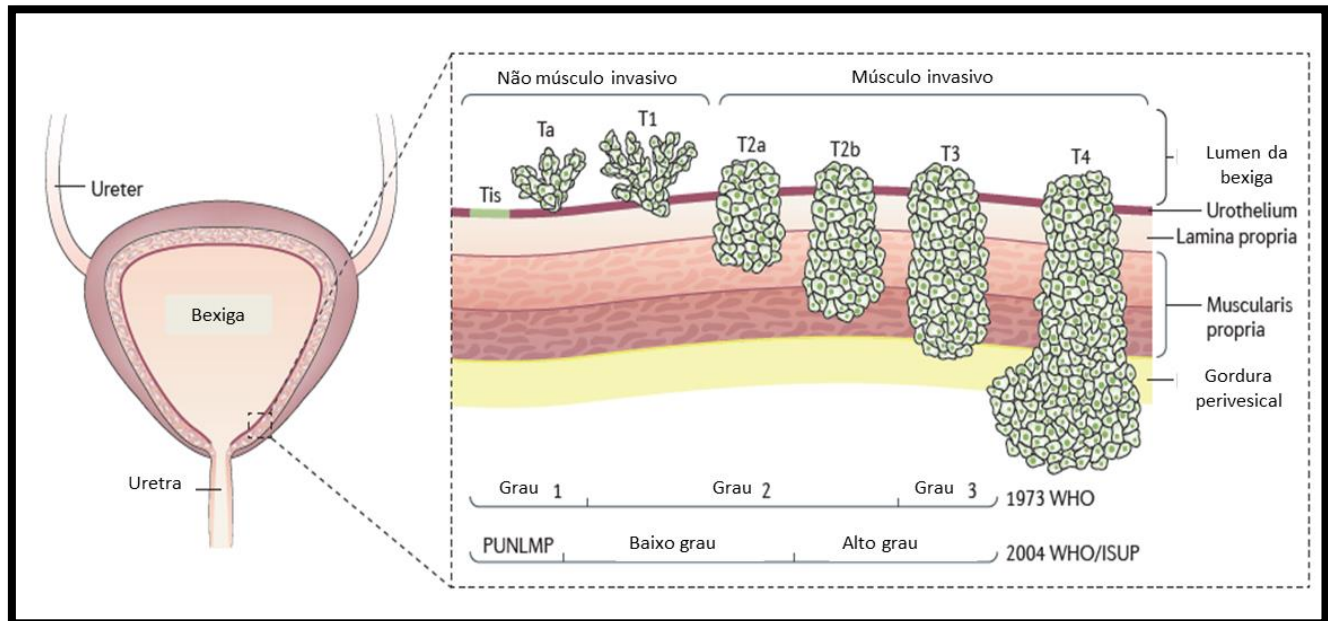
#### **4.1.2 Estadiamento e Histologia**

Com relação ao estadiamento, deve ser empregado o método aceito universalmente da União Internacional Contra o Câncer (UICC), denominado Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos, o qual se baseia nas características do tumor primário (T), linfonodos regionais (N) e a presença ou ausência de metástase à distância (M). Porém, esta classificação somente é aplicável aos carcinomas (SOBIN; GOSPODARIWICZ; WITTEKIND, 2009).

A subdivisão dos tumores de bexiga se dá de acordo com o tipo de célula que sofre a alteração maligna primordialmente. Assim, existem três tipos principais de tumores de bexiga: carcinoma de células transicionais (CCTs), adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas (INCA, 2017). A grande maioria dos cânceres de bexiga são CCT, também conhecidos por carcinomas uroteliais (MOSCHINI et al., 2017). Este subtipo engloba tumores que iniciam nas células do tecido mais interno da bexiga (INCA, 2017).

Em termos histológicos, os CCTs podem ser subdivididos em músculo invasivos ou não-músculo invasivos (figura 1), sendo os não-músculo invasivo considerados os mais comuns (DYRSKJOT et al., 2007). Cerca de 75% dos pacientes apresentam tumores não-músculo invasivos, que incluem tumores limitados à mucosa (Ta e Tis) ou submucosa (T1) (KAMAT et al., 2016). Tumores Ta são de baixo grau e raramente progridem para tumores invasivos. Contudo, costumam ser recorrentes (em torno de 70%), o que resulta em longos períodos de

tratamento da doença (BABJUK et al., 2015; DYRSKJOT et al., 2007; KAMAT et al., 2016).



**Figura 1** - Tipos e estágios do câncer de bexiga. Adaptado de SANLI et al. (2017).

Por outro lado, os tumores de estágio T1 evoluem com frequência acometendo a musculatura vesical e resultando em um prognóstico menos favorável ao paciente, com sobrevida de cinco anos em menos de 50% dos casos (KAMAT et al., 2016).

Independente da fase em que o câncer é detectado, há a necessidade de se classificar cada caso de acordo com a extensão do tumor (estadiamento), permitindo ao especialista propor o tratamento mais adequado para cada paciente.

#### 4.1.3 Terapias contra neoplasias de bexiga

Devido ao CCT ter predisposição para progredir como tumor músculo invasivo e apresentar altas taxas de recorrência, acaba se tornando um desafio para as terapêuticas disponíveis até o momento.

As abordagens terapêuticas comumente utilizadas para tratar neoplasias de bexiga incluem ressecção transuretral (RT) do tumor da bexiga, terapia intravesical com *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), quimioterapia adjuvante e neoadjuvante,

cistectomia parcial ou radical e radioterapia (SANLI et al., 2017). A escolha da abordagem a ser utilizada em cada paciente dependerá do estadiamento da doença, assim como suas características histopatológicas.

Por exemplo, a imunoterapia intravesical de BCG é considerada o tratamento padrão ouro para CBNMI após a realização da RT do tumor (HERR, 1992). O BCG é um agente imunoterapêutico que foi desenvolvido a partir de *Mycobacterium Bovis* e seu mecanismo de ação não é ainda completamente elucidado. No entanto, sabe-se que o BCG ativa o sistema imunológico aderindo ao urotélio e às células tumorais através da ação da fibronectina (DONIN et al., 2017). Alguns pacientes, como indivíduos imunossuprimidos, podem ter contra-indicações para BCG. *Ensaio in vitro* tem demonstrado que a utilização de BCG recombinante pode ser uma estratégia biotecnológica com potencial ao avanço dos estudos pré-clínicos (BEGNINI et al, 2013b; BEGNINI et al., 2015).

Os cânceres de baixo grau são tratados com ressecção isolada. Já tumores de alto grau Ta e T1, por apresentarem maior risco de recorrência e progressão para estádios mais invasivos, podem necessitar de ressecções adicionais e terapia intravesical com BCG, ou com o quimioterápico mitomicina (BAROCAS; CLARK, 2008; SHARMA; KSHEERSAGAR; SHARMA, 2009), sendo a terapia com BCG preferida à mitomicina nos casos de alto risco de progressão da doença (SHARMA; KSHEERSAGAR; SHARMA, 2009).

Em pacientes com câncer de bexiga músculo invasivo (CBMI), a progressão para metástases é um fator comum (KNOWLES; HURST, 2015). Sendo assim, o tratamento para esse tipo é a cistectomia radical e o uso de quimioterapia sistêmica (ACS, 2017).

As quimioterapias adjuvante e neoadjuvante contam com uma ampla gama de fármacos disponíveis comercialmente para servir como abordagens terapêuticas contra tumores de bexiga, sendo a mitomicina C (MMC) o agente quimioterapêutico mais utilizado. Seu mecanismo de ação consiste na interrupção da síntese do DNA (MALMSTROM et al., 2009). Abaixo, na tabela 1, são citados exemplos de terapias atualmente disponíveis para o tratamento de neoplasias de bexiga (NCI, 2017).

**Tabela 1** - Exemplos de terapias disponíveis comercialmente para o tratamento de neoplasias de bexiga. Fonte: Nacional Cancer Institute, 2017.

<b>Terapia</b>	<b>Classificação</b>	<b>Ano de aprovação (FDA)</b>
<b>Atezolizumab</b>	Anticorpo monoclonal	2016
<b>Avelumab</b>	Anticorpo monoclonal	2017
<b>BCG</b>	Imunoterapia	1990
<b>Cisplatin</b>	Quimioterápico	1978/1979
<b>Doxorubicin Hydrochloride</b>	Quimioterápico	1974
<b>Gemcitabine</b>	Quimioterápico	1996
<b>Imfinzi (Durvalumab)</b>	Anticorpo monoclonal	2017
<b>Keytruda (Pembrolizumab)</b>	Anticorpo monoclonal	2017
<b>Opdivo (Nivolumab)</b>	Anticorpo monoclonal	2017
<b>Mitomycin C</b>	Quimioterápico	1974
<b>Thiotepa</b>	Quimioterápico	1959
<b>Valstar (Valrubicin)</b>	Quimioterápico	1999

A valrubicina é o único agente aprovado pela FDA para terapia em pacientes que não respondem ao BCG. É um análogo semissintético da doxorubicina de antraciclina que foi lançado em 1999 e relançado em 2009 por problemas de



fabricação. Diferente da doxorubicina, a valrubicina passa a membrana citoplasmática rapidamente e se acumula no citoplasma levando à morte celular citolítica (PORTEN; LEAPMAN; GREENE, 2015). O medicamento valrubicina já demonstrou eficácia e tolerabilidade em pacientes com carcinoma *in situ*, antes de se considerar a cistectomia (COOKSON et al., 2014).

No entanto, a combinação de MMC com termoterapia é uma alternativa de tratamento promissor. A ideia de usar o calor para o tratamento do câncer não é nova, porém nos últimos anos o uso combinado de quimioterapia e calor como "quimiohipertermia" foi avaliado para pacientes com doença de alto risco e falha nos tratamentos com BCG (SLATER et al., 2014). Geralmente, em casos onde as outras abordagens, incluindo a imunoterapia com BCG, falham, a cistectomia radical é encorajada (GIANNARINI et al., 2014; SANLI et al., 2017).

Embora existam diversas abordagens quimioterápicas comumente usadas na clínica para tratar neoplasias de bexiga com eficiência comprovada, como as mencionadas anteriormente, elas ainda são pouco seletivas e conseqüentemente apresentam uma ampla gama de efeitos adversos.

Assim, o desenvolvimento de novos compostos economicamente viáveis com potencial ação antitumoral destinados ao tratamento de tumores de bexiga constitui um dos maiores desafios da terapêutica para este tipo de neoplasia (BEGNINI et al., 2013).

Porém, para que fármacos com potencial ação antitumoral venham a ser incorporados à clínica, eles devem primeiro comprovar sua eficácia e segurança em ensaios pré-clínicos utilizando modelos animais. Neste contexto, o desenvolvimento e validação de modelos biológicos adequados para o estudo do câncer possuem extrema importância no âmbito de descobrimento de novos fármacos.

Destinado a uma avaliação e seleção inicial de fármacos com ação antitumoral, se faz necessário um conjunto de ensaios *in vitro* baseados em linhagens celulares de câncer de bexiga, que podem ser obtidas no banco de células denominado ATCC (ATCC, 2017) (Tabela 2). Os ensaios são destinados a avaliar o percentual de células viáveis, indução de apoptose, parada de ciclo celular, expressão gênica de genes relacionados a rotas metabólicas de interesse, como a apoptose, por exemplo, entre outros.

**Tabela 2** - Linhagens celulares comerciais de câncer de bexiga e seus respectivos tipos tumorais.

<b>Linhagem Celular</b>	<b>Tipo tumoral</b>	<b>Morfologia</b>
<b>HT-1197</b>	<b>Carcinoma</b>	<b>Epitelial</b>
<b>HT-1376</b>	<b>Carcinoma de grau III</b>	<b>Epitelial</b>
<b>RT4</b>	<b>Papiloma de células transicionais</b>	<b>Epitelial</b>
<b>SW780</b>	<b>Carcinoma de células transicionais</b>	<b>Epitelial</b>
<b>T-24</b>	<b>Carcinoma de células transicionais</b>	<b>Epitelial</b>
<b>TCCSUP</b>	<b>Carcinoma de células transicionais de grau IV</b>	<b>Epitelial</b>
<b>UM-UC-3</b>	<b>Carcinoma de células transicionais</b>	<b>Epitelial</b>
<b>5637</b>	<b>Carcinoma de grau II</b>	<b>Epitelial</b>

#### **4.2 Importância de modelos biológicos**

Os modelos animais são um passo essencial no processo de desenvolvimento de drogas. Devido a questões éticas, é necessário testar novos produtos biomédicos em modelos animais durante a fase pré-clínica antes de iniciar

a experimentação humana, a fim de avaliar a eficácia, toxicidade e segurança da nova terapia em questão (JUNOD, 2013).

Em relação às responsabilidades éticas envolvidas na realização de experimentos com animais, testes *in vivo* devem ser conduzidos com base no paradigma dos 3 Rs. Do inglês “Reduce, Replace and Refine”, ele impõe que o número de animais utilizados deve ser mantido ao mínimo necessário. Além disso, quando possível, deve-se substituir testes em animais por outras ferramentas e, por fim, os testes devem ser refinados a fim de diminuir o sofrimento dos modelos biológicos (RUSSELL E BURCH, 1959).

Modelos biológicos precisam ser semelhantes biologicamente à doença humana em questão, demonstrar resposta similar às intervenções clínicas eficazes em humanos e seus alvos de investigação devem possuir um papel semelhante no modelo da doença com a situação clínica de pacientes (DENAYER; STÖHRN; VAN ROY, 2014). Sendo assim, os animais devem ser capazes de imitar de forma confiável a anatomia e fisiologia normal dos órgãos e tecidos humanos de interesse, além de refletir com precisão os aspectos morfológicos e bioquímicos da patogênese da doença.

No entanto, é comum enfrentar uma dificuldade na tradução da resposta obtida entre o animal pré-clínico e os humanos (MAK; EVANIEW; GHERT, 2014). Isto é especialmente verdadeiro para a oncologia, como resultado de dificuldades em refletir a heterogeneidade e características complexas do tumor em modelos animais (HUSZTHY et al., 2012; VAN MARION et al., 2016).

Existem vários casos de terapias candidatas que falharam em ensaios clínicos, embora tenham apresentado bons resultados nas fases anteriores do desenvolvimento de medicamentos (WILLIAMS, 2013, 2015). Na verdade, cerca de 85% das terapias testadas em ensaios clínicos acabam falhando (LEDFOORD, 2011), no qual a terapêutica contra o câncer representa a maior proporção dessas falhas (ARROWSMITH, 2011). Apenas 5% dos agentes que demonstram atividade anticancerígena em fases pré-clínicas são aprovados após demonstrar eficácia suficiente nos testes de fase III (HUTCHINSON; KIRK, 2011).

Um dos conceitos-chave nestes casos é a necessidade de uma melhoria nos primeiros passos da descoberta de drogas, onde destacamos a importância no uso de modelos animais adequados em ensaios pré-clínicos. Modelos animais

adequados são cruciais para a continuação da validação e descoberta de novos medicamentos.

#### **4.2.1 Roedores como modelos biológicos**

Os roedores são a plataforma mais utilizada para triagem pré-clínica e como modelos biológicos em geral. Algumas de suas características, como o seu pequeno tamanho, o baixo custo e a genética bem conhecida, os tornam uma ferramenta padrão para avaliar novas terapêuticas. Sem mencionar o fato de que eles podem ser geneticamente modificados com bastante facilidade (VANDAMME, 2014). No entanto, eles podem ser muitas vezes modelos não adequados para várias doenças humanas (BURNS et al., 2015; SEOK et al., 2013), incluindo para o câncer (DE JONG; MAINA, 2010).

Consequentemente, as dificuldades mencionadas em traduzir a resposta obtida nos estudos pré-clínicos mais tarde no estágio de testes clínicos são bastante comuns quando os roedores são escolhidos como o modelo biológico utilizado. Um exemplo é o ensaio clínico de fase II do IPI-926 (saridegib) em pacientes com condrossarcoma avançado.

O teste foi interrompido cedo porque não mostrou nenhum efeito relevante em seres humanos submetidos ao tratamento com Saridegib quando comparado com o grupo placebo (WAGNER et al., 2013), apesar de os modelos de meduloblastoma em ratos tratados com IPI-926 terem demonstrado resultados promissores, apresentando aumento de cinco vezes na sobrevivência (LEE et al., 2012). Este trabalho demonstra a necessidade de modelos animais mais adequados para servir como uma ferramenta complementar para a descoberta de drogas para o tratamento do câncer.

Embora os modelos de camundongos geneticamente modificados sejam ferramentas importantes para estudar a biologia do câncer (JEONG, 2016; JIANG; YU, 2017; PEREZ-GUIJARRO et al., 2017) e representem uma melhoria em relação aos modelos de camundongos selvagens, eles ainda possuem diversas limitações. Dito isto, acredita-se que o uso de um modelo adequado de câncer em uma plataforma de animal grande, como a suína, beneficiaria muito o desenvolvimento de

novas terapêuticas contra o câncer (FLISIKOWSKA; KIND; SCHNIEKE, 2016; SCHOOK et al, 2015).

#### 4.2.2 Suínos como modelo biológico

Os suínos já provaram ser mais preditivos de tratamentos terapêuticos em seres humanos do que roedores (MEURENS et al., 2012). O suíno fornece uma plataforma ideal para estudar câncer devido às suas semelhanças com humanos nos níveis anatômico, fisiológico, metabólico e genético. A sequência de genoma do suíno publicada em 2012 forneceu informações importantes sobre a sua semelhança genética com os seres humanos (GROENEN et al., 2012), bem como ajudou a consolidar sua aceitação como um modelo biomédico de grande porte para doenças humanas (PRATHER, 2013; SCHOOK et al, 2015).

Além da alta homologia com o genoma humano, o genoma do suíno também exibe uma regulação epigenética altamente conservada demonstrada por padrões genômicos de metilação semelhantes aos humanos (SCHACHTSCHNEIDER et al., 2015).

Em relação à sua genética do câncer, um estudo realizado com células suínas geneticamente modificadas demonstrou que elas requerem mutações em oncogenes e genes supressores de tumores comumente encontrados em cânceres humanos para adquirirem um fenótipo transformado (ADAM et al., 2007; RANGARAJAN et al., 2004) Em adição, tais células suínas transformadas se demonstraram capazes de formar tumores *in vivo* após a sua injeção autóloga (ADAM et al., 2007).

Além disso, ambas espécies tem a expressão da subunidade catalítica da enzima telomerase, a transcriptase reversa de telomerase (TERT), suprimida nos tecidos durante a vida adulta em tecidos saudáveis, enquanto células tumorais possuem a característica de expressar TERT (KIM et al., 1994; PATHAK et al., 2000).

Estes trabalhos demonstram que a via tumorigênica dos suínos tem uma semelhança mais próxima com a via humana quando comparada aos roedores, uma vez que células murinas normais podem ser transformadas em células tumorais com uma quantidade menor de mutações do que as células humanas (RANGARAJAN et

al., 2004), além de roedores expressarem TERT ao longo da vida em diversos tecidos saudáveis (CHADENEAU et al., 1995).

Os suínos fornecem um sistema grande ideal para o rastreio pré-clínico de drogas devido à sua semelhança no metabolismo com os seres humanos. Por exemplo, os suínos provaram ser um modelo adequado para o metabolismo de fármacos relacionados com as enzimas da subfamília CYP3A.

As enzimas dos citocromos P450 (CYP) são conhecidas por seu papel no metabolismo dos compostos e a subfamília CYP3A é a mais importante dentre eles, uma vez que é responsável por metabolizar mais de metade de todas as drogas atualmente no mercado (ZUBER; ANZENBACHEROVA; ANZENBACHER, 2002).

O receptor de xenosensor de prenhes C de suínos, bem como a sua CYP3A4, se assemelham muito proximamente aos encontrados em seres humanos (GRAY et al., 2010; POLLOCK; ROGATCHEVA; SCHOOK, 2007). Em uma comparação do mRNA constitutivo de receptores e enzimas relacionadas à família CYP, os resultados demonstraram semelhança com as taxas de expressão encontradas em humanos (NIELSEN et al., 2017).

Por outro lado, alguns roedores (por exemplo, ratos) não são considerados um bom modelo para avaliar reações catalisadas pela CYP3A4, devido a discrepâncias com seres humanos no metabolismo relacionado a esta enzima, fazendo com que eles processem de forma diferente alguns fármacos (MARTIGNONI; GROOTHUIS; DE KANTER, 2006). Isso demonstra como os modelos de suínos podem ser muito úteis em estudos de farmacologia e toxicologia de compostos e de fato tem sido utilizados com esta finalidade (THORN et al., 2009, 2011).

Outra característica benéfica dos suínos que os torna um bom modelo biológico é o fato de que eles podem viver até 10 anos. Para fins de desenvolvimento de medicamentos contra o câncer, isso é especialmente relevante porque permite que a terapêutica seja testada e posteriormente monitorada em uma plataforma pré-clínica capaz de realizar todos os estágios de desenvolvimento, progressão, invasão e metástase do tumor. Permitindo assim a avaliação da ação a longo prazo do composto (SEGATTO et al., 2017).

Além disso, o tamanho grande do modelo porcino é ideal não só para administrar terapêuticas da mesma forma que são administrados em pacientes, incluindo pelas vias orais, intravenosa, intraperitoneal, por via inalatória, subcutânea,

intramuscular, absorção dérmica e transmucosal, mas também para a coleta de maiores volumes de fluidos corporais (HELKE; SWINDLE, 2013) (NUNOYA et al., 2007), permitindo que os procedimentos da amostra de sangue se relacionem estreitamente com os realizados em humanos.

Assim, a implementação do suíno como um modelo biomédico ideal para a descoberta de medicamentos poderia ajudar a resolver a lacuna existente entre o teste de potenciais novos tratamentos e produtos benéficos aos pacientes (SEGATTO et al., 2017).

#### **4.2.2.1 Suínos transgênicos como modelo biológico**

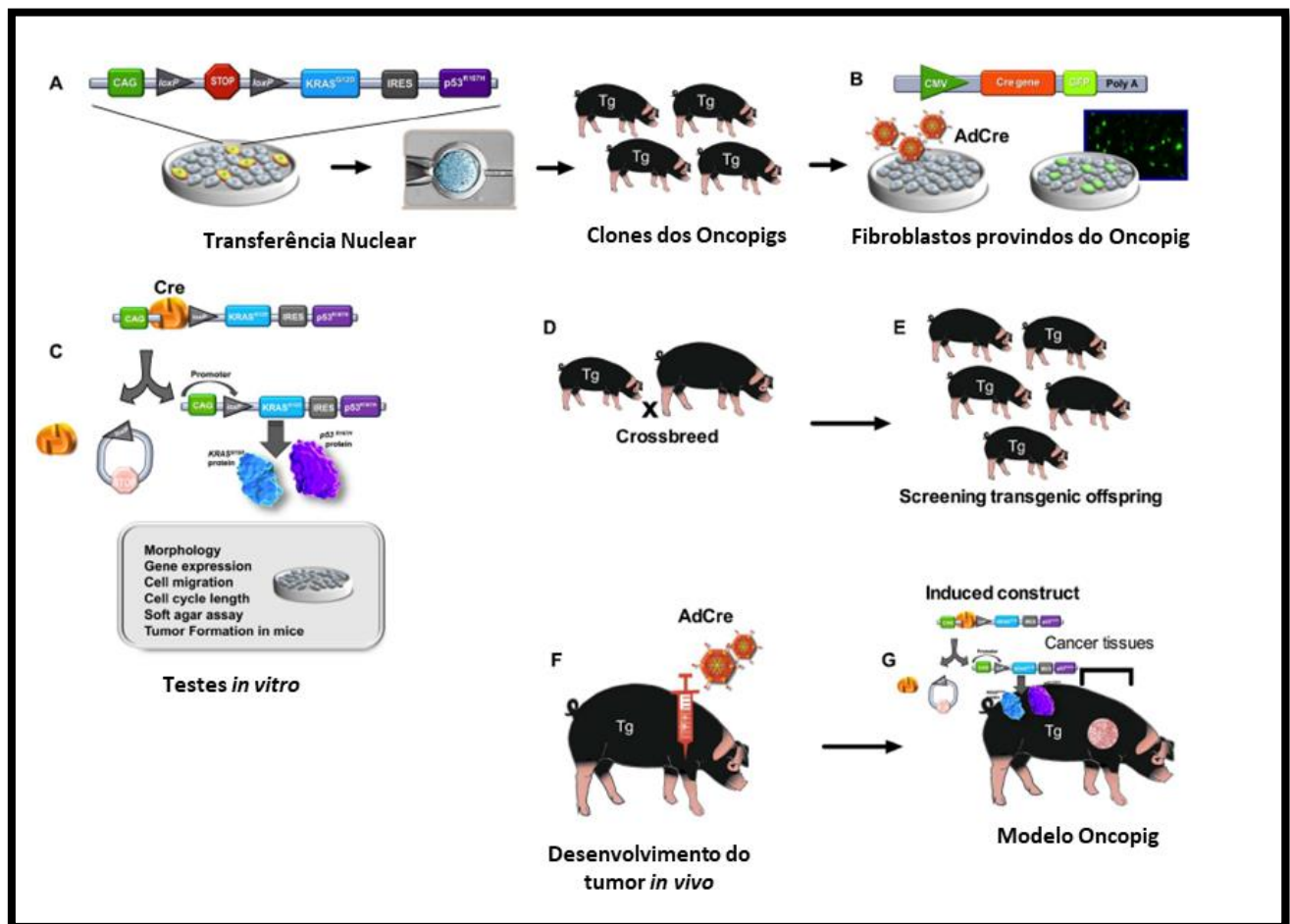
A engenharia genética permite o desenvolvimento de modelos transgênicos de animais suínos que recapitulam alterações genéticas particulares encontradas em doenças humanas, para fins de uso em pesquisas biomédicas. Estes modelos podem ser obtidos através de várias técnicas, tais como micro injeção de DNA nos pro núcleos de oócitos fertilizados, transgênese lentiviral, transferência de genes mediada por espermatozoide e transferência nuclear de células somáticas (SCNT) usando células doadoras nucleares geneticamente modificadas (AIGNER et al., 2010).

Atualmente, suínos transgênicos estão sendo cada vez mais aceitos como modelo biológico de diversas doenças humanas (AIGNER et al., 2010), visto que modelos porcinos transgênicos já foram estabelecidos para doenças neurodegenerativas (KRAGH et al., 2009), fibrose cística (ROGERS et al., 2008), doenças cardiovasculares (HAO et al., 2006), diabetes mellitus (RENNER et al., 2010) e até mesmo câncer (FLISIKOWSKA et al., 2012; SCHOOK et al., 2015).

Os avanços das técnicas de engenharia genética combinados com o conhecimento do genoma do suíno e sua semelhança com os seres humanos (GROENEN et al., 2012), somados às características dos suínos anteriormente mencionados, tornam os modelos porcinos transgênicos uma ferramenta poderosa para servir como modelo biológico adequado na descoberta de novas terapias contra o câncer.

#### 4.2.2.1.1 *Oncopig Cancer Model*

Tendo isto em vista, Schook *et al.* desenvolveram um modelo suíno transgênico de câncer - denominado *Oncopig Cancer Model* (OCM) - contendo o gene supressor de tumor TP53<sup>R167H</sup> e o oncogene KRAS<sup>G12D</sup> mutados. O uso do sistema AdCre permitiu que as células adquirissem um fenótipo tumoral somente em um tempo e espaço escolhidos, uma vez que os transgenes mutados são expressos apenas após a infecção com adenovírus codificando Cre recombinase (AdCre) (SCHOOK *et al.*, 2015b) (figura 2).



**Figura 2** - Desenvolvimento do Oncopig usando o sistema induzível Cre-LoxP. Adaptado de SCHOOK *et al.* (2016).

Este sistema possibilita imitar de perto a formação de tumor espontâneo que ocorre nos seres humanos. A injeção intramuscular de AdCre no OCM resultou no desenvolvimento de um sarcoma de tecido mole, com características patológica sugestivas de leiomiossarcoma (SCHOOK *et al.*, 2015b).



Além disso, recentes estudos do perfil de transcrição dessas células provindas do *Oncopig* de sarcoma de tecido mole (STM) demonstraram que as mesmas apresentam sinais de sinalização do *TP53* alterados, ativação de sinalização de *Wnt* e sinais de reprogramação epigenética, todas características transcricionais encontradas no sarcoma de tecido mole humano. Além disso, o regulador transcricional *FOSL1* de STM humano também foi encontrado regulando as células provindas do *Oncopig* (SCHACHTSCHNEIDER et al., 2017a).

Outros dois tipos de cânceres foram desenvolvidos até à data na plataforma *Oncopig Cancer Model*: carcinoma hepatocelular (CHC) e câncer de pâncreas. As células de hepatócitos provindas do *Oncopig* foram transformadas usando o sistema AdCre da mesma maneira como mencionado anteriormente, resultando em células porcinas de hepatocarcinoma que expressam os oncogenes *TP53*<sup>R167H</sup> e *KRAS*<sup>G12D</sup>. Essas células adquiriram características histopatológicas semelhantes ao CHC humano e foram capazes de formar tumores após a injeção autóloga no OCM (SCHACHTSCHNEIDER et al., 2017b).

Além disso, características transcricionais de CHC humanos também foram detectadas nestas células juntamente com uma expressão de genes conservados quando comparada com linhas celulares de CHC humanas (SCHACHTSCHNEIDER et al., 2017b).

O modelo *oncopig* para adenocarcinoma ductal pancreático, por sua vez, ainda está em processo de desenvolvimento. No entanto, este modelo já provou ser capaz de induzir com sucesso os dois histotipos de câncer de pâncreas mais predominantes, o exócrino e o neuroendócrino, no OCM após injeção de adenovírus codificando cre recombinase (AdCre) no ducto pancreático principal (DIAZ et al., 2016).

Em uma revisão recentemente publicada por Segatto e colaboradores, anexada ao presente trabalho (anexo), suínos são propostos como uma plataforma complementar na descoberta de novas terapias contra o câncer através de triagens fenotípicas de compostos, devido suas similaridades metabólicas, fisiológicas e genéticas com os humanos (SEGATTO et al., 2017).

Assim, o OCM poderia servir como uma plataforma translacional de teste de drogas com potencial terapêutico após a realização de triagem fenotípica dos compostos e posterior teste em modelos animais de pequeno porte (roedores), a fim de comprovar a eficácia da terapia antes de iniciar os ensaios clínicos em humanos

(SEGATTO et al., 2017), visto que o comitê internacional de harmonização exige que testes de toxicidade sejam realizados em pelo menos duas espécies animais relevantes (FDA, 2010).

#### 4.2.2.1.2 Outras plataformas suínas geneticamente definidas de câncer

Além do OCM, outras plataformas suínas foram desenvolvidas para servir como modelos biológicos de câncer. Elas incluem o modelo de pólipos adenomatosos familiar humano, em que o gene *APC* foi inativado pela introdução de códons de terminação prematura usando o método de eletroporação de DNA vetorial linearizado em células estaminais mesenquimatosas seguidas por SCNT. Os animais portadores da mutação *APC*<sup>1311</sup> desenvolveram pólipos no cólon e no reto após um ano (FLISIKOWSKA et al., 2012).

Dois trabalhos utilizaram mutantes *TP53* para criar modelos porcinos de câncer, um deles desenvolveu um modelo suíno geneticamente modificado expressando *TP53*<sup>R167H</sup> mutante, resultando em formação de linfomas e tumores osteogênicos nos mutantes homocigotos (SIEREN et al., 2014) e o outro obteve suínos *HC53 knockout* heterocigóticos que desenvolveram osteossarcomas espontâneos em animais mais velhos e homocigotos capazes de formar múltiplos osteossarcomas grandes em suínos de 7,8 meses de idade (SAALFRANK et al., 2016).

Mais recentemente, um modelo genético de câncer intestinal foi desenvolvido através da construção de cassetes contendo os oncogenes *KRAS*<sup>G12D</sup>, *cMYC* e *SV40LT* induzíveis por Flp-recombinase, além de um cassete com o ativador 4-hidroxitoxifen (4-OHT) controlado por um promotor específico do tecido do epitélio intestinal. A ativação *in vivo* do cassete contendo os oncogenes resultou no desenvolvimento de carcinoma neuroendócrino duodenal com metástase dos linfonodos em *minipigs* (CALLESEN et al., 2017).

Finalmente, uma tentativa de desenvolver um modelo de câncer de mama foi realizada através de knockout do gene *BRCA1* mediado por adenovírus associado recombinante (rAAV). Infelizmente, os animais morreram antes de poderem demonstrar qualquer alteração fenotípica (LUO; BOLUND; SØRENSEN, 2011).

### 4.3 Potencial da plataforma *Oncopig Cancer Model* para carcinomas de bexiga

Em relação ao desenvolvimento de potenciais terapias contra o câncer, a oncologia representa um mercado enorme para as indústrias farmacêuticas e já se tornou a maior área terapêutica em termos de número de projetos, investimentos em pesquisa e desenvolvimento (P & D) e número de ensaios clínicos (ARROWSMITH, 2012). No entanto, descobrir e aprovar novas terapias eficientes contra neoplasias é um desafio (HOELDER; CLARKE; WORKMAN, 2012), principalmente porque o câncer é uma doença altamente heterogênea com múltiplos mecanismos de ação.

Como demonstrado na presente revisão de literatura, suínos possuem grande potencial de utilização como modelo biológico em geral, devido suas diversas similaridades com os humanos. Assim, eles podem servir como modelos de tradução, testando a eficácia de novas terapias que mostram resultados promissores em triagens *in vitro* e em testes em animais pequenos antes de se mudar para ensaios clínicos humanos, diminuindo as taxas de falha (SEGATTO et al, 2017).

Embora os modelos de suínos geneticamente modificados sejam mais caros que os roedores geneticamente modificados, o uso de suínos como modelo de segundo animal em ensaios pré-clínicos é mais barato do que o uso de primatas não humanos. Também pode fornecer uma redução de custos na descoberta de medicamentos, confirmando os resultados do teste antes de iniciar um ensaio clínico humano altamente oneroso (SEGATTO et al, 2017).

Além disso, a injeção intravesical de AdCre na plataforma OCM poderia resultar na formação de tumores na bexiga permitindo o desenvolvimento de um modelo animal humanizado de câncer de bexiga altamente valioso em que novos compostos e imunoterapias como o BCG recombinante - uma abordagem imunoterapêutica promissora para câncer de bexiga (BEGNINI et al., 2015) - poderiam ser testados (SEGATTO et al, 2017).

Nosso grupo de pesquisa vem testando nos últimos anos a atividade antitumoral de vários compostos em linhagens celulares de câncer de bexiga, incluindo própolis vermelha brasileira (BEGNINI et al., 2014), derivados de AZT (DA ROSA et al., 2017) e derivados de pirazolina (TESSMANN et al., 2017), os quais demonstraram resultado promissores com uma potencial ação antitumoral frente as linhagens *in vitro* (BEGNINI et al., 2014; DA ROSA et al., 2017; TESSMANN et al.,

2017). Uma plataforma de modelo animal adequada, como a OCM, poderia auxiliar e melhorar os ensaios *in vivo* de diversos compostos promissores selecionados previamente em testes *in vitro*, como os mencionados nestes estudos anteriores.

## **5 Considerações finais**

Como ressaltado no presente trabalho, o desenvolvimento e validação de modelos biológicos adequados para o estudo do câncer possui extrema importância no âmbito de descobrimento de novos fármacos, uma vez que a experimentação animal é um passo essencial no processo de desenvolvimento e triagem de novas drogas.

O modelo suíno possui diversas características semelhantes aos humanos, o que os torna uma plataforma ideal tanto para o estudo do câncer em geral, quanto para o teste de potenciais terapias antitumorais em estudos pré-clínicos.

Por isso, após a exposição das problemáticas relacionadas ao câncer de bexiga e seus tratamentos, em adição às limitações dos modelos biológicos e roedores, acreditamos que o uso do *Oncopig Cancer Model* para o estudo e triagem de drogas contra neoplasias de bexiga iria beneficiar a pesquisa e o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para esta enfermidade.

## Referências

- AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS), 2017. Disponível em: <https://www.cancer.org/>. Acessado em 15 de outubro de 2017. 2017.
- ADAM, S. J.; RUND, L. A.; KUZMUK, K. N.; ZACHARY, J. F.; SCHOOK, L. B.; COUNTER, C. M. Genetic induction of tumorigenesis in swine. **Oncogene**, v. 26, n. 7, p. 1038–1045, 2007.
- AIGNER, B.; RENNER, S.; KESSLER, B.; KLYMIUK, N.; KUROME, M.; WUNSCH, A.; WOLF, E. Transgenic pigs as models for translational biomedical research. **Journal of Molecular Medicine (Berl)**, v. 88, n. 7, p. 653–664, 2010.
- ARROWSMITH, J. Trial watch: phase III and submission failures: 2007-2010. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 2, p. 87, 2011.
- ARROWSMITH, J. A. decade of change. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 1, p. 17–18, 2012.
- ATCC, 2017. Disponível em: <https://www.atcc.org/en.aspx/>. Acessado em 18 de dezembro de 2017. 2017.
- BABJUK, M., BÖHLE, A., BURGER, M., COMPÉRAT, E., KAASINEN, E., PALOU, J., ROUPRÊT, M., VAN RHIJN, B. W. G., SHARIAT, S., SYLVESTER, R., AND ZIGEUNER, R Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (Ta, T1 and CIS). **European association of urology**, v. 1, n. 2, p. 1–42, 2015.
- BAROCAS, D. A.; CLARK, P. E. Bladder cancer. **Current Opinion in Oncology**, v. 20, p. 301–3014, 2008.
- BEGNINI, K. R., LEON, P. M. M., RODRIGUES, F., THUROW, H. S., HENRIQUES, J. A. P., AND SEIXAS, F. K. Potencial antitumoral e apoptótico da própolis vermelha em células de carcinoma de bexiga. **XV ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**, 2013.
- BEGNINI, K.R.; RIZZI, C.; CAMPOS, V.F.; BORSUK, S.; SCHULTZE, E.; YURGEL, V.C.; NEDEL, F.; DELLAGOSTIN, O.A.; COLLARES, T.; SEIXAS, F.K. Auxotrophic recombinant *Mycobacterium bovis* BCG over expressing Ag85B enhances cytotoxicity on superficial bladder cancer cells in vitro. **Applied Microbiology**

**Biotechnology**, v.97, p. 1545-53, 2013b.

BEGNINI, K. R.; MOURA DE LEON, P. M.; THUROW, H.; SCHULTZE, E.; CAMPOS, V. F.; RODRIGUES, F. M.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O. A.; SAVEGNAGO, L.; ROESCH-ELY, M.; MOURA, S.; PADILHA, F. F.; COLLARES, T.; HENRIQUES, J. A. P.; SEIXAS, F. K. Brazilian red propolis induces apoptosis-like cell death and decreases migration potential in bladder cancer cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 639856, 2014.

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

BURGER, M.; CATTO, J. W. F.; DALBAGNI, G.; GROSSMAN, H. B.; HERR, H.; KARAKIEWICZ, P.; KASSOUF, W.; KIEMENEY, L. A.; LA VECCHIA, C.; SHARIAT, S.; LOTAN, Y. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. **European Urology**, v. 63, n. 2, p. 234–241, 2012.

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

CALLESEN, M. M.; ÁRNADÓTTIR, S. S.; LYSKJAER, I.; ØRNTOFT, M.-B. W.; HØYER, S.; DAGNAES-HANSEN, F.; LIU, Y.; LI, R.; CALLESEN, H.; RASMUSSEN, M. H.; BERTHELSEN, M. F.; THOMSEN, M. K.; SCHWEIGER, P. J.; JENSEN, K. B.; LAURBERG, S.; ØRNTOFT, T. F.; ELVERLØV-JAKOBSEN, J. E.; ANDERSEN, C. L. A genetically inducible porcine model of intestinal cancer. **Molecular Oncology**, n. 2017, p. 0–1, 2017.

CHADENEAU, C.; SIEGEL, P.; HARLEY, C. B.; MULLER, W. J.; BACCHETTI, S. Telomerase activity in normal and malignant murine tissues. **Oncogene**, v. 11, n. 5, p. 893–898, 1995.

COOKSON, M. S.; SAM, S.; CHANG, C.; LIHOU, T.; LI, S. Q.; HARPER, Z. L.; TUTRONE, R. F. Use of intravesical valrubicin in clinical practice for treatment of nonmuscleinvasive bladder cancer, including carcinoma in situ of the bladder. **Therapeutic Advances in Urology**, v. 6, n. 5, p. 181–191, 2014.

DA ROSA, R. M. ; PICCOLI, B. C.; DA SILVA, F. D.; DORNELLES, L.; ROCHA, J. B. T.; SONEGO, M. S.; BEGNINI, K. R.; COLLARES, T.; SEIXAS, F. K.; RODRIGUES,

O. E. D. Synthesis, antioxidant and antitumoral activities of 5'-arylchalcogeno-3-aminothymidine (ACAT) derivatives. **Medicinal Chemistry Communications**, v. 8, n. 2, p. 408–414, 2017.

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

DENAYER, T.; STÖHRN, T.; VAN ROY, M. Animal models in translational medicine: Validation and prediction. **New Horizons in Translational Medicine**, v. 2, n. 1, p. 5–11, 2014.

DIAZ, A.; PRINCIPE, D.; DECANT, B.; GRIPPO, P. J.; RUND, L.; SCHOOK, L. "Pigs as a new weapon against cancer: modeling solid tumors in porcine," in: **Proceedings of the 107th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research**, 2016 April 16–20, New Orleans, LA, 2016

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

DYRSKJOT, L.; ZIEGER, K.; REAL, F. X.; MALATS, N.; CARRATO, A.; HURST, C.; KOTWAL, S.; KNOWLES M.; MALMSTROM, P.-U.; DE LA TORRE, M.; WESTER, K.; ALLORY, Y.; VORDOS, D.; CAILLAULT, A.; RADVANYI, F.; HEIN, A.-M. K.; JENSEN, J. L.; JENSEN K. M. E.; MARCUSSEN, N.; ORNTOFT, T. F. Gene Expression Signatures Predict Outcome in Non-Muscle-Invasive Bladder Carcinoma: A Multicenter Validation Study. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 12, p. 3545–3551, 2007.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), 2010. Guidance on M3(R2) Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm073246.pdf>, 2010.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359–E386, 2015.

FLISIKOWSKA, T.; MERKL, C.; LANDMANN, M.; ESER, S.; REZAEI, N.; CUI, X.; KUROME, M.; ZAKHARTCHENKO, V.; KESSLER, B.; WIELAND, H.; ROTTMANN,



O.; SCHMID, R. M.; SCHNEIDER, G.; KIND, A. ; WOLF, E.; SAUR, D.; SCHNIEKE, A. A porcine model of familial adenomatous polyposis. **Gastroenterology**, v. 143, n. 5, p. 1173–1175.e7, 2012.

FLISIKOWSKA, T.; KIND, A.; SCHNIEKE, A. Pigs as models of human cancers. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 433–437, 2016.

GIANNARINI, G.; BIRKHAUSER, F. D.; RECKER, F.; THALMANN, G. N.; STUDER, U. E. Bacillus Calmette-Guerin Failure in Patients with Non–Muscle- invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder May Be Due to the Urologist’s Failure to Detect Urothelial Carcinoma of the Upper Urinary Tract and Urethra. v. 65, p. 825–831, 2014.

GRAY, M. A.; POLLOCK, C. B.; SCHOOK, L. B.; SQUIRES, E. J. Characterization of porcine pregnane X receptor, farnesoid X receptor and their splice variants. **Experimental Biology and Medicine (Maywood)**, v. 235, n. 6, p. 718–736, 2010.

GROENEN, M. A.; ARCHIBALD, A. L.; UENISHI, H.; TUGGLE, C. K.; TAKEUCHI, Y.; ROTHSCHILD, M. F.; ROGEL-GAILLARD, C.; PARK, C.; MILAN, D.; MEGENS, H. J.; LI, S.; LARKIN, D. M.; KIM, H.; FRANTZ, L. A.; CACCAMO, M.; AHN, H.; AKEN, B. L.; ANSELMO, A.; ANTHON, C.; AUVIL, L.; BADAoui, B.; BEATTIE, C. W.; BENDIXEN, C.; BERMAN, D.; BLECHA, F.; BLOMBERG, J.; BOLUND, L.; BOSSE, M.; BOTTI, S.; BUJIE, Z.; BYSTROM, M.; CAPITANU, B.; CARVALHO-SILVA, D.; CHARDON, P.; CHEN, C.; CHENG, R.; CHOI, S. H.; CHOW, W.; CLARK, R. C.; CLEE, C.; CROOIJMANS, R. P.; DAWSON, H. D.; DEHAIS, P.; DE SAPIO, F.; DIBBITS, B.; DROU, N.; DU, Z. Q.; EVERSOLE, K.; FADISTA, J.; FAIRLEY, S.; FARAUT, T.; FAULKNER, G. J.; FOWLER, K. E.; FREDHOLM, M.; FRITZ, E.; GILBERT, J. G.; GIUFFRA, E.; GORODKIN, J.; GRIFFIN, D. K.; HARROW, J. L.; HAYWARD, A.; HOWE, K.; HU, Z. L.; HUMPHRAY, S. J.; HUNT, T.; HORNSHOJ, H.; JEON, J. T.; JERN, P.; JONES, M.; JURKA, J.; KANAMORI, H.; KAPETANOVIC, R.; KIM, J.; KIM, J. H.; KIM, K. W.; KIM, T. H.; LARSON, G.; LEE, K.; LEE, K. T.; LEGGETT, R.; LEWIN, H. A.; LI, Y.; LIU, W.; LOVELAND, J. E., LU, Y.; LUNNEY, J. K.; MA, J.; MADSEN, O.; MANN, K.; MATTHEWS, L.; MCLAREN, S.; MOROZUMI, T.; MURTAUGH, M. P.; NARAYAN, J.; NGUYEN, D. T.; NI, P.; OH, S. J.; ONTERU, S.; PANITZ, F.; PARK, E. W.; PARK, H. S.; PASCAL, G.; PAUDEL, Y.; PEREZ-ENCISO, M.; RAMIREZ-GONZALEZ, R.; REECY, J. M.; RODRIGUEZ-ZAS, S.; ROHRER, G. A.; RUND, L.; SANG, Y.; SCHACHTSCHNEIDER, K.; SCHRAIBER, J. G.; SCHWARTZ, J.; SCOBIE, L.; SCOTT, C.; SEARLE, S.; SERVIN, B.; SOUTHEY, B. R.; SPERBER, G.; STADLER, P.; TAFER, J. V.; TAFER, H.; THOMSEN, B.; WALI, R.; WANG, J.; WANG, J.; WHITE, S.; XU, X.; YERLE, M.; ZHANG, G.; ZHANG, J.; ZHANG, J.; ZHAO, S.; ROGERS, J.; CHURCHER, C.; SCHOOK, L. B. Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. **Nature**, v. 491, n. 7424, p. 393–398, 2012.

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

HAO, Y. H.; YONG, H. Y.; MURPHY, C. N.; WAX, D.; SAMUEL, M.; RIEKE, A.; LAI, L.; LIU, Z.; DURTSCHI, D. C.; WELBERN, V. R.; PRICE, E. M.; MCALLISTER, R. M.; TURK, J. R.; LAUGHLIN, M. H.; PRATHER, R. S.; RUCKER, E. B. Production of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) over-expressing piglets. **Transgenic Research**, v. 15, n. 6, p. 739–750, 2006.

HELKE, K. L.; SWINDLE, M. M. Animal models of toxicology testing: the role of pigs. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 9, n. 2, p. 127–139, 2013.

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

HOELDER, S.; CLARKE, P. A.; WORKMAN, P. Discovery of small molecule cancer drugs: successes, challenges and opportunities. **Molecular Oncology**, v. 6, n. 2, p. 155–176, 2012.

HUSZTHY, P. C.; DAPHU, I.; NICLOU, S. P.; STIEBER, D.; NIGRO, J. M.; SAKARIASSEN, P. O.; MILETIC, H.; THORSEN, F.; BJERKVIG, R. In vivo models of primary brain tumors: pitfalls and perspectives. **Neuro-Oncology**, v. 14, n. 8, p. 979–993, 2012.

HUTCHINSON, L.; KIRK, R. High drug attrition rates--where are we going wrong? **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 8, n. 4, p. 189–190, 2011.

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

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA), 2015. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>. Acessado em 10 de outubro de 2017.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA), 2016. Estimativa 2016, Incidência de Câncer no Brasil. Acessado em 10 de outubro de 2017. Disponível em <http://www.inca.gov.br/>

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA), 2017. Disponível em:

<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>. Acessado em 10 de outubro de 2017.

JANKOVIC, S.; RADOSAVLJEVIC, V. Risk factors for bladder cancer. **Tumori**, v. 93, n. 1, p. 4–12, 2007.

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

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

JUNOD, S. FDA and Clinical Drug Trials: A Short History. U.S. Food and Drug Administration, 2013.

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

KIM, N. W.; PIATYSZEK, M. A.; PROWSE, K. R.; HARLEY, C. B.; WEST, M. D.; HO, P. L.; COVIELLO, G. M.; WRIGHT, W. E.; WEINRICH, S. L.; SHAY, J. W. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. **Science**, v. 266, n. 5193, p. 2011–2015, 1994.

KNOWLES, M. A.; HURST, C. D. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 1, p. 25–41, 2015.

KRAGH, P. M.; NIELSEN, A. L.; LI, J.; DU, Y.; LIN, L.; SCHMIDT, M.; BOGH, I. B.; HOLM, I. E.; JAKOBSEN, J. E.; JOHANSEN, M. G.; PURUP, S.; BOLUND, L.; VAJTA, G.; JORGENSEN, A. L. Hemizygous minipigs produced by random gene insertion and handmade cloning express the Alzheimer's disease-causing dominant mutation APP<sup>sw</sup>. **Transgenic Research**, v. 18, n. 4, p. 545–558, 2009.

LEDFORD, H. Translational research: 4 ways to fix the clinical trial. **Nature**, v. 477, n. 7366, p. 526–528, 2011.

LEE, M. J.; HATTON, B. A.; VILLAVICENCIO, E. H.; KHANNA, P. C.; FRIEDMAN, S. D.; DITZLER, S.; PULLAR, B.; ROBISON, K.; WHITE, K. F.; TUNKEY, C.; LEBLANC, M.; RANDOLPH-HABECKER, J.; KNOBLAUGH, S. E.; HANSEN, S.; RICHARDS, A.; WAINWRIGHT B. J.; MCGOVERN K.; OLSON, J. M. Hedgehog pathway inhibitor saridegib (IPI-926) increases lifespan in a mouse medulloblastoma model. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 20, p. 7859–7864, 2012.

LUO, Y.; BOLUND, L.; SØRENSEN, C. B. Pig gene knockout by rAAV-mediated homologous recombination: Comparison of BRCA1 gene knockout efficiency in Yucatan and Gottingen fibroblasts with slightly different target sequences. **Transgenic Research**, v. 21, n. 3, p. 671–676, 2011.

MAK, I. W.; EVANIEW, N.; GHERT, M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. **American Journal of Translational Research**, v. 6, n. 2, p. 114–118, 2014.

MALMSTROM, P.U.; REN, Z.P.; SHERIF, A.; TORRE, M.; WESTER, K.; THORN, M. Early metastatic progression of bladder carcinoma: molecular profile of primary tumor and sentinel lymph node. **Journal of Urology**, v.168, p.2240 – 44. 2002.

MALMSTROM, P.; SYLVESTER, R. J.; CRAWFORD, D. E.; FRIEDRICH, M.; KREGE, S.; RINTALA, E.; SOLSONA, E.; DI STASI, S. M.; AND WITJES, J. A. An Individual Patient Data Meta-Analysis of the Long-Term Outcome of Randomised Studies Comparing Intravesical 5-FU for Mitomycin C versus Bacillus Calmette-Guèrre – Muscle-Invasive Bladder Cancer. **European association of urology**, v. 56, p. 247–256, 2009.

MARTIGNONI, M.; GROOTHUIS, G. M.; DE KANTER, R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 2, n. 6, p. 875–894, 2006.

MEURENS, F.; SUMMERFIELD, A.; NAUWYNCK, H.; SAIF, L.; GERDTS, V. The pig: a model for human infectious diseases. **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 50–57, 2012.

MISRA, R.; ACHARYA, S.; SAHOO, S. K. Cancer nanotechnology: Application of nanotechnology in cancer therapy. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 19–20, p. 842–850, 2010.

MIURA, K.; FUJIBUCHI, W.; ISHIDA, K.; NAITOH, T.; OGAWA, H.; ANDO, T.; YAZAKI, N.; WATANABE, K.; HANEDA, S.; SHIBATA, C.; SASAKI, I. Inhibitor of apoptosis protein family as diagnostic markers and therapeutic targets of colorectal cancer. **Surgery Today**, v. 41, n. 2, p. 175–182, 2011.

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

NCI, 2017. Disponível em: <https://www.cancer.gov/>. Acessado em 18 de dezembro de 2017. 2017.

NIELSEN, S. D.; BAUHAUS, Y.; ZAMARATSKAIA, G.; JUNQUEIRA, M. A.; BLAABJERG, K.; PETRAT-MELIN, B.; YOUNG, J. F.; RASMUSSEN, M. K. Constitutive expression and activity of cytochrome P450 in conventional pigs. **Research in Veterinary Science**, v. 111, p. 75–80, 2017.

NUNOYA, T.; SHIBUYA, K.; SAITOH, T.; YAZAWA, H.; NAKAMURA, K.; BABA, Y.; HIRAI, T. Use of miniature pig for biomedical research, with reference to toxicologic studies. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 20, n. 3, p. 125–132, 2007.

PATHAK, S.; MULTANI, A. S.; MCCONKEY, D. J.; IMAM, A. S.; AMOSS JR., M. S. Spontaneous regression of cutaneous melanoma in sinclair swine is associated with defective telomerase activity and extensive telomere erosion. **International Journal of Oncology**, v. 17, n. 6, p. 1219–1224, 2000.

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

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

PORTEN, S. P.; LEAPMAN, M. S.; GREENE, K. L. Intravesical chemotherapy in non-muscle-invasive bladder cancer. **Indian Journal of Urology**, v. 4, p. 297–303, 2015.

PRATHER, R. S. Pig genomics for biomedicine. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 122–124, 2013.

RANGARAJAN, A.; HONG, S. J.; GIFFORD, A.; WEINBERG, R. A. Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation. **Cancer Cell**, v. 6, n. 2, p. 171–183, 2004.

RENNER, S.; FEHLINGS, C.; HERBACH, N.; HOFMANN, A.; VON WALDTHAUSEN, D. C.; KESSLER, B.; ULRICHS, K.; CHODNEVSKAJA, I.; MOSKALENKO, V.; AMSELGRUBER, W.; GO, B.; PFEIFER, A. Glucose Intolerance and Reduced Proliferation of Pancreatic  $\beta$ -Cells in Transgenic Pigs With Impaired Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Function. **Cell**, v. 59, n. May, 2010.

RIES, L.; MELBERT, D.; KRAPCHO, M.; MARIOTTO, A.; MILLER, B.; FEUER, E.; CLEGG, L.; HORNER, M.; HOWLADER, N.; EISNER, M.; REICHMAN, M.; EDWARDS, B. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2004. Bethesda, MD: [s.n.]. Disponível em: <[http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2004/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2004/)>.

ROGERS, C. S.; STOLTZ, D. A. ; MEYERHOLZ, D. K.; OSTEDGAARD, L. S. ; ROKHLINA, T. ; TAFT, P. J.; ROGAN, M. P.; PEZZULO, A. A.; KARP, P. H.; ITANI, O. A.; KABEL, A. C.; WOHLFORD-LENANE, C. L.; DAVIS, G. J.; HANFLAND, R. A.; SMITH, T. L.; SAMUEL, M. ; WAX, D.; MURPHY, C. N.; RIEKE, A.; WHITWORTH, K.; UC, A.; STARNER, T. D.; BROGDEN, K. A.; SHILYANSKY, J.; MCCRAY JR., P. B.; ZABNER, J.; PRATHER, R. S.; WELSH, M. J. Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. **Science**, v. 321, n. 5897, p. 1837–1841, 2008.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. The Principles of Humane Experimental Technique. London: **Methuen & Co. Ltd.** 1959.

SAALFRANK, A.; JANSSEN, K. P.; RAVON, M.; FLISIKOWSKI, K.; ESER, S.; STEIGER, K.; FLISIKOWSKA, T.; MULLER-FLIEDNER, P.; SCHULZE, E.; BRONNER, C.; GNANN, A.; KAPPE, E.; BOHM, B.; SCHADE, B.; CERTA, U.; SAUR, D.; ESPOSITO, I.; KIND, A.; SCHNIEKE, A. A porcine model of osteosarcoma. **Oncogenesis**, v. 5, p. e210, 2016.

SANLI, O.; DOBRUCH J.; M. A. KNOWLES,; M. BURGER, Bladder cancer. **Nature**, v. 3, p. 1–19, 2017.

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

SCHACHTSCHNEIDER, K. M.; LIU, Y.; MAKELAINEN, S.; MADSEN, O.; RUND, L. A.; GROENEN, M. A. M.; SCHOOK, L. B. Oncopig Soft-Tissue Sarcomas Recapitulate Key Transcriptional Features of Human Sarcomas. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 2624, 2017a.

SCHACHTSCHNEIDER, K. M.; SCHWIND, R. M.; DARFOUR-ODURO, K. A.; DE, A. K.; RUND, L. A.; SINGH, K.; PRINCIPE, D. R.; GUZMAN, G.; RAY JR., C. E.; OZER, H.; GABA, R. C.; SCHOOK, L. B. A validated, transitional and translational porcine model of hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**, v. In Press, 2017b.

SCHOOK, L. B.; COLLARES, T. V.; DARFOUR-ODURO, K. A.; DE, A. K.; RUND, L. A.; SCHACHTSCHNEIDER, K. M.; SEIXAS, F.K. Unraveling the swine genome: implications for human health. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 3, p. 219–244, 2015.

SCHOOK, L. B.; COLLARES, T. V.; HU, W.; LIANG, Y.; RODRIGUES, F. M.; RUND, L. A.; SCHACHTSCHNEIDER, K. M.; SEIXAS, F. K.; SINGH, K.; WELLS, K. D.; WALTERS, E. M.; PRATHER, R. S.; COUNTER, C. M. A Genetic Porcine Model of Cancer. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0128864, 2015b.

SEGATTO, N. V.; REMIÃO, M. H.; SCHACHTSCHNEIDER, K. M.; SEIXAS, F. K.; SCHOOK, L. B.; COLLARES, T. The Oncopig Cancer Model as a Complementary Tool for Phenotypic Drug Discovery. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. 894, p. 1–8, 2017.

SEOK, J., WARREN, H. S., CUENCA, A. G., MINDRINOS, M. N., BAKER, H. V., XU, W., RICHARDS, D. R., MCDONALD-SMITH, G. P., GAO, H., HENNESSY, L., FINNERTY, C. C., LOPEZ, C. M., HONARI, S., MOORE, E. E., MINEI, J. P., CUSCHIERI, J., BANKEY, P. E., JOHNSON, J. L., SPERRY, J., NATHENS, A. B., BILLIAR, T. R., WEST, M. A., JESCHKE, M. G., KLEIN, M. B., GAMELLI, R. L., GIBRAN, N. S., BROWNSTEIN, B. H., MILLER-GRAZIANO, C., CALVANO, S. E., MASON, P. H., COBB, J. P., RAHME, L. G., LOWRY, S. F., MAIER, R. V., MOLDAWER, L. L., HERNDON, D. N., DAVIS, R. W., XIAO, W., TOMPKINS, R. G., INFLAMMATION; L. S. C. R. P Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 110, n. 9, p. 3507–3512, 2013.

SHARMA, S.; KSHEERSAGAR, P.; SHARMA, P. Diagnosis and Treatment of Bladder Cancer. **American Family Physician**, v. 80, n. 7, p. 717–723, 2009.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2013. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 63, n. 1, p. 11–30, 2013.

SIEREN, J. C.; MEYERHOLZ, D. K.; WANG, X. J.; DAVIS, B. T.; NEWELL JR., J. D.; HAMMOND, E.; ROHRET, J. A.; ROHRET, F. A.; STRUZYNSKI, J. T.; GOEKEN, J. A.; NAUMANN, P. W.; LEIDINGER, M. R.; TAGHIYEV, A.; VAN RHEEDEN, R.; HAGEN, J.; DARBRO, B. W.; QUELLE, D. E.; ROGERS, C. S. Development and translational imaging of a TP53 porcine tumorigenesis model. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 9, p. 4052–4066, 2014.

SLATER, S. E.; PATEL, P.; VINEY, R.; FOSTER, M.; PORFIRI, E.; JAMES, N. D.; MONTGOMERY, B.; BRYAN, R. T. The effects and effectiveness of electromotive drug administration and chemohyperthermia for treating non-muscle invasive bladder cancer. **Annals of the Royal College of Surgeons of England**, v. 96, n. 6, p. 415–419, 2014.

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

TESSMANN, J. W.; BUSS, J.; BEGNINI, K. R.; BERNEIRA, L. M.; PAULA, F. R.; DE PEREIRA, C. M. P.; COLLARES, T.; SEIXAS, F.K. Antitumor potential of 1-thiocarbamoyl-3,5-diaryl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles in human bladder cancer cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 94, p. 37–46, 2017.

THORN, H. A.; HEDELAND, M.; BONDESSON, U.; KNUTSON, L.; YASIN, M.; DICKINSON, P.; LENNERNAS, H. Different effects of ketoconazole on the stereoselective first-pass metabolism of R/S-verapamil in the intestine and the liver: important for the mechanistic understanding of first-pass drug-drug interactions. **Drug Metabolism & Disposition**, v. 37, n. 11, p. 2186–2196, 2009.

THORN, H. A.; LUNDAHL, A.; SCHRICKX, J. A.; DICKINSON, P. A.; LENNERNAS, H. Drug metabolism of CYP3A4, CYP2C9 and CYP2D6 substrates in pigs and humans. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 3, p. 89–98, 2011.

VAN MARION, D. M.; DOMANSKA, U. M.; TIMMER-BOSSCHA, H.; WALENKAMP, A. M. Studying cancer metastasis: Existing models, challenges and future perspectives. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 97, p. 107–117, 2016.

VANDAMME, T. Use of rodents as models of human diseases. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 6, n. 1, p. 2, 2014.



WAGNER, A. H. P et al. "Results from a phase 2 randomized, placebo-controlled, double blind study of the hedgehog (HH) pathway antagonist IPI-926 in patients (PTS) with advanced chondrosarcoma (CS)," in: **Proceedings of the Connective Tissue Oncology Society 18th Annual Meeting**, New York, NY. 2013.

WANG, R.; SUN, P. D. Natural killer cell-mediated shedding of ULBP2. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–12, 2014.

WILLIAMS, R. Discontinued drugs in 2012: oncology drugs. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 22, n. 12, p. 1627–1644, 2013.

WILLIAMS, R. Discontinued in 2013: oncology drugs. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 24, n. 1, p. 95–110, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. H. O. World Cancer Report. Geneva: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr27/en/>>. 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2017. Disponível em: <http://www.who.int/en/>. Acessado em 10 de dezembro de 2017. 2017.

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

ZUBER, R.; ANZENBACHEROVA, E.; ANZENBACHER, P. Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 6, n. 2, p. 189–198, 2002.

**Anexo**



# The Oncopig Cancer Model as a Complementary Tool for Phenotypic Drug Discovery

Natalia V. Segatto<sup>1</sup>, Mariana H. Remião<sup>1</sup>, Kyle M. Schachtschneider<sup>2</sup>,  
Fabiana K. Seixas<sup>1</sup>, Lawrence B. Schook<sup>2,3</sup> and Tiago Collares<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Biotechnology Graduate Program, Molecular and Cellular Oncology Research Group, Laboratory of Cancer Biotechnology, Technology Development Center, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil, <sup>2</sup> Department of Radiology, University of Illinois at Chicago, Chicago, IL, United States, <sup>3</sup> Department of Animal Sciences, University of Illinois at Urbana-Champaign, Champaign, IL, United States

## The Oncopig Cancer Model as a complementary tool for phenotypic drug discovery

Natalia V. Segatto<sup>1</sup>, Mariana H. Remião<sup>1</sup>, Kyle M. Schachtschneider<sup>2</sup>, Fabiana K. Seixas<sup>1</sup>, Lawrence B. Schook<sup>2,3</sup>, Tiago Collares<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Technology Development Center, Biotechnology Graduate Program, Laboratory of Cancer Biotechnology, Molecular and Cellular Oncology Research Group, Federal University of Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil;

<sup>2</sup> Department of Radiology, University of Illinois at Chicago, Chicago, IL, USA;

<sup>3</sup> Department of Animal Sciences, University of Illinois, Urbana, IL, USA;

### \*Correspondence:

Tiago Collares, Laboratory of Cancer Biotechnology, Federal University of Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil, [tiago.collares@ufpel.edu.br](mailto:tiago.collares@ufpel.edu.br)

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the work was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## **Abstract**

The screening of potential therapeutic compounds using phenotypic drug discovery (PDD) is being embraced once again by researchers and pharmaceutical companies as an approach to enhance the development of new effective therapeutics. Before the genomics and molecular biology era and the consecutive emergence of targeted-drug discovery approaches, PDD was the most common platform used for drug discovery. PDD, also known as phenotypic screening, consists of screening potential compounds in either *in vitro* cellular or *in vivo* animal models to identify compounds resulting in a desirable phenotypic change. Using this approach, the biological targets of the compounds are not taken into consideration. Suitable animal models are crucial for the continued validation and discovery of new drugs, as compounds displaying promising results in phenotypic *in vitro* cell-based and *in vivo* small animal model screenings often fail in clinical trials. Indeed, this is mainly a result of differential anatomy, physiology, metabolism, immunology, and genetics between humans and currently used pre-clinical small animal models. In contrast, pigs are more predictive of therapeutic treatment outcomes in humans than rodents. In addition, pigs provide an ideal platform to study cancer due to their similarities with humans at the anatomical, physiological, metabolic, and genetic levels. Here we provide a mini-review on the reemergence of PDD in drug development, highlighting the potential of porcine cancer models for improving pre-clinical drug discovery and testing. We also present precision medicine based genetically defined swine cancer models developed to date and their potential as biomedical models.

**Keywords:** PDD, animal model, swine, Oncopig cancer model, cancer

## **The return of Phenotypic Drug Discovery**

The pharmaceutical industry has increasingly invested in the research and development (R&D) of new potential drugs and has doubled these investments over the past 15 years, from \$26.0 billion in 2000 to an estimated \$58.8 billion in 2015 (PhRMA, 2016). Surprisingly, companies have produced on average less than one new drug per year since 1950, indicating that no strategy employed by pharmaceutical companies over this time period has increased their ability to discover and bring new drugs to market (Munos, 2009). Analysis of the drugs approved by the FDA between 1999 and 2008 indicates more first-in-class drugs have been approved using phenotypic screening assays than target-based approaches (Swinney and Anthony, 2011).

Phenotypic drug discovery (PDD) consists of screening potential compounds in either *in vitro* cellular (Mosmann, 1983) or *in vivo* animal models (Giacomotto and Segalat, 2010) to identify compounds resulting in a desirable phenotypic change. On the other hand, target-based drug discovery (TDD) relies on the identification of a target of interest believed to be “disease-modifying” and therefore related to a particular disease. The genomic era revolutionized the screening of new compounds *in vitro* and *in vivo* through the rise of comparative genomics, genome editing, and the consecutive emergence of TDD approaches. Even though TDD has several advantages, such as confirmation of the relevance of a target for a given disease, this approach has not effectively translated into the approval of new drugs as expected. Some researchers believe that one of the reasons for the decrease in drug discovery and innumerable failed clinical trials in the last 25 years may be due to the extensive use of TDD in the past decades (Hellerstein, 2008; Sams-Dodd, 2005, 2013). Therefore, researchers and pharmaceutical companies are once again embracing PDD as a way to improve development and screening of new effective therapeutics (Lee and Berg, 2013; Warchal et al., 2015; Zheng et al., 2013).

### **PDD in cancer drug discovery**

Oncology is a huge market for pharmaceutical industries, and has grown to be the largest therapeutic area in terms of number of projects, investments in research and development (R&D), and number of clinical trials (Arrowsmith, 2012). However, discovering and approving new efficient cancer therapies is a challenge (Hoelder et al., 2012) mainly because cancer is a highly heterogeneous disease with multiple

mechanisms of action. The hallmarks of cancer indicate that the transformation of normal cells into malignant cancer cells is a multistep process reflecting genetic alterations affecting six physiological processes. These processes include self-sufficient growth signaling, insensitivity to growth-inhibitory (antigrowth) signals, evasion of programmed cell death (apoptosis), limitless replicative potential, sustained angiogenesis, and tissue invasion and metastasis (Hanahan and Weinberg, 2000).

The majority of the cancer drugs developed in the past decades have been discovered using target-based approaches (Swinney and Anthony, 2011). This is expected, as our knowledge of the molecular basis of cancer is growing (Garraway and Lander, 2013) and as a consequence new cancer therapeutics are focused on targets known to be related to the above-mentioned multistep processes. For example, as kinases play key roles in signal transduction and regulation of a range of cellular activities, kinase inhibitors represent 21 out of the 29 approved drugs developed using TDD between 1999 and 2008 (Zhang et al., 2009; Swinney and Anthony, 2011).

It is important to highlight that when researchers focus only on known targets for drug discovery, they lose the opportunity to identify potential drugs that may have different—and new—targeted mechanisms of action. Between 1999 and 2008, 19 of the approved cancer therapeutics were discovered using some level of phenotypic screening (Swinney and Anthony, 2011). Among them are the thalidomide analogue Lenalidomide, for which the selection of second-generation analogues with anticancer activity was conducted using only phenotypic assays (Shortt et al., 2013). In addition, the observation that dimethyl sulfoxide (DMSO) caused growth arrest (Friend et al., 1971; Takase et al., 1992; Teraoka et al., 1996) and terminal differentiation of transformed cells (Friend et al., 1971) led researchers to test other polar, small-molecule solvent species for antitumor activity, resulting in the discovery of the histone deacetylase inhibitor Vorinostat (Marks and Breslow, 2007). Furthermore, Romidepsin, an anticancer agent approved for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma was identified through phenotypic screening of microbial metabolites in tumor cell lines (Ueda et al., 1994).

In general, PDD remains a crucial approach in selecting, validating, and developing potential cancer drugs, even though it represents a minority of the investigational and recently approved oncology treatments (Moffat et al., 2014). PDD

screening is only the first step in the long and expensive journey of drug discovery. The next stage, represented by animal experimentation in pre-clinical trials, must validate the promising results obtained in the initial screening. Therefore, both steps are complementary and equally important.

### **Importance of animal models in drug discovery**

Animal models are essential tools in the drug development process. Due to ethical and regulatory issues, it is necessary to test new biomedical products in animal models during the pre-clinical phase before initiating human experimentation to evaluate efficacy, toxicity, and safety. However, many drugs that display promising results in pre-clinical animal studies do not produce the same response in humans (Mak et al., 2014). This is especially true for oncology due to difficulties in mirroring the heterogeneity and complex tumor characteristics in animal models (Huszthy et al., 2012; van Marion et al., 2016). Disregarding the approach used for drug discovery (TDD or PDD), there are several examples of candidate therapeutics failing in clinical trials even though they showed promising results in previous phases of drug development (Williams, 2013, 2015). In fact, about 85% of therapies tested in clinical trials fail (Ledford, 2011), with cancer therapeutics representing the largest proportion of these failures (Arrowsmith, 2011). Only 5% of agents that demonstrate anticancer activity in preclinical phases are approved after demonstrating sufficient efficacy in phase III testing (Hutchinson and Kirk, 2011).

One of the key takeaways from these failures is the need for improvements in the early steps of drug discovery, specifically in the use of adequate animal models in pre-clinical trials. Suitable animal models are crucial for the continued validation and discovery of new drugs, as compounds displaying promising results in phenotypic *in vitro* cell-based and *in vivo* small animal model screenings often fail in clinical trials.

Rodents are the most widely used platform for tumor pre-clinical screening and biological models in general. Some of their characteristics, such as small size, inexpensiveness, well-known genetics, and their ability to be easily genetically modified make them a standard tool for evaluating novel therapeutics. However, they are actually poor models for many human diseases (Burns et al., 2015; Seok et al., 2013), including cancer (de Jong and Maina, 2010). Consequently, difficulties translating the results obtained in pre-clinical studies to the clinical realm are quite common when rodents are chosen as the biological model. One example is the

phase II clinical trial of IPI-926 (Saridegib) in patients with advanced chondrosarcoma. The trial was stopped early because no relevant effects were observed in humans treated with Saridegib compared to the placebo group (Wagner et al., 2013), even though medulloblastoma mice models treated with IPI-926 demonstrated a fivefold increase in survival (Lee et al., 2012). This work demonstrates the need for more relevant animal models as complementary tools for cancer drug discovery.

Even though genetically engineered mouse models are important tools for studying mechanisms associated with cancer biology (Jeong, 2016; Jiang and Yu, 2017; Perez-Guijarro et al., 2017) and represent improved models compared to wild mice models, they still have several limitations. We believe that the use of a suitable large animal model of cancer would improve the results of PDD for cancer therapeutics.

### **Pigs as biological models**

Pigs have proven to be more predictive of therapeutic treatments in humans than rodents (Meurens et al., 2012; Schook et al., 2015a). Pigs provide an ideal platform to study cancer due to their similarities with humans at the anatomical, physiological, metabolic, and genetic levels (Table 1). The pig genome sequence was published in 2012, providing insights into their genetic similarities to humans (Groenen et al., 2012) and furthering their acceptance as a large animal biomedical model for human diseases (Prather, 2013; Schook et al., 2015a). In addition to the high homology between the pig and human genome, the swine genome also exhibits highly conserved epigenetic regulation demonstrated by the similar genome wide DNA methylation patterns observed between pigs and humans (Schachtschneider et al., 2015). Regarding their cancer genetics, a previous study using genetically engineered porcine cells showed that swine cells could be transformed by mutated oncogenes and tumor suppressor genes commonly found in human cancers (Adam et al., 2007). Furthermore, these transformed cells were able to form tumors following autologous injection (Adam et al., 2007). Also, normal murine cells can be transformed with fewer mutations (Rangarajan et al., 2004) compared to swine and human cells (Adam et al., 2007; Rangarajan et al., 2004). Together, this work demonstrates that porcine tumorigenic pathways are more similar to human pathways than rodents (table 1).



Pigs provide an ideal large animal model for preclinical drug screening due to their metabolic similarities with humans. For instance, pigs have proven to be a suitable model for CYP3A-related drug metabolism. Cytochromes P450 enzymes (CYP) are known for their role in compound metabolism, and the CYP3A subfamily is responsible for metabolizing more than half of all drugs available on the market (Zuber et al., 2002). The swine xenosensor pregnane C receptors also displays high homology to the ones found in humans (Gray et al., 2010; Pollock et al., 2007). In addition, the CYP family receptors and enzymes display similar expression levels in pigs and humans (Nielsen et al., 2017). On the other hand, some rodents (e.g. rats) are not considered good models for CYP3A4 related metabolism due to the dissimilarities with humans in metabolism related to this enzyme, resulting in differential therapeutic metabolization (Martignoni et al., 2006). In contrast, swine models can and have been very useful for pharmacology and toxicology studies (Thorn et al., 2009, 2011).

Another beneficial feature of pigs that makes them a relevant biological model is the fact that they can live up to 10 years. For purposes of cancer drug development, this is especially relevant because it allows for therapeutic testing and posterior monitoring in a pre-clinical platform able to mimic multiple stages of tumor development, progression, invasion, and metastasis, thereby enabling the evaluation of the long-term effects of a variety of compounds. In addition, the large size of the pig is ideal not only for administration of therapeutics in the same manner as in human patients (table 1), but also for the collection of larger volumes of bodily fluids (Helke and Swindle, 2013), allowing blood collection procedures to mirror those performed in humans. We thus hypothesize that the pig's implementation as an ideal biomedical model for drug discovery could help fill the existing gap between early phenotypic screening of potential new therapeutics, identification of prognostic biomarkers, and testing of beneficial products and devices in human clinical patients.

Genetic engineering allows for the development of transgenic porcine models that recapitulate particular genetic alterations found in human diseases for translational biomedical research purposes. These models can be obtained using several techniques such as microinjection of DNA into the pronuclei of fertilized oocytes, lentiviral transgenesis (LVGT), sperm mediated gene transfer (SMGT), and somatic cell nuclear transfer (SCNT) using genetically modified nuclear donor cells (Aigner et al., 2010). Currently, transgenic pigs are increasingly being accepted as large animal

models for several human diseases (Aigner et al., 2010), including neurodegenerative diseases (Kragh et al., 2009), cystic fibrosis (Rogers et al., 2008), cardiovascular diseases (Hao et al., 2006), diabetes mellitus (Renner et al., 2010), and cancer (Schook et al., 2015b; Flisikowska et al., 2012).

### **Genetically defined swine models of cancer**

The advancement of genetic engineering techniques combined with knowledge of the pig genome sequence and its similarity to humans (Groenen et al., 2012) make genetic engineering a powerful tool for developing suitable transgenic porcine biological models for cancer drug discovery (Schook et al., 2016).

With the aim of producing a genetically defined porcine cancer model, Schook and collaborators developed the Oncopig Cancer Model (OCM), which contains Cre recombinase inducible mutated tumor suppressor and oncogene transgenes ( $TP53^{R167H}$  and  $KRAS^{G12D}$ , respectively). Exposure to adenoviral vectors encoding Cre recombinase (AdCre) results in cellular transformation in a temporal and spatial manner that closely mimics the spontaneous tumor formation that occurs in humans (Schook et al., 2015b). The intramuscular injection of AdCre into the OCM results in the development of soft-tissue sarcomas (STS) that display pathological characteristics of human leiomyosarcomas (Schook et al., 2015b). Furthermore, transcriptional profiling of Oncopig STS cell lines and tumors indicates Oncopig STS exhibits altered TP53 signaling, Wnt signaling activation, and signs of epigenetic reprogramming, all of which represent transcriptional hallmarks of human STS (Schachtschneider et al., 2017a). In addition, the transcriptional regulator FOSL1, which was previously identified as a potential human STS therapeutic target, was identified as a master regulator of Oncopig STS (Schachtschneider et al., 2017a).

Two other cancer types have been developed to date in the OCM: hepatocellular carcinoma (HCC) and pancreatic cancer. By isolating and transforming Oncopig hepatocytes via exposure to AdCre *in vitro*, researchers were able to develop Oncopig HCC cell lines expressing  $TP53^{R167H}$  and  $KRAS^{G12D}$  (Schachtschneider et al., 2017b). These cells display histopathological characteristics similar to human HCC and form tumors upon autologous injection into Oncopigs. Furthermore, human HCC transcriptional hallmarks were also observed in Oncopig HCC cells along with conserved gene expression profiles compared to human HCC cell lines (Schachtschneider et al., 2017b). The Oncopig pancreatic ductal adenocarcinoma

(PDAC) model is still in development. However, the two most predominant pancreatic cancer histotypes (exocrine and neuroendocrine) have already been developed in this PDAC model via delivery of AdCre into the main pancreatic duct (Diaz et al., 2016).

In a recently published article, Schachtschneider *et al.* (2017) presented multiple applications of the OCM as an innovative large animal translational oncology platform, ranging from the above-mentioned potential for therapeutic screening and development to its use for developing diagnostic imaging modalities. It also highlights the numerous advantages that swine models have over other commonly used biological models (Schachtschneider et al., 2017c), indicating large animal platforms can serve as predictable models of human therapeutic responses using PDD approaches (figure 1).

Regarding the ethical responsibilities of conducting animal experiments (Perry, 2007) and the three R's paradigm (Reduce, Replace, and Refine) (Russell and Burch, 1959), the OCM provides an ideal platform capable of discretely inducing localized tumors that can be closely monitored to meet scientific goals while still minimizing the animal's comorbidities and mortality.

In addition to the OCM, other transgenic swine cancer models have been developed. They include the human familial adenomatous polyposis model in which the *APC* gene was inactivated by introduction of a premature termination codon through electroporation of linearized vector DNA into mesenchymal stem cells followed by SCNT. The animals carrying the *APC*<sup>1311</sup> mutation develop polyps in the colon and rectum after one year (Flisikowska et al., 2012). In addition, two models utilizing *TP53* mutations have been developed: a genetically modified pig expressing mutant *TP53*<sup>R167H</sup>, which develops lymphomas and osteogenic tumors in homozygous individuals (Sieren et al., 2014), and *TP53* knockout pigs that develop spontaneous osteosarcomas in older heterozygous animals and multiple large osteosarcomas in 7 to 8-month-old homozygous pigs (Saalfrank et al., 2016). More recently, a genetic model of intestinal cancer was developed using a Flp-recombinase inducible oncogene cassette containing *KRAS*<sup>G12D</sup>, *cMYC*, and *SV40LT* in addition to a 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) activator cassette controlled by an intestinal epithelium tissue-specific promoter. Activation of the oncogene cassette *in vivo* resulted in a duodenal neuroendocrine carcinoma with a lymph node metastasis in the minipig (Callesen et al., 2017). Finally, an attempt to develop a breast cancer

model was performed using a recombinant adeno-associated virus (rAAV) mediated *BRCA1* knockout. Unfortunately, these animals died before they were able to demonstrate any relevant phenotypic changes (Luo et al., 2011).

### **Future approaches**

We believe the use of porcine models in pre-clinical trials will increase the benefits of PDD. More punctually, the OCM could fulfill the needs of the pharmaceutical industry and academic researchers by providing a model more predictable of therapeutic responses in humans. These higher genetically defined swine cancer models have huge potential to serve as biomedical models in preclinical trials. Since the International Committee on Harmonization requires toxicity testing in two relevant animal species (FDA, 2010), these models can serve as translational models by testing the efficacy of new therapies that show promising results in small animal PDD screenings before moving to human clinical trials, ultimately decreasing the failure rates of clinical trials (figure 1). In fact, although swine models are more expensive than rodents (table 1), the use of pigs as a second animal model in pre-clinical trials is cheaper than using non-human primates. It can also provide a cost reduction in drug discovery by confirming the trial results before initiating a highly costly human clinical trial.

Furthermore, we hypothesize that intravesical injection of AdCre in the OCM platform could result in tumor formation in the bladder (figure 1); resulting in a highly valuable bladder cancer model in which new compounds and immunotherapies such as recombinant BCG (a promising immunotherapeutic approach for bladder cancer (Begnini et al., 2015) could be tested. Our research group has tested the antitumoral activity of several compounds in bladder cancer cells lines using PDD approaches, including Brazilian red propolis (Begnini et al., 2014) and pyrazoline derivatives (Tessmann et al., 2017). A suitable animal model platform such as the OCM would further advance *in vivo* testing of the most promising compounds selected in these previous studies. To this end, we are currently evaluating the ability of OCM cells to mimic human bladder cancer cell line responses to commercially available therapeutics *in vitro*. We believe that this work will confirm the important role that the OCM can play in PDD of cancer drugs.

## References

- Adam, S. J., Rund, L. A., Kuzmuk, K. N., Zachary, J. F., Schook, L. B., and Counter, C. M. (2007). Genetic induction of tumorigenesis in swine. *Oncogene* 26, 1038–1045. doi:10.1038/sj.onc.1209892.
- Aigner, B., Renner, S., Kessler, B., Klymiuk, N., Kurome, M., Wunsch, A., et al. (2010). Transgenic pigs as models for translational biomedical research. *J Mol Med* 88, 653–664. doi:10.1007/s00109-010-0610-9.
- Arrowsmith, J. (2011). Trial watch: phase III and submission failures: 2007-2010. *Nat Rev Drug Discov* 10, 87. doi:10.1038/nrd3375.
- Arrowsmith, J. (2012). A decade of change. *Nat Rev Drug Discov* 11, 17–18. doi:10.1038/nrd3630.
- Begnini, K. R., Buss, J. H., Collares, T., and Seixas, F. K. (2015). Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG for immunotherapy in nonmuscle invasive bladder cancer. *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 3741–3754. doi:10.1007/s00253-015-6495-3.
- Begnini, K. R., Moura de Leon, P. M., Thurow, H., Schultze, E., Campos, V. F., Martins Rodrigues, F., et al. (2014). Brazilian red propolis induces apoptosis-like cell death and decreases migration potential in bladder cancer cells. *Evid Based Complement Altern. Med* 2014, 639856. doi:10.1155/2014/639856.
- Burkina, V., Rasmussen, M. K., Pilipenko, N., and Zamaratskaia, G. (2017). Comparison of xenobiotic-metabolising human, porcine, rodent, and piscine cytochrome P450. *Toxicology* 375, 10–27. doi:10.1016/j.tox.2016.11.014.
- Burns, T. C., Li, M. D., Mehta, S., Awad, A. J., and Morgan, A. A. (2015). Mouse models rarely mimic the transcriptome of human neurodegenerative diseases: A systematic bioinformatics-based critique of preclinical models. *Eur J Pharmacol* 759, 101–117. doi:10.1016/j.ejphar.2015.03.021.
- Callesen, M. M., Árnadóttir, S. S., Lyskjaer, I., Ørntoft, M.-B. W., Høyer, S., Dagnaes-Hansen, F., et al. (2017). A genetically inducible porcine model of intestinal cancer. *Mol. Oncol.*, 0–1. doi:10.1002/1878-0261.12136.
- Callesen, M. M., Árnadóttir, S. S., Lyskjaer, I., Ørntoft, M.-B. W., Høyer, S., Dagnaes-Hansen, F., et al. (2017). A genetically inducible porcine model of intestinal cancer. *Mol. Oncol.*, 0–1. doi:10.1002/1878-0261.12136.
- de Jong, M., and Maina, T. (2010). Of mice and humans: are they the same?--

- Implications in cancer translational research. *J Nucl Med* 51, 501–504.  
doi:10.2967/jnumed.109.065706.
- Chadeneau, C., Siegel, P., Harley, C. B., Muller, W. J., and Bacchetti, S. (1995). Telomerase activity in normal and malignant murine tissues. *Oncogene* 11, 893–898. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7675448>.
- Diaz, A., Principe, D., DeCant, B., Grippo, P. J., Rund, L., Schook, L. (2016). Pigs as a new weapon against cancer: Modeling solid tumors in porcine. Anstract retrieved from Abstracts in Proceedings of the 107th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2016 Apr 16-20; New Orleans, LA. Philadelphia (PA): AACR; *Cancer Res* 2016;76(14 Suppl) (Abstract No 4178)
- Donato, M. T., Castell, J. V, and Gomez-Lechon, M. J. (1999). Characterization of drug metabolizing activities in pig hepatocytes for use in bioartificial liver devices: comparison with other hepatic cellular models. *J Hepatol* 31, 542–549. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10488716>.
- Flisikowska, T., Merkl, C., Landmann, M., Eser, S., Rezaei, N., Cui, X., et al. (2012). A porcine model of familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 143, 1173–1177.  
doi:10.1053/j.gastro.2012.07.110.
- Food and Drug Administration (FDA). (2010). Guidance on M3(R2) Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals. *In: International Conference on Harmonisation* 75, 1-25. Available at: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm073246.pdf>
- Friend, C., Scher, W., Holland, J. G., and Sato, T. (1971). Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cells in vitro: stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 378–382. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5277089>.
- Garraway, L. A., and Lander, E. S. (2013). Lessons from the cancer genome. *Cell* 153, 17–37. doi:10.1016/j.cell.2013.03.002.
- Giacomotto, J., and Segalat, L. (2010). High-throughput screening and small animal models, where are we? *Br J Pharmacol* 160, 204–216. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00725.x.
- Gray, M. A., Pollock, C. B., Schook, L. B., and Squires, E. J. (2010). Characterization of porcine pregnane X receptor, farnesoid X receptor and their splice variants. *Exp Biol Med* 235, 718–736. doi:10.1258/ebm.2010.009339.

- Groenen, M. A., Archibald, A. L., Uenishi, H., Tuggle, C. K., Takeuchi, Y., Rothschild, M. F., et al. (2012). Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature* 491, 393–398. doi:10.1038/nature11622.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931>.
- Hao, Y. H., Yong, H. Y., Murphy, C. N., Wax, D., Samuel, M., Rieke, A., et al. (2006). Production of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) over-expressing piglets. *Transgenic Res* 15, 739–750. doi:10.1007/s11248-006-9020-8.
- Helke, K. L., and Swindle, M. M. (2013). Animal models of toxicology testing: the role of pigs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 9, 127–139. doi:10.1517/17425255.2013.739607.
- Hellerstein, M. K. (2008). A critique of the molecular target-based drug discovery paradigm based on principles of metabolic control: advantages of pathway-based discovery. *Metab Eng* 10, 1–9. doi:10.1016/j.ymben.2007.09.003.
- Hoelder, S., Clarke, P. A., and Workman, P. (2012). Discovery of small molecule cancer drugs: successes, challenges and opportunities. *Mol Oncol* 6, 155–176. doi:10.1016/j.molonc.2012.02.004.
- Huszthy, P. C., Daphu, I., Niclou, S. P., Stieber, D., Nigro, J. M., Sakariassen, P. O., et al. (2012). In vivo models of primary brain tumors: pitfalls and perspectives. *Neuro Oncol* 14, 979–993. doi:10.1093/neuonc/nos135.
- Hutchinson, L., and Kirk, R. (2011). High drug attrition rates--where are we going wrong? *Nat Rev Clin Oncol* 8, 189–190. doi:10.1038/nrclinonc.2011.34.
- Jeong, J. H. (2016). Inducible Mouse Models for Cancer Drug Target Validation. *J Cancer Prev* 21, 243–248. doi:10.15430/JCP.2016.21.4.243.
- Jiang, Y., and Yu, Y. (2017). Transgenic and gene knockout mice in gastric cancer research. *Oncotarget* 8, 3696–3710. doi:10.18632/oncotarget.12467.
- Kim, N. W., Piatyszek, M. a, Prowse, K. R., Harley, C. B., West, D., Ho, P. L. C., et al. (1994). Specific Association of Human Telomerase Activity with Immortal Cells and Cancer. *Science* (80-. ). 266, 2011–2015. doi:10.1126/science.7605428.
- Kragh, P. M., Nielsen, A. L., Li, J., Du, Y., Lin, L., Schmidt, M., et al. (2009). Hemizygous minipigs produced by random gene insertion and handmade cloning express the Alzheimer's disease-causing dominant mutation APPsw. *Transgenic Res* 18, 545–558. doi:10.1007/s11248-009-9245-4.

- Ledford, H. (2011). Translational research: 4 ways to fix the clinical trial. *Nature* 477, 526–528. doi:10.1038/477526a.
- Lee, J. A., and Berg, E. L. (2013). Neoclassic drug discovery: the case for lead generation using phenotypic and functional approaches. *J Biomol Screen* 18, 1143–1155. doi:10.1177/1087057113506118.
- Lee, M. J., Hatton, B. A., Villavicencio, E. H., Khanna, P. C., Friedman, S. D., Ditzler, S., et al. (2012). Hedgehog pathway inhibitor saridegib (IPI-926) increases lifespan in a mouse medulloblastoma model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 7859–7864. doi:10.1073/pnas.1114718109.
- Luo, Y., Li, J., Liu, Y., Lin, L., Du, Y., Li, S., et al. (2011). High efficiency of BRCA1 knockout using rAAV-mediated gene targeting: developing a pig model for breast cancer. *Transgenic Res* 20, 975–988. doi:10.1007/s11248-010-9472-8.
- Mak, I. W., Evaniew, N., and Ghert, M. (2014). Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am J Transl Res* 6, 114–118. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24489990>.
- Marks, P. A., and Breslow, R. (2007). Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nat Biotechnol* 25, 84–90. doi:10.1038/nbt1272.
- Martignoni, M., Groothuis, G. M., and de Kanter, R. (2006). Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2, 875–894. doi:10.1517/17425255.2.6.875.
- Meurens, F., Summerfield, A., Nauwynck, H., Saif, L., and Gerdtts, V. (2012). The pig: a model for human infectious diseases. *Trends Microbiol* 20, 50–57. doi:10.1016/j.tim.2011.11.002.
- Moffat, J. G., Rudolph, J., and Bailey, D. (2014). Phenotypic screening in cancer drug discovery - past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* 13, 588–602. doi:10.1038/nrd4366.
- Morton, D. B., Jennings, M., Buckwell, A., Ewbank, R., Godfrey, C., Holgate, B., et al. (2001). Refining procedures for the administration of substances. Report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. British Veterinary Association Animal Welfare Foundation/Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments/Royal So. *Lab Anim* 35, 1–41. doi:10.1258/0023677011911345.



- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55–63. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682>.
- Munos, B. (2009). Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. *Nat Rev Drug Discov* 8, 959–968. doi:10.1038/nrd2961.
- Nielsen, S. D., Bauhaus, Y., Zamaratskaia, G., Junqueira, M. A., Blaabjerg, K., Petrat-Melin, B., et al. (2017). Constitutive expression and activity of cytochrome P450 in conventional pigs. *Res Vet Sci* 111, 75–80. doi:10.1016/j.rvsc.2016.12.003.
- Pathak, S., Multani, A. S., McConkey, D. J., Imam, A. S., and Amoss Jr., M. S. (2000). Spontaneous regression of cutaneous melanoma in sinclair swine is associated with defective telomerase activity and extensive telomere erosion. *Int J Oncol* 17, 1219–1224. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11078808>.
- PhRMA. Pharmaceutical Industry Profile 2016. (2016). PhRMA website [online] < <http://phrma-docs.phrma.org/sites/default/files/pdf/biopharmaceutical-industry-profile.pdf>>.
- Perez-Guijarro, E., Day, C. P., Merlino, G., and Zaidi, M. R. (2017). Genetically engineered mouse models of melanoma. *Cancer* 123, 2089–2103. doi:10.1002/cncr.30684.
- Perry P. (2007). The ethics of animal research: a UK perspective. *ILAR J* 48, 42–46. doi:10.1093/ilar.48.1.42
- Pollock, C. B., Rogatcheva, M. B., and Schook, L. B. (2007). Comparative genomics of xenobiotic metabolism: a porcine-human PXR gene comparison. *Mamm Genome* 18, 210–219. doi:10.1007/s00335-007-9007-7.
- Prather, R. S. (2013). Pig genomics for biomedicine. *Nat Biotechnol* 31, 122–124. doi:10.1038/nbt.2490.
- Puccinelli, E., Gervasi, P. G., and Longo, V. (2011). Xenobiotic metabolizing cytochrome P450 in pig, a promising animal model. *Curr Drug Metab* 12, 507–525. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21476973>.
- Rangarajan, A., Hong, S. J., Gifford, A., and Weinberg, R. A. (2004). Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation. *Cancer Cell* 6, 171–183. doi:10.1016/j.ccr.2004.07.009.
- Renaud, H. J., Cui, J. Y., Khan, M., and Klaassen, C. D. (2011). Tissue distribution and gender-divergent expression of 78 cytochrome P450 mRNAs in mice.

- Toxicol Sci* 124, 261–277. doi:10.1093/toxsci/kfr240.
- Renner, S., Fehlings, C., Herbach, N., Hofmann, A., von Waldthausen, D. C., Kessler, B., et al. (2010). Glucose intolerance and reduced proliferation of pancreatic beta-cells in transgenic pigs with impaired glucose-dependent insulinotropic polypeptide function. *Diabetes* 59, 1228–1238. doi:10.2337/db09-0519.
- Rogers, C. S., Stoltz, D. A., Meyerholz, D. K., Ostedgaard, L. S., Rokhlina, T., Taft, P. J., et al. (2008). Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science* (80- ). 321, 1837–1841. doi:10.1126/science.1163600.
- Russell WMS, Burch RL. (1959). The Principles of Humane Experimental Technique. *In: Russell WMS, Burch RL, editors.* London: Methuen & Co. Ltd. Saalfrank, A., Janssen, K. P., Ravon, M., Flisikowski, K., Eser, S., Steiger, K., et al. (2016). A porcine model of osteosarcoma. *Oncogenesis* 5, e210. doi:10.1038/oncsis.2016.19.
- Sams-Dodd, F. (2005). Target-based drug discovery: is something wrong? *Drug Discov Today* 10, 139–147. doi:10.1016/S1359-6446(04)03316-1.
- Sams-Dodd, F. (2013). Is poor research the cause of the declining productivity of the pharmaceutical industry? An industry in need of a paradigm shift. *Drug Discov Today* 18, 211–217. doi:10.1016/j.drudis.2012.10.010.
- Schachtschneider, K. M., Liu, Y., Makelainen, S., Madsen, O., Rund, L. A., Groenen, M. A. M., et al. (2017a). Oncopig Soft-Tissue Sarcomas Recapitulate Key Transcriptional Features of Human Sarcomas. *Sci Rep* 7, 2624. doi:10.1038/s41598-017-02912-9.
- Schachtschneider, K. M., Madsen, O., Park, C., Rund, L. A., Groenen, M. A., and Schook, L. B. (2015). Adult porcine genome-wide DNA methylation patterns support pigs as a biomedical model. *BMC Genomics* 16, 743. doi:10.1186/s12864-015-1938-x.
- Schachtschneider, K. M., Schwind, R. M., Darfour-Oduro, K. A., De, A. K., Rund, L. A., Singh, K., et al. (2017b). A validated, transitional and translational porcine model of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 8, 63620-63634. doi:10.18632/oncotarget.18872.
- Schachtschneider, K. M., Schwind, R. M., Newson, J., Kinachtchouk, N., Rizko, M., Mendoza-Elias, N., et al. (2017c). The Oncopig Cancer Model: An Innovative

- Large Animal Translational Oncology Platform. *Front Oncol* 7, 190. doi:10.3389/fonc.2017.00190.
- Schook, L. B., Collares, T. V, Darfour-Oduro, K. A., De, A. K., Rund, L. A., Schachtschneider, K. M., et al. (2015a). Unraveling the swine genome: implications for human health. *Annu Rev Anim Biosci* 3, 219–244. doi:10.1146/annurev-animal-022114-110815.
- Schook, L. B., Collares, T. V, Hu, W., Liang, Y., Rodrigues, F. M., Rund, L. A., et al. (2015b). A Genetic Porcine Model of Cancer. *PLoS One* 10, e0128864. doi:10.1371/journal.pone.0128864.
- Schook, L. B., Rund, L., Beghini, K. R., Remiao, M. H., Seixas, F. K., and Collares, T. (2016). Emerging Technologies to Create Inducible and Genetically Defined Porcine Cancer Models. *Front Genet* 7, 28. doi:10.3389/fgene.2016.00028.
- Seok, J., Warren, H. S., Cuenca, A. G., Mindrinos, M. N., Baker, H. V, Xu, W., et al. (2013). Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 3507–3512. doi:10.1073/pnas.1222878110.
- Shortt, J., Hsu, A. K., and Johnstone, R. W. (2013). Thalidomide-analogue biology: immunological, molecular and epigenetic targets in cancer therapy. *Oncogene* 32, 4191–4202. doi:10.1038/onc.2012.599.
- Sieren, J. C., Meyerholz, D. K., Wang, X. J., Davis, B. T., Newell Jr., J. D., Hammond, E., et al. (2014). Development and translational imaging of a TP53 porcine tumorigenesis model. *J Clin Invest* 124, 4052–4066. doi:10.1172/JCI75447.
- Snawder, J. E., and Lipscomb, J. C. (2000). Interindividual variance of cytochrome P450 forms in human hepatic microsomes: correlation of individual forms with xenobiotic metabolism and implications in risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol* 32, 200–209. doi:10.1006/rtph.2000.1424.
- Swinney, D. C., and Anthony, J. (2011). How were new medicines discovered? *Nat Rev Drug Discov* 10, 507–519. doi:10.1038/nrd3480.
- Takase, K., Sawai, M., Yamamoto, K., Yata, J., Takasaki, Y., Teraoka, H., et al. (1992). Reversible G1 arrest induced by dimethyl sulfoxide in human lymphoid cell lines: kinetics of the arrest and expression of the cell cycle marker proliferating cell nuclear antigen in Raji cells. *Cell Growth Differ* 3, 515–521. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1356417>.

- Teraoka, H., Mikoshiba, M., Takase, K., Yamamoto, K., and Tsukada, K. (1996). Reversible G1 arrest induced by dimethyl sulfoxide in human lymphoid cell lines: dimethyl sulfoxide inhibits IL-6-induced differentiation of SKW6-CL4 into IgM-secreting plasma cells. *Exp Cell Res* 222, 218–224. doi:10.1006/excr.1996.0027.
- Tessmann, J. W., Buss, J., Begnini, K. R., Berneira, L. M., Paula, F. R., de Pereira, C. M. P., et al. (2017). Antitumor potential of 1-thiocarbamoyl-3,5-diaryl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles in human bladder cancer cells. *Biomed Pharmacother* 94, 37–46. doi:10.1016/j.biopha.2017.07.060.
- Thorn, H. A., Hedeland, M., Bondesson, U., Knutson, L., Yasin, M., Dickinson, P., et al. (2009). Different effects of ketoconazole on the stereoselective first-pass metabolism of R/S-verapamil in the intestine and the liver: important for the mechanistic understanding of first-pass drug-drug interactions. *Drug Metab Dispos* 37, 2186–2196. doi:10.1124/dmd.109.028027.
- Thorn, H. A., Lundahl, A., Schrickx, J. A., Dickinson, P. A., and Lennernas, H. (2011). Drug metabolism of CYP3A4, CYP2C9 and CYP2D6 substrates in pigs and humans. *Eur J Pharm Sci* 43, 89–98. doi:10.1016/j.ejps.2011.03.008.
- Ueda, H., Manda, T., Matsumoto, S., Mukumoto, S., Nishigaki, F., Kawamura, I., et al. (1994). FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum* No. 968. III. Antitumor activities on experimental tumors in mice. *J Antibiot* 47, 315–323. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8175484>.
- van Marion, D. M., Domanska, U. M., Timmer-Bosscha, H., and Walenkamp, A. M. (2016). Studying cancer metastasis: Existing models, challenges and future perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol* 97, 107–117. doi:10.1016/j.critrevonc.2015.08.009.
- Wagner, A.H.P, Okuno, S., Eriksson, M., Shreyaskumar, P., Ferrari, S., Casali, P., Chawla, S., Woehr, M., Ross, R., O’Keeffe, J., Hillock, A., Demetri, G., Reichardt, P. (2013). Results from a phase 2 randomized, placebo-controlled, double blind study of the hedgehog (HH) pathway antagonist IPI-926 in patients (PTS) with advanced chondrosarcoma (CS). In: Connective Tissue Oncology Society 18th Annual Meeting. New York, NY.
- Warchal, S. J., Unciti-Broceta, A., and Carragher, N. O. (2015). Next-generation phenotypic screening. *Future Med. Chem.* 7, 2131–2141.

doi:10.1017/CBO9781107415324.004.

Williams, R. (2013). Discontinued drugs in 2012: oncology drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 22, 1627–1644. doi:10.1517/13543784.2013.847088.

Williams, R. (2015). Discontinued in 2013: oncology drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 24, 95–110. doi:10.1517/13543784.2015.971154.

Zhang, J., Yang, P. L., and Gray, N. S. (2009). Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer* 9, 28–39. doi:10.1038/nrc2559.

Zheng, W., Thorne, N., and McKew, J. C. (2013). Phenotypic screens as a renewed approach for drug discovery. *Drug Discov Today* 18, 1067–1073. doi:10.1016/j.drudis.2013.07.001.

Zuber, R., Anzenbacherova, E., and Anzenbacher, P. (2002). Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J Cell Mol Med* 6, 189–198. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12169204>.

Table 1. Characteristics of murine and swine pre-clinical trial cancer models compared to humans.

	<b>Murine</b>	<b>Humans</b>	<b>Swine</b>
<b>Size</b>	Small (around 3000 times smaller than humans). Mouse average weight: 20 g.	Large. Human average weight: 62 kg	Large. Minipig average weight: 40 kg
<b>Metabolism (total Cyp450 content)</b>	Two-fold higher compared to humans (Donato et al., 1999)	Approximately 300–450 pmol/ mg protein (Snawder and Lipscomb, 2000)	Comparable to humans (approx. 300–450 pmol/ mg protein) (Burkina et al., 2017; Snawder and Lipscomb, 2000)
<b>Metabolism (Cyp3A4)</b>	Mouse Cyp3a11, Cyp3a16, Cyp3a41a, Cyp3a41b, and Cyp3a44 are less than 80% homologous to the human CYP3A4 nucleotide sequence (Renaud et al., 2011)	N/A	Pig CYP3A22, CYP3A29, CYP3A39, and CYP3A46 are more than 80% homologous to the human CYP3A4 nucleotide sequence (Puccinelli et al., 2011)
<b>Cancer Genetics</b>	Telomerase activity is found in several mouse tissues (Chadeneau et al., 1995);	Telomerase expression is suppressed in most tissues (Kim et al., 1994);	Telomerase expression is suppressed in most tissues (Pathak et al., 2000);
<b>Drug Administration</b>	Routes include oral, intravenous (i.v.), intraperitoneal (i.p.), intramuscular, intradermal, and intranasal, all of which require smaller volumes compared to	Routes include oral, i.v., i.p., by inhalation, subcutaneous, intramuscular, epidural, dermal absorption, and transmucosal	Routes include oral, i.v., i.p., by inhalation, subcutaneous, intramuscular, epidural, dermal absorption, and transmucosal - same routes and volumes

	humans (Morton et al., 2001)		as humans
<b>Costs (\$ per animal)</b>	Mutant/genetically modified mice: +- \$50-\$200; Wild-type mice: +- \$75	N/A	Genetically modified swine: +- \$ 1,725; Wild-type swine: +- \$575
<b>Model development time</b>	Months	N/A	Months

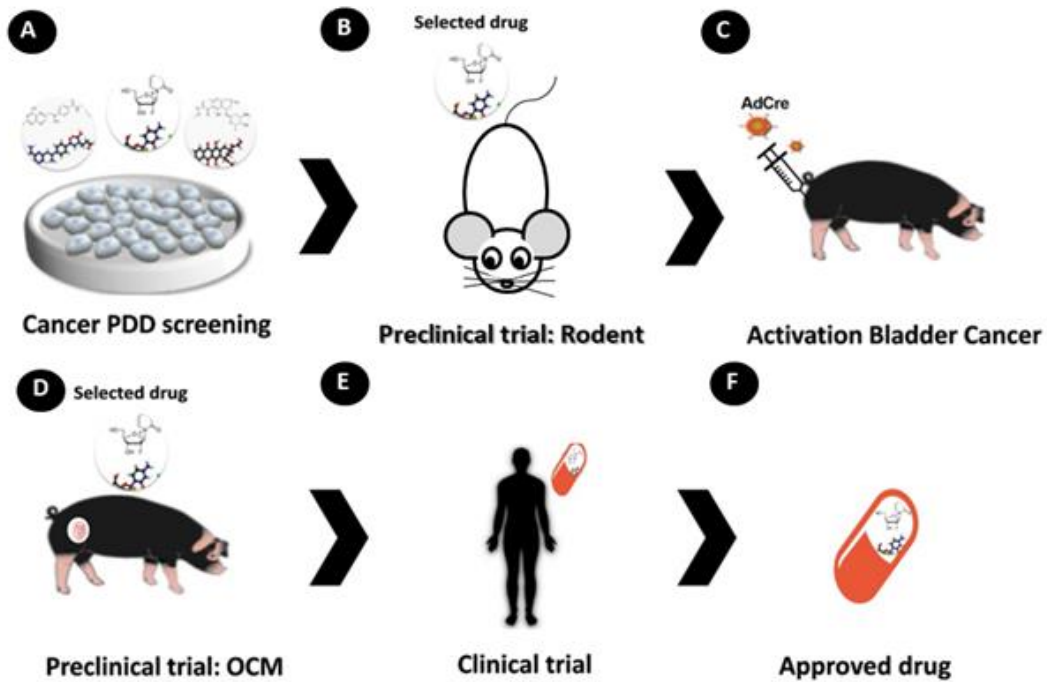


Figure 1. Drug discovery in the Oncopig Bladder Cancer Model. A) Bladder Cancer PDD. B) Pre-clinical trials: in vivo drug testing in rodent model; C) Oncopig Bladder Cancer Model: intravesical AdCre injection activates expression of the mutated oncogenes ( $TP53^{R167H}$  and  $KRAS^{G12D}$ ), resulting in tumor formation. D) Pre-clinical trial II: In vivo drug testing in the Oncopig Bladder Cancer Model. D) Clinical trials. E) Drug selection.