

DENNER SANTOS DOS ANJOS

**AVALIAÇÃO DE MÚLTIPLOS RECEPTORES DE TIROSINA QUINASE E A
VIA DE SINALIZAÇÃO DA MAPK NO INSULINOMA CANINO**

Relatório de Pós-doutorado realizado na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Botucatu.

Supervisor: Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca-Alves

ÍNDICE

1. Resumo.....	03
2. Introdução	04
3. Objetivos	08
4. Material e métodos	08
5. Resultados	11
6. Discussão.....	16
7. Considerações finais.....	18
8. Referências Bibliográficas.....	19

RESUMO

Insulinomas são os tumores neuroendócrinos funcionais mais comuns em cães. Devido a sua alta taxa metastática e limitada opção terapêutica, faz necessário investigações no que se refere a novos tratamentos. O uso de inibidores de tirosina quinase parece promissor na medicina veterinária. Estudo retrospectivo e prospectivo foi realizado em 19 cães com insulinoma incluindo lesões metastáticas (N=2) e lesões não neoplásicas (N=8) para avaliar a imunomarcagem de cinco receptores de tirosina quinase como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR-2), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGFR- β), fator de crescimento epidérmico-1 (EGFR-1), receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2), KIT e a via efetora da proteína-quinase ativada por mitógenos (MAPK). De acordo com o perfil imunoistoquímico, VEGFR-2 e MAPK foram os marcadores que mais estavam expressos no insulinoma (N=13), seguido pelo EGFR1 (N=12), PDGFR- β (N=10) e menor expressão para HER-2 (N=4). Nenhuma das amostras neoplásicas apresentaram expressão para a proteína KIT, incluindo a lesões não neoplásicas. Foi constatado também que o estroma das lesões neoplásicas (N=18) e não neoplásicas (N=4) apresentaram positividade de expressão para a MAPK, o que sugere possível envolvimento da via na tumorigênese do tumor neuroendócrino. Os achados deste estudo reiteram a necessidade de avaliação da expressão dos receptores de tirosina quinase bem como avaliação de vias de sinalização celular como a MAPK, abrindo caminhos para o uso de terapias-alvo específica em cães com insulinoma.

Palavras-Chave: Insulinoma, carcinoma de células beta, tumor neuroendócrino, tirosina quinase.

1. INTRODUÇÃO

Os insulinosas são os tumores neuroendócrinos pancreáticos (TNP) funcionais mais comuns em humanos e cães (Capodanno et al., 2017; Andreassen et al., 2019; Veltroni et al., 2020; Sada et al., 2020; Capodanno et al., 2020). Um dos principais desafios no seu tratamento estão o longo curso clínico da doença, o difícil acesso cirúrgico do tecido pancreático e a alta heterogeneidade tumoral. Devido à baixa taxa de sucesso com as terapias atuais para insulinosas malignos (que apresentam metástase além do pâncreas e invasão aos tecidos adjacentes), faz-se necessário o descobrimento de novas terapias alvos (Okabayashi et al., 2013; Veltroni et al., 2020; Sada et al., 2020). Em ambas as espécies, ocorre uma hiperinsulinemia-hipoglicêmica, devido à secreção descontrolada de insulina pelas células neoplásicas beta pancreáticas (Kraai et al., 2025).

Assim sendo, pelo desenvolvimento espontâneo do insulinoma em cães e as semelhanças dos aspectos fisiopatológicos, sistema imune inato, características histológicas e moleculares e respostas aos tratamentos multimodais, o cão é um modelo de estudo viável para a identificação de possíveis novas terapias para o tratamento de insulinosas agressivos em humanos (Capodanno et al., 2022; Kraai et al., 2025). Além do fato de compartilharem o mesmo ambiente estando expostos a possíveis fatores ambientais (Kraai et al., 2025).

O diagnóstico presuntivo do insulinoma baseia-se no reconhecimento das manifestações clínicas, alterações laboratoriais evidentes e exames de imagem. Contudo, o diagnóstico definitivo ocorre por meio do exame histopatológico através de amostras do tumor primário e/ou de suas metástases (Lunn & Boston, 2020).

Quanto ao diagnóstico presuntivo do insulinoma, confirma-se a hipoglicemia (< 60 mg/dL) associado a concentração de insulina normal ou aumentada (hiperinsulinemia). Alguns casos recomenda-se o jejum do paciente (com monitoração adequada) e mensurações seriadas da glicose a cada 60 minutos. Uma vez que os valores se encontram abaixo da referência, uma amostra sérica para avaliação da concentração de insulina deve ser colhida. A presença de

concentração sérica de insulina normal ou aumentada em quadros de hipoglicemia pode ser confirmatória de insulinoma. A razão insulina/glicose $>30 \mu\text{UI/L}$ ($0,3\mu\text{UI/mL}$), historicamente utilizada como diagnóstica para insulinoma, não tem sido recomendada por não apresentar acurácia diagnóstica, já que outras causas de hipoglicemia e alterações da razão insulina/glicose pode ocorrer (Goutal et al., 2012; Lunn & Boston, 2020).

O tratamento para tumores de células beta inclui a laparotomia exploratória objetivando a cirurgia, tratamento medicamentoso devido às hipoglicemias crônicas ou ambas as modalidades. Quando se observa lesão solitária isolada sem a presença de metástase, a abordagem curativa torna-se maior. Contudo, mesmo que a lesão não seja única, a realização do *debulking* (redução da maior parte do tumor possível) da lesão primária ou remoção das metástases (*metastasectomy*), permite aliviar as manifestações clínicas da hipoglicemia (Lunn & Boston, 2020).

A sobrevida para os pacientes que são submetidos a remoção cirúrgica e *debulking* associado à terapia medicamentosa apresentam maiores sobrevidas quando comparado aos pacientes tratados apenas com medicações (Tobin et al., 1999). Algumas ressalvas são importantes com relação a cirurgia, como a pancreatite pós-operatória, persistência da hipoglicemia no pós-operatório, idade do paciente, extensão da(s) metástase(s) nos exames de imagens, ou comorbidades que possam aumentar o risco anestésico. Dessa forma, uma abordagem menos radical seria mais indicada (Nelson, 2015). Apesar de a pancreatite no pós-operatório ser uma preocupação usual nas pancreatectomias, estudos mostram que apenas 10% dos pacientes desenvolveram esse quadro, não parecendo tão comum (Trifonidou et al., 1998; Ryan et al., 2021).

Estudos observaram que no momento da cirurgia, a metástase foi identificada em apenas 55% dos casos, reiterando o estadiamento adequado desses pacientes para um melhor plano terapêutico (Leifer et al., 1986; Caywood et al., 1988; Trifonidou et al., 1998; Polton et al., 2007; Lunn & Boston, 2020). Ademais, presença de metástase foi a única variável associada ao prognóstico nesses cães atingindo menores taxas de sobrevida. Além da metástase, a recidiva e a persistência da hipoglicemia no pós-operatório também estiveram associados

com maior risco de óbito (Polton et al., 2007; Cleland et al., 2020; Ryan et al., 2021).

Dentre as opções adjuvantes, a mais simples é o fracionamento da alimentação, por meio do oferecimento de várias refeições ao longo do dia. Faz-se importante lembrar que não se recomenda a realização das infusões de soluções hipertônicas em cateter implantados em vasos periféricos, pois tais dispositivos não suportam longos períodos em contato com esse tipo de solução, predispondo o paciente a tromboflebitis (Meleo, 1990; Goutal et al., 2012).

Pode ser recomendada a administração de glicocorticoides como dexametasona na dose de 0,5 mg/kg por via intravenosa a cada 12-24 horas ou prednisona/prednisolona na dose de 0,5 mg/kg/dia (fracionada em 2-3 vezes doses no dia) (Goutal et al., 2012). Seu uso ocorre principalmente no manejo crônico de pacientes com metástase ou tumores inoperáveis. Os glicocorticoides estimulam a gliconeogênese hepática e glicogenólise e interferem na afinidade do receptor de insulina celular para a glicose, elevando a glicemia. O esquema fracionado de administração de prednisona/prednisolona permite auxiliar na prevenção de hipoglicemias e manifestações clínicas. Em casos refratários pode-se optar pelo aumento da dose chegando até 4-6 mg/kg/dia, contudo os pacientes estarão sujeitos a efeitos adversos graves como imunossupressão e hiperadrenocorticismos iatrogênicos (Meleo, 1990; Goutal et al., 2012; Nelson, 2015; Lunn & Boston, 2020).

Outras opções medicamentosas têm sido indicadas na literatura, como o uso do diazóxido (Proglycem®), um benzotiazínico ativador dos canais de potássio que bloqueiam a liberação de insulina, promovendo gliconeogênese hepática e glicogenólise, inibição do consumo celular de glicose e estimulação da secreção de epinefrina. Entretanto, os principais efeitos adversos do diazóxido incluem anorexia, diarreia e vômitos (Meleo, 1990; Polton et al., 2007; Del Busto et al., 2020; Lunn & Boston, 2020). Análogos sintéticos de somatostatina de longa ação como o octreotida têm sido utilizados no controle da hipersecreção hormonal por insulinomas, entretanto, não apresenta efeito duradouro (Simpson et al., 1995; Robben et al., 2006).

Tratamentos adicionais vêm sendo estudados como o uso de inibidores de múltiplos receptores de tirosina quinase como fosfato de toceranibe (Palladia®).

Essa medicação atua em receptores de fatores de crescimento como fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR-2) e o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGFR) (London, 2014). Apesar do seu uso ser licenciado para mastocitoma, estudos mostram eficácia contra tumores neuroendócrinos por sua expressão de VEGFR e PDGFR (London et al., 2009; London et al., 2012; Urie et al., 2012). Flesner et al. (2019), relataram um cão de 12 anos de idade da raça Dachshund com metástase hepática de insulinoma (estádio III) com presença de êmbolos neoplásicos na vascularização. Nesse caso, o uso do fosfato de toceranibe (Palladia®), na dosagem de 2,5 mg/kg por via oral a cada 48 horas, permitiu bom controle glicêmico ao longo dos 24 meses com redução do glicocorticoide.

Em estudo recente avaliando os diferentes receptores de tirosina quinase e a via efetora da proteína-quinase ativada por mitógenos (MAPK) através do exame de imunoistoquímica em tumores endócrinos e neuroendócrinos, foi demonstrado que os receptores de VEGFR-2, PDGFR- β e MAPK (ERK1/ERK2), estavam mais expressos nos tumores, conferindo possível alvo terapêutico (Dos Anjos et al., 2024).

Visto que não existem tantas opções terapêuticas para o insulinoma, estudos translacionais podem beneficiar as duas espécies, com a descoberta de alvos terapêuticos que possam ser aplicados em um modelo canino, e após eficácia comprovada, aplicação em humanos. Desta forma, essa pesquisa avaliou os múltiplos receptores de tirosina quinase como VEGFR-2, PDGFR- β , fator de crescimento epidérmico-1 (EGFR-1), receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2), KIT e a via de sinalização da MAPK (Erk1/Erk2) em insulinomas caninos.

2. OBJETIVOS

Avaliar os receptores de tirosina quinase VEGFR-2, PDGFR- β , EGFR-1, HER-2, KIT bem como a via de sinalização da MAPK (Erk1/Erk2).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Foram incluídos de forma não randomizado retrospectiva e prospectiva pacientes caninos com diagnóstico histopatológico de insulinoma. Como critérios de inclusão compreenderam pacientes que tinham amostra histopatológica do tumor primário e/ou da metástase compatível com neoplasia de células beta pancreática. Como critério de exclusão foram os pacientes que não apresentavam amostra histopatológica para avaliação e sem acompanhamento clínico. Este estudo foi realizado de acordo com as diretrizes nacional e internacional para o uso de animais em pesquisa e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Protocolo número 0253/2022).

3.2 Seleção dos Animais

Foram selecionados 19 animais (totalizando 28 lesões), provenientes de serviço especializado da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, câmpus de Botucatu, clínicas particulares, Centro de Ciencias Veterinarias da Universidade de Maimonides, Buenos Aires, Argentina, Universidade de Utrechet, Holanda e do serviço Eletro-Onkovet, São Paulo, com diagnóstico de insulinoma (neoplasias de células beta pancreática) e/ou com lesões metastáticas compatíveis com insulinoma.

3.3 Amostras para imunoistoquímica

As amostras foram obtidas através do banco de dados da Unesp-Botucatu, São Paulo, do Centro de Ciencias Veterinarias, Universidad Maimonides, Buenos Aires, Argentina, clínicas privadas, Univerisdade de Utrechet, Holanda e do serviço Eletro-Onkovet no Brasil. Pâncreas normal, e pancreatite também foram incluídos como grupo controle. Metástase em órgãos adjacentes também foram incluídas nas análises. O painel preditivo de imunoistoquímica denominado de Painel Multikinase®, compreendeu os

marcadores VEGFR-2, PDGFR- β , EGFR1, HER- 2, KIT e MAPK (Erk1/Erk2), realizados em colaboração com o laboratório Vetprecision, Botucatu, Brasil. A padronização da imunoistoquímica seguiu os critérios propostos na medicina veterinária (Ramos-Vara et al., 2008).

3.4 Reação cruzada com tecido canino

Foi observado a reatividade cruzada de cada anticorpo primário com tecido canino durante as análises de imunoistoquímica. Para os anticorpos EGFR1 e MAPK (Erk1/Erk2), a reatividade cruzada foi fornecida pelo fabricante com reação específica de tecido canino. Além disso, o fabricante indica o uso de ambos os anticorpos para imunoistoquímica em tecido de parafina. O anticorpo c-Kit foi previamente validado pela literatura usando Western blot (Fonseca-Alves et al., 2017). A reatividade cruzada do PDGFR- β com tecido canino foi baseada na homologia proteica fornecida pelo fabricante e validado por Western Blot (Maniscalco et al., 2013). O anticorpo VEGFR-2 foi previamente validado (Gattino et al., 2018) e foi demonstrado alta homologia entre o sequenciamento e aplicabilidade do VEGFR-2 humano e canino em cortes de tecido de parafina (Leis-Filho et al., 2021). O anticorpo HER-2 foi previamente validado por Tsuboi et al. (2019) usando Western Blot.

3.5 Imunoistoquímica

O sistema polimérico de peroxidase de rábano (HRP) e cromogênio 3,30-diaminobenzidina (DAB) foram usadas para imunoistoquímica (Nuovo, 2016). Resumidamente, os blocos de parafina foram cortados e os tecidos foram estendidas em lâminas carregadas para imunoistoquímica (StarFrost, Knittel, Braunschweig, Alemanha). A desparafinização dos tecidos foi realizada utilizando xileno e recuperação antigênica em câmara de pressão (Muscae Plus, Erviegas, Indaiatuba, SP, Brasil) por aproximadamente 30 minutos (com solução de citrato pH 6,0).

Em seguida, as lâminas foram submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena com solução comercial a 8% (Bloqueador de Peroxidase, EasypathDiagnostics, Indaiatuba, SP, Brasil). O anticorpo primário utilizado para imunoistoquímica foi: c-Kit (CD117 policlonal, número de catálogo: A4502, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA) na diluição de 1:100; PDGFR- β (Coelho policlonal, número de catálogo: 3162S, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA) na diluição 1:200; anti-VEGFR-2 (Coelho policlonal,

número de catálogo: A5609, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) na diluição 1:150; anti- EGFR (Mouse monoclonal, catálogo número: MA5-12875, ThermoFisher, Waltham, MA, EUA) e anti-HER2 (Coelho policlonal, número de catálogo: A0485, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA) na diluição 1:400; anti-ERK1/ERK2 (Coelho policlonal, número de catálogo: 602-330, ThermoFisher, Waltham, MA, EUA) na diluição 1:100. O sistema polimérico Envision (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA) foi utilizado como anticorpo secundário.

Como controles positivos, foi usado mastocitoma para c-Kit, placenta para PDGFR- β , VEGFR-2 e EGFR1, pele para HER2 e um testículo normal para ERK1/ERK2. A seleção dos controles foi feita no perfil de expressão fornecido pelo atlas de proteínas humanas ([//www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)). A imunoglobulina isotípica foi utilizada como controle negativo na mesma concentração do anticorpo primário.

3.6 Análise de imunoistoquímica

A interpretação da imunoistoquímica foi feita de acordo com a literatura para o estabelecimento de um novo teste diagnóstico (Ramos-Vara et al., 2008). Portanto, padronizamos a imunolocalização do antígeno e um escore semiquantitativo foi realizado para estimar a porcentagem de células positivas conforme validação prévia (Dos Anjos et al., 2024). Para HER2, apenas a marcação membranosa foi considerada, enquanto a marcação membranosa e a expressão citoplasmática foram consideradas para EGFR1, VEGFR-2 e PDGFR- β . A expressão nuclear e citoplasmática foi considerada para MAPK (ERK1/ERK2); E por fim, a marcação membranosa, citoplasmático focal ou citoplasmático difuso foram considerados para c-KIT.

Em relação à expressão da análise semiquantitativa, a imunoistoquímica foi avaliada com base em um sistema de escore variando de 0 a 4, sendo: 0, sem marcação; 1+, 5–25% de células positivas; 2+, 26–50% de células positivas; 3+, 51–75% de células positivas; e 4+, >75% de células positivas.

4. RESULTADOS

VEGFR-2, PDGFR- β , EGFR-1, HER-2, KIT e a via de sinalização da MAPK (Erk1/Erk2) foram selecionados como potenciais marcadores para terapias alvo dirigidas no que se refere ao uso dos inibidores de tirosina quinase (ITK), previamente testado em modelos canino in vivo. Dentre os ITK, lapatinibe (HER-2 e EGFR1), sorafenibe (ERK1/ERK2, VEGFR-2 e PDGFR- β), toceranibe (VEGFR-2, PDGFR- β e c-KIT) e vemurafenibe (ERK1/ERK2) podem ser possíveis fármacos a serem utilizados dependendo da expressão tumoral desses marcadores.

Foram realizadas 168 análises de imunoistoquímica provenientes de 19 pacientes (28 lesões) com o diagnóstico de insulinoma. De acordo com o perfil imunoistoquímico, VEGFR-2 e MAPK foram os marcadores que mais estavam expressos no insulinoma (N=13 para ambos os anticorpos), seguido pelo EGFR1 (N=12), PDGFR- β (N=10) e menor expressão para HER-2 (N=4). Nenhuma das amostras neoplásicas apresentaram expressão para KIT (N=20), incluindo lesões inflamatórias (pancreatite, N=1) e pâncreas normal adjacente (N=7) (Tabela 1). As imunomarcações do VEGFR-2, PDGFR- β , EGFR-1, MAPK e MAPK em região de estroma podem ser observadas na Figura 1.

Com relação ao receptor VEGFR-2, apenas quatro lesões apresentaram expressão acima de 50% (3+ e 4+), enquanto quatro lesões apresentaram expressão entre 25-50% (2+) e a maioria apresentou expressão menor que 25% (1+) (N=5). Com relação às lesões não neoplásicas (N=8), apenas duas apresentaram marcação, sendo esta de baixa expressão (1+). A maioria das lesões neoplásicas apresentaram baixa expressão de PDGFR- β (1+, N=4), seguida por três lesões com expressão entre 25-50% (2+) e três lesões entre 51-75% (3+). Já nas lesões não neoplásicas, quatro pâncreas normais adjacentes apresentaram marcação 2+ (Figura 2).

Para o EGFR-1, três lesões neoplásicas apresentaram expressão acima de 50% (3+ e 4+), seis lesões expressão 2+ e três lesões 1+. Nenhuma lesão não neoplásica apresentou expressão para EGFR-1. Já para o marcador HER-

2, apenas quatro lesões neoplásicas expressaram abaixo de 50% (1+ e 2+), e nenhuma lesão não neoplásica apresentou expressão.

Por fim, a maioria da expressão da MAPK foi abaixo de 50% (N=9), com apenas quatro lesões acima de 50% (4+: n=1; 3+: n=3). Com relação as lesões não neoplásicas, quatro apresentaram expressão da MAPK, sendo três com expressão 1+ e uma com expressão 3+. Foi constatado também que o estroma das lesões neoplásicas (N=18) e não neoplásicas (N=4) apresentaram positividade de expressão para a MAPK (Tabela 1, Figura 1 e 2).

Tabela 1. Padrão de imunexpressão aos diferentes receptores de tirosina quinase e via de sinalização de MAPK em insulinomas, metástase e lesões não neoplásicas em pacientes caninos.

ID	VEGFR-2	PDGFR-β	EGFR-1	HER-2	KIT	MAPK
1	1+	3+	0	0	0	0
2	4+	2+	0	0	0	0
3 (<i>linfonodo metastático</i>)	2+	0	0	0	0	0
4	0	0	3+	0	0	3+
4.1 (<i>metástase hepática</i>)	1+	3+	4+	2+	0	4+
5	0	0	2+	1+	0	3+
5.1 (<i>pancreatite adjacente</i>)	0	0	0	0	0	0
6	1+	0	2+	0	0	0
7	4+	0	2+	0	0	2+
7.1 (<i>pâncreas normal adjacente</i>)	1+	0	0	0	0	1+
8	1+	1+	2+	0	0	1+
8.1 (<i>pâncreas normal adjacente</i>)	0	2+	0	0	0	3+
9	2+	0	0	0	0	2+
9.1 (<i>pâncreas normal adjacente</i>)	0	0	0	0	0	1+
10	3+	2+	1+	2+	0	1+
11	2+	3+	1+	1+	0	2+

11.1 (<i>pâncreas normal adjacente</i>)	1+	2+	0	0	0	0
12	0	1+	2+	0	0	2+
12.1 (<i>pâncreas normal adjacente</i>)	0	0	0	0	0	0
13	0	1+	0	0	0	0
13.1 (<i>pâncreas normal adjacente</i>)	0	2+	0	0	0	0
14	3+	0	0	0	0	0
14.1 (<i>pâncreas normal adjacente</i>)	0	2+	0	0	0	1+
15	0	0	3+	0	0	0
16	0	2+	0	0	0	2+
17	2+	0	2+	0	0	1+
18	0	1+	0	0	0	3+
19	1+	0	1+	0	0	1+

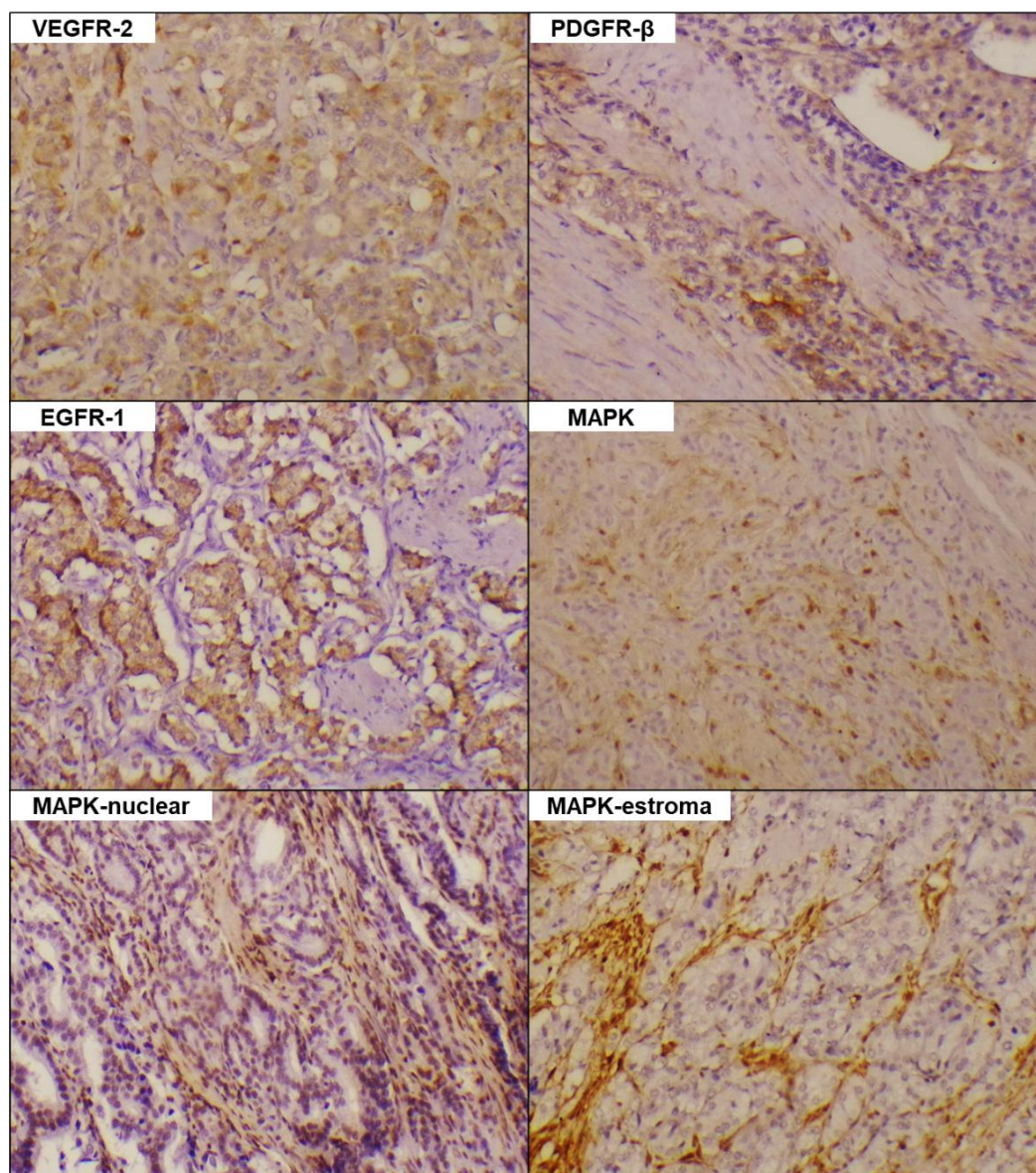


Figura 1. Imunoexpressão dos principais marcadores positivos no insulínoma canino. Imunoexpressão nuclear e citoplasmática do receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR-2) em mais de 75% das células neoplásicas. Receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas beta (PDGFR- β) com marcação citoplasmática e membranosa com escore 3+ nas células neoplásicas. Receptor do fator de crescimento epidérmico-1 (EGFR-1) com expressão membranosa e citoplasmática em mais de 75% das células neoplásicas. Proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), apresentando marcação citoplasmática e nuclear em escore 3+ das células neoplásicas, com marcação do estroma fraco (MAPK-nuclear) e forte (MAPK-estroma).

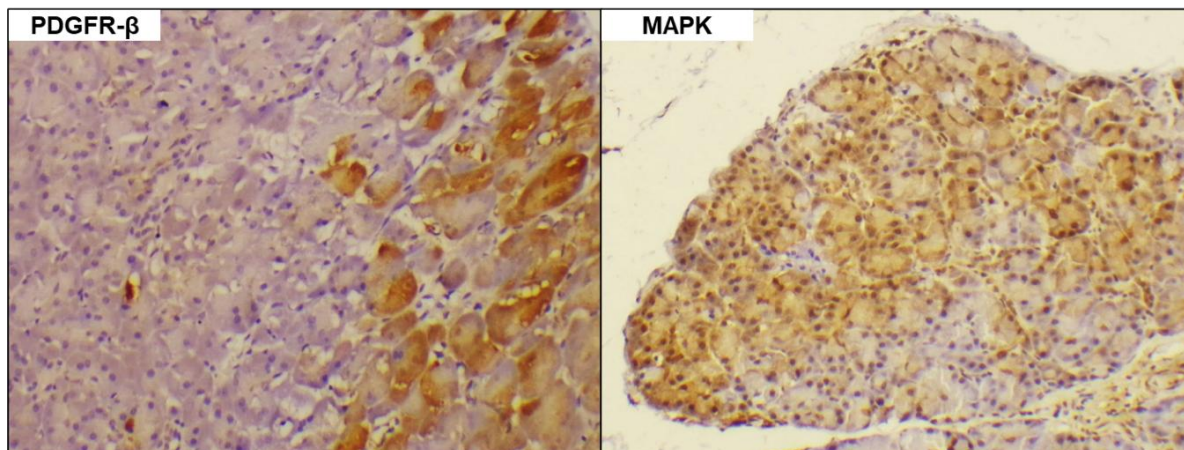


Figura 2. Imunomarcacão do receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas beta (PDGFR- β) e Proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) em pâncreas normal de cães. Imunomarcacão citoplasmática de escore 2+ para PDGFR- β . Imunomarcacão citoplasmática e nuclear de escore 3+ para MAPK.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, VEGFR-2, PDGFR- β , EGFR1 e MAPK foram os marcadores que mais estavam expressos em cães com insulinoma. Este é o primeiro estudo clínico em tumor neuroendócrino a avaliar os receptores e a via MAPK em veterinária. Uma das grandes limitações na literatura veterinária é que os estudos não avaliam a imunomarcagem dos receptores de tirosina quinase para correlacionar com o valor preditivo sobre o uso do toceranibe neste tipo de neoplasia (Sheppard-Olivares et al., 2022; Flesner et al., 2019; Buishand, 2022). Esta situação pode ocorrer devido a custos elevados avaliação de imunoistoquímica ou a ausência de lesões macroscópicas em alguns pacientes, impedindo a confirmação patológica e molecular adequadamente. Outro ponto a comentar, é que o mecanismo pelo qual o ITK (toceranibe) afeta a homeostase da glicose em insulinomas permanece obscuro. Neste estudo ficou comprovado que o toceranibe age principalmente nos receptores de VEGFR2 e PDGFR- β , visto que a marcação de KIT foi completamente ausente.

Por quais mecanismos moleculares e de sinalização o ITK atua na melhoria dos sinais clínicos atribuídos à hipoglicemia em cães que receberam toceranibe ainda precisam ser investigados. Outro ponto importante a abordar é que a via de sinalização da MAPK esteve presente na maioria dos insulinomas (N=13) bem como também foi observado imunomarcagem no estroma tumoral e do pâncreas normal adjacente, sugerindo que essa possa ser uma possível via com suprarregulação auxiliando na tumorigênese das células beta pancreáticas contribuindo na progressão da doença.

Um estudo retrospectivo mostrou o benefício clínico do toceranibe em cães com insulinoma com um critério de resposta para tumores sólidos de 66,7% (remissão completa, resposta parcial ou doença estável). Neste pequeno estudo retrospectivo, aparentemente os animais tiveram benefício clínico, porém estudo prospectivo e randomizado seria necessário para quantificar de forma objetiva o benefício do uso do ITK e sua sobrevida no manejo dos insulinomas (Sheppard-Olivares et al., 2022).

Não obstante, foi observado também que nas lesões não neoplásicas (inflamatória e tecido normal), a ausência dos receptores de tirosina quinase foi ampla como VEGFR-2 (6/8), PDGFR- β (4/8), EGFR-1 (8/8), HER-2 (8/8) e KIT (8/8). Dentre eles, a via de PDGFR- β foi a mais observada em tecidos não neoplásicos, sugerindo que sua expressão possa não contribuir para a tumorigênese do insulinoma. Isso é importante, visto que dentre os inúmeros

RTK, alguns deles são responsáveis pelo metabolismo energético, demonstrando função regulatória no metabolismo fisiológico de glucose celular e homeostasia dos lipídeos, incluindo PDGFR- β , os receptores de fator de crescimento hepatócito (HGFRs) e o receptor RET (Zhao et al., 2020).

Corbo et al. (2012) avaliaram em tumores pancreáticos humanos quatro receptores de tirosina quinase (EGFR, HER2, KIT e PDGFR α) através do exame de imunoistoquímica. Dentre os tumores funcionais (34/140), foi constatado que 100% das amostras (32/32) apresentaram positividade na lesão tumoral e no estroma para o PDGFR α . Em contrapartida, houve baixa expressão de EGFR (1/34), ausência de HER2, e baixa expressão para KIT (4/34). Diferentemente dos humanos com tumores pancreáticos que apresentam variação na expressão do KIT (11-92%) (Fjällskog et al. 2003; Zhang et al. 2009; Corbo et al. 2012), não foi observado a presença do receptor KIT nas amostras caninas, conferindo uma diferença interespecie no que diz respeito às vias de alteração neoplásica.

Uma das vantagens na determinação da imunomarcagem da proteína dos RTK e sinalização intracelular é a possibilidade de desenvolver estratégias terapêuticas para o tratamento do câncer pancreático após o reconhecimento das vias afetadas. Ao analisar e identificar que via da MAPK possa estar alterada nos cães com insulinoma, assim como observado em humanos por Corbo et al. 2012 que a via da fosfatidilinositol-3-quinase/Akt/mTOR também apresenta ativação constitutiva da via apesar de não haver mutação de genes relacionados a via, confere interesse no desenvolvimento de novos fármacos que tem como alvo a via da MAPK e mTOR/PIK3CA (Kulke et al., 2008).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, este estudo avaliou cinco receptores de tirosina quinase (VEGFR-2, PDGFR- β , EGFR1, HER2 e KIT) e a via de sinalização da MAPK (Erk1/Erk2) em tumores neuroendócrinos funcionais em cães. O perfil de imunomarcção mais comumente identificado no tecido neoplásico foram o VEGFR-2, PDGFR- β , EGFR1 e MAPK. Em contrapartida, não houve alta expressão dos marcadores no grupo controle de lesões não neoplásicas, com exceção do PDGFR β , cujo receptor pode estar presente pelo seu papel no metabolismo energético e homeostase de lipídeos.

Desta forma, essas vias expressas permitirão auxiliar em novas terapias alvo-específicas, como por exemplo Lapatinibe (bloqueador de EGFR), contribuindo para o controle tumoral. Assim, futuros estudos prospectivos clínicos com o uso de ITK e bloqueio da MAPK, baseado no seu painel individual de imunomarcção, são necessários para quantificar de forma objetiva sua eficácia na sobrevida dos pacientes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREASSEN M, et al. Surgical management, preoperative tumor localization, and histopathology of 80 patients operated on for insulinoma, **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 104: 6129–6138, 2019.
- BUISHAND F.O. Current Trends in Diagnosis, Treatment and Prognosis of Canine Insulinoma, **Vet. Sci.** 9(10): 540, 2022.
- CAPODANNO Y, BUISHAND FO, PANG LY, KIRPENSTEIJN J, MOL JA, ARGYLE DJ. Notch pathway inhibition targets chemoresistant insulinoma cancer stem cells, **Endocr. Relat. Cancer.** 25: 1–14, 2017.
- CAYWOOD DD, et al. Pancreatic insulin secreting neoplasms: clinical, diagnostic and prognostic features in 73 dogs. **J Am Vet Med Assoc.** 24: 577–84, 1988.
- CLELAND NT, MORTON J, DELISSER PJ. Outcome after surgical management of canine insulinoma in 49 cases. **Vet Comp Oncol.** 19: 428-441, 2020.
- CAPODANNO Y, et al. Transcriptomic analysis by RnA sequencing characterises malignant progression of canine insulinoma from normal tissue to metastatic disease, **Sci. Rep.** 10: 1-12, 2020.
- CORBO V. et al. Pancreatic endocrine tumours: mutational and immunohistochemical survey of protein kinases reveals alterations in targetable kinases in cancer cell lines and rare primaries. **Ann Oncol**, 23: 127-134, 2012.
- DOS ANJOS, et al. Immunohistochemistry Screening of Different Tyrosine Kinase Receptors in Canine Solid Tumors—Part I: Proposal of a Receptor Panel to Predict Therapies, **Int. J. Mol. Sci.** 25: 8438, 2024.
- Flesner, B.K.; Fletcher, J.M.; Smithee, T.; Boudreaux, B. Longterm survival and glycemic control with toceranib phosphate and prednisone for a metastatic canine insulinoma, **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.** 55: e55105, 2019.
- FONSECA-ALVES, C.E. et al. Investigation of c-KIT and Ki67 expression in normal, preneoplastic and neoplastic canine prostate, **BMC Vet. Res.** 13: 380, 2017.
- GOUTAL CM, BRUGMANN BL, RYAN KA. Insulinoma in dogs: a review, **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.** 48: 151–163, 2012.
- LEIFER CE, PETERSON ME, MATUS RE. Insulin-secreting tumor: diagnosis and medical and surgical management in 55 dogs. **J Am Vet Med Assoc.** 188(1): 60-64, 1986.

GATTINO, F. et al. PDGFR- α , PDGFR- β , VEGFR-2 and CD117 expression in canine mammary tumours and evaluation of the in vitro effects of toceranib phosphate in neoplastic mammary cell lines. **Vet. Rec.** 2018, 183, 221.

LEIS-FILHO, A.F. et al. Expression and prognostic significance of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and its receptor in canine prostate cancer. **Prostate**, 81: 1021–1031, 2021.

LUNN KF, BOSTON SE. **Tumors of the endocrine system**. In: VAIL, DM, THAMM, DH, LIPTAK, JM. Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology, 6th edition, Elsevier Saunders, St. Louis Missouri, 2020, pp. 565.

LONDON C, et al. Preliminary evidence for biologic activity of toceranib phosphate (Palladia®) in solid tumours. **Vet Comp Oncol.** 10 (3): 194–205, 2012.

LONDON CA. Small molecule inhibitors in veterinary oncology practice. **Vet Am Clin North Am Small Anim Practice.** 44(5): 893-908, 2014.

LONDON CA, et al. Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumor following surgical excision. **Clin Cancer Res.** 15 (11): 3856–65, 2009.

MELEO K. Management of insuloma patients with refractory hypoglycemia. **Problems in Vet Med.** 2(4): 602-609, 1990.

NELSON RW. **Beta-cell Neoplasia: Insulinoma**. In: FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W.; REUSCH, C.E.; SCOTT-MONCRIEFF, J.C.; BEHREND, E.N. Canine and Feline Endocrinology. Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, 2015, pp. 348.

NUOVO, G. False-positive results in diagnostic immunohistochemistry are related to horseradish peroxidase conjugates in commercially available assays. **Ann. Diagn. Pathol.** 2016, 25, 54–59.

OKABAYASHI T, et al. Diagnosis and management of insulinoma, **World J. Gastroenterol.** 19: 829–83, 2013.

POLTON GA, WHITE RN, BREARLEY MJ, EASTWOOD JM. Improved survival in a retrospective cohort of 28 dogs with insulinoma. **J Small Anim Practice.** 48(3): 151-156, 2007.

- RAMOS-VARA, J.A. et al. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians Subcommittee on Standardization of Immunohistochemistry. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. **J. Vet. Diagn. Investig.** 2008, 20, 393–413.
- ROBBEN JH, et al. Comparison of ultrasonography, computed tomography, and single-photon emission computed tomography for the detection and localization of canine insulinoma. **J Vet Intern Med.** 19(1): 15-22, 2006.
- SADA A, GLASGOW AE, VELLA A, THOMPSON GB, MCKENZIE TJ, HABERMANN EB. Malignant insulinoma: a rare form of neuroendocrine tumor, **World J. Surg.** 44: 2288–2294, 2020.
- SHEPPARD-OLIVARES, S. et al. Toceranib phosphate in the management of canine insulinoma: A retrospective multicentre study of 30 cases (2009–2019). **Vet. Rec. Open**, 9: 27, 2022.
- SIMPSON KW, STEPIEN RL, ELWOOD CM, BOSWOOD A, VAILLANT CR. Evaluation of the long-acting somatostatin analogue octreotide in the management of insulinoma in three dogs. **J Small Anim Practice.** 36(4): 161–165, 1995.
- TSUBOI, M. et al. Assessment of HER2 Expression in Canine Urothelial Carcinoma of the Urinary Bladder. **Vet. Pathol.** 2019, 56, 369–376.
- TOBIN RL, NELSON RW, LUCROY MD, WOOLDRIDGE JD, FELDMAN EC. Outcome of surgical versus medical treatment of dogs with beta cell neoplasia: 39 cases (1990– 1997). **J Am Vet Med Assoc.** 215 (2): 226–230, 1999.
- TRIFONIDOU MA, KIRPENSTEIJN J, ROBBEN JH. A retrospective evaluation of 51 dogs with insulinoma. **Vet Quaterly.** 20: Suppl1:S114–5, 1998.
- URIE BK, RUSSELL DS, KISSEBERTH WC, LONDON CA. Evaluation of expression and function of vascular endothelial growth factor receptor 2, platelet derived growth factor receptors-alpha and -beta, KIT, and RET in canine apocrine gland anal sac adenocarcinoma and thyroid carcinoma. **BMC Vet Res.** 8: 67, 2012.
- VELTRONI A, et al., Clinicopathological features, treatments and survival of malignant insulinomas: a multicenter study, **Eur. J. Endocrinol.** 182: 439–446, 2020.

ZHAO, M, JUNG Y, JIANG Z, SVENSSON K. Regulation of Energy Metabolism by Receptor Tyrosine Kinase Ligands. **Front. Physiol.** 11: 354, 2020.

WANG H, et al. Insights into beta cell regeneration for diabetes via integration of molecular landscapes in human insulinomas, *Nat. Commun.* 8: 1–14, 2017.

8. ATIVIDADES REFERENTE AO PERÍODO DO PÓS-DOCTORADO

Apesar das dificuldades encontradas em realizar a busca por amostras de insulinomas, o candidato cumpriu com os objetivos na obtenção do número amostral. Entretanto, devido ao custo de ferramentas mais robustas e análises moleculares e pela dificuldade de se obter maior número de lesões neoplásicas, foi optado pela realização da avaliação dos receptores de tirosina quinase e a via de sinalização da MAPK, frente ao potencial descobrimento de alvos-terapêuticos para essa doença de comportamento maligno grave.

Ao decorrer do estudo, alguns pacientes foram diagnosticados com insulinoma laboratorialmente (glicose e insulina sérica), entretanto, os pacientes não tiveram detecção nodular em nenhum exame de imagem (ultrassonografia abdominal e/ou tomografia abdominal contrastada), o que dificultou a obtenção das amostras.

Além disso, foi estabelecido vínculo colaborativo com a pesquisadora Sarah Galac, da Universidade de Utrecht, Holanda, objetivando além da internacionalização, a parceria científica no trabalho proposto. Esse vínculo, foi realizado no ano de 2024 com a obtenção de estágio científico e levantamento de cinco amostras da instituição. Além disso, foi realizado também levantamento retrospectivo do banco de dados da UNESP, campus Botucatu.

O candidato difundiu os resultados parciais no Summer School of Veterinary Endocrinology 2024, na Universidade de Bolonha, Itália em apresentação oral e poster bem como realizou estágio científico na Holanda no setor da endocrinologia (Figura 1 e 2).

Ademais, no decorrer do ano de 2023, ocorreu o ONCOVET XII, na cidade de Natal entre os dias 07 – 10 de Setembro. O candidato, juntamente com seu

supervisor, submeteu o trabalho intitulado “Avaliação de expressão de receptores tirosina quinase em diferentes tumores sólidos caninos e sua associação com resposta antitumoral” sendo premiado em 1º lugar dentre os resumos científicos apresentados.



Figura 1. Candidato com a pesquisadora Dra. Sara Galac, da Universidade de Utrecht durante atendimento na rotina veterinária, 2024.

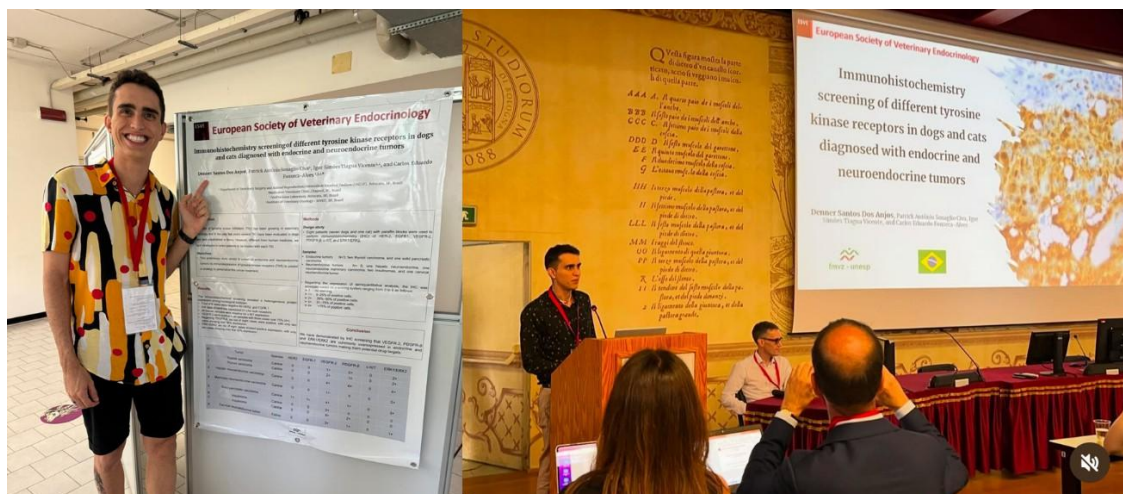


Figura 2. Apresentação em poster e oral dos resultados parciais relacionados a avaliação dos receptores de tirosina quinase nos tumores endócrinos e neuroendócrinos, 2024.

Além disso, o candidato publicou na forma de “comunicação” o artigo intitulado “Immunohistochemistry Screening of Different Tyrosine Kinase

Receptors in Canine Solid Tumors—Part I: Proposal of a Receptor Panel to Predict Therapies” juntamente com seu supervisor Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca-Alves, a avaliação do painel multiquinase em tumores sólidos caninos, como proposta a um painel preditivo às terapias. O trabalho foi publicado na revista International Journal of Molecular Sciences (Fator de impacto 4.9), com a seguinte citação: Int. J. Mol. Sci. 2024, 25, 8438. <https://doi.org/10.3390/ijms25158438>