

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 30/01/2022.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA *IN VITRO* AO TRATAMENTO COM
INIBIDOR DE RECEPTOR TIROSINA QUINASE (PALLADIA®) E
mTORC1 (RAPAMICINA) EM CÉLULAS DE CARCINOMA PROSTÁTICO
CANINO**

PRISCILA EMIKO KOBAYASHI

**BOTUCATU_SP
Janeiro-2020**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA *IN VITRO* AO TRATAMENTO COM
INIBIDOR DE RECEPTOR TIROSINA QUINASE (PALLADIA®) E
mTORC1 (RAPAMICINA) EM CÉLULAS DE CARCINOMA PROSTÁTICO
CANINO**

PRISCILA EMIKO KOBAYASHI

Tese apresentada junto
ao Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do
título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Renée Laufer Amorim
Co-orientador: Carlos Eduardo Fonseca Alves
Co-orientadora: Flávia Karina Delella

FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Kobayashi, Priscila Emiko.

Avaliação da resposta in vitro ao tratamento com inibidor de receptor tirosina quinase (palladia ®) e mTORC1 (rapamicina) em células de carcinoma prostático canino / Priscila Emiko Kobayashi. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Renée Laufer Amorim

Coorientador: Carlos Eduardo Fonseca Alves

Coorientador: Flávia Karina Delella

Capes: 50503006

1. Cão - Doenças. 2. Próstata - Cancêr. 3. Transcriptoma.
4. Sirolimo.

Palavras-chave: PDGFR; Transcriptoma; VEGFR; c-KIT; mTOR.

Nome do Autor: Priscila Emiko Kobayashi

Título: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IN VITRO AO TRATAMENTO COM INIBIDOR DE RECEPTOR TIROSINA QUINASE (PALLADIA ®) E mTORC1 (RAPAMICINA) EM CÉLULAS DE CARCINOMA PROSTÁTICO CANINO

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Renée Laufer Amorim
Presidente e Orientadora
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ-UNESP-Botucatu

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano
Membro
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional
Instituto de Biociências de Botucatu-Unesp

Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho
Membro
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional
Instituto de Biociências de Botucatu-Unesp

Prof. Dr. Enio Ferreira
Membro
Departamento de Patologia
Instituto de Ciências Biológicas -UFMG

Prof. Dr. Heidge Fukumasu
Membro
Departamento Medicina Veterinária
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP Pirassununga

Data da Defesa: 30 de janeiro de 2020.

AGRADECIMENTOS

A Deus por toda energia positiva ao redor que me guia pelos caminhos, e pela oportunidade de evoluir diariamente durante essa minha passagem.

A minha família que apesar de não terem a mesma oportunidade que tive com relação à educação, nunca mediram esforços para que eu seguisse meu caminho, principalmente aos meus pais que sempre criaram os filhos para o Mundo. Tenho orgulho de como seguiram essa jornada de forma árdua, sempre de forma justa e pensamento positivo.

A minha orientadora Prof. Renée Laufer Amorim, pela orientação não apenas acadêmica, mas também pessoal, pelo exemplo de SER humano e pelas conversas diretas sem entrelinhas. Agradeço imensamente por tê-la como orientadora, pois num mundo de tantas desistências, tristezas e depressão, estar ao lado de pessoas que nos apoiem é crucial em muitas decisões.

A co-orientadora Prof. Flávia Karina Delella por todo suporte e pronta para ajudar, além do carinho, serenidade e atenção que sempre me atendeu.

Ao meu co-orientador e amigo Prof. Carlos Eduardo Fonseca Alves, Cadu, por tornar o trabalho diário mais leve, me aconselhando com bom humor. Você me faz acreditar que existem profissionais competentes, humildes e que trabalham com amor, sempre respeitando o próximo.

Ao meu namorado Alexei por tantas horas de conselho, paciência e amor. Obrigada por escolher caminhar ao meu lado, independente das circunstâncias e mesmo que às vezes distante fisicamente. Sem a compreensão e reciprocidade não teríamos chegado até aqui.

Aos meus amigos que me acompanharam até aqui apesar da distância, aos amigos que fiz durante a pós-graduação e colegas de trabalho: nada somos se estamos sozinhos, nada teria sido feito se não fosse a ajuda recíproca. Obrigada pelas conversas, ao apoio e por tornarem o ambiente de trabalho mais descontraído e fluido.

Aos membros da banca examinadora pelo aceite do convite, pelas considerações e pelo tempo que despenderam para avaliação do meu trabalho.

A esta universidade que me acolheu desde a graduação e me acompanhou até agora. Durante esses 13 anos a UNESP-Botucatu foi minha

segunda casa, me deu novos amigos, permitiu que aprendesse não apenas sobre a veterinária, mas sobre relações humanas.

A CAPES pela bolsa de doutorado concedida durante esses anos. Sem sombra de dúvidas o trabalho não teria sido o mesmo sem a disponibilidade da bolsa de estudos. Agradeço ainda a oportunidade do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE), pois possibilitou adquirir novas experiências, a troca de conhecimento cultural e científico.

Ao professor Geoffrey Wood da *University of Guelph* que me recebeu com muito carinho, permitiu que eu acompanhasse e aprendesse novas técnicas utilizadas, além de bons momentos de troca cultural. A todos da *University of Guelph* que me ajudaram nos experimentos e fizeram com que o momento fosse agradável durante os seis meses no Canadá.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001, bolsa PDSE/CAPES 88881.187996/2018-01.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Estrutura de um receptor tirosina quinase monodímero e posterior autofosforilação ..	18
Figura 2: Papel da angiogênese na carcinogênese.	21
Figura 3: Representação estrutural esquemática da proteína mTOR..	26
Figura 4: Via PI3K/AKT/mTOR simplificada..	29

LISTA DE ABREVIACÕES

Carcinoma prostático (CaP)

Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)

Receptor do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFR)

Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)

Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR)

SCF (fator de célula tronco)

Instituto Nacional do Câncer (INCA)

mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos)

mTORC1 (complexo 1 da proteína alvo da rapamicina em mamíferos)

Adenosina trifosfato (ATP)

Tumor gastrointestinal (GIST)

Receptor de fator de crescimento epidérmico 1 (EGFR ou HER 1)

Receptor de fator de crescimento epidérmico 2 (HER 2)

Receptor de fator de crescimento epidérmico 4 (HER 4)

Fator de crescimento epidérmico (EGF)

Dióxido de carbono (CO₂)

Proteína alvo da rapamicina (mTOR)

Complexo 1 da mTOR (mTORC1)

Complexo 2 da mTOR (mTORC2)

Fator de iniciação eucariótico 4E proteína de ligação 1 (4E-BP1)

Fator de iniciação eucariótico 4E (eIF-4E)

Proteína quinase ribossomal S6 (S6Ks)

fosfatidilinositol-3 -quinase (PI3K)

Proteína quinase B (AKT ou PKB)

Fosfatidilinositol-3,4 bifosfato (PIP₂)

Fosfatidilinositol-3,4,5 bifosfato (PIP₃)

Proteína de ligação FK506 (FKBP12)

SUMÁRIO

Capítulo 1	11
INTRODUÇÃO	11
REVISÃO DE LITERATURA	14
1. PRÓSTATA CANINA	14
2. NEOPLASIA PROSTÁTICA E SUA METÁSTASE	14
3. RECEPTOR TIROSINA QUINASE	17
3.1 Receptor de Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGFR)	20
3.2 Receptor do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGFR)	22
3.3 c-KIT	24
4. INIBIDOR DE mTORC (RAPAMICINA)	25
5. OBJETIVOS.....	30
5.1 Objetivos gerais	30
5.2 Objetivos Específicos.....	30
Capítulo 2- Trabalho científico 1.....	31
Capítulo 3- Trabalho científico 2.....	66
Capítulo 4	91
DISCUSSÃO GERAL	91
CONCLUSÕES GERAIS.....	92
BIBLIOGRAFIA	92

KOBAYASHI P.E. **Avaliação da resposta in vitro ao tratamento com inibidor de receptor tirosina quinase (palladia ®) e mtorc1 (rapamicina) em células de carcinoma prostático canino.** Botucatu, 2020, 106 p. Tese (Doutorado) _ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O carcinoma prostático canino possui prognóstico desfavorável e modalidades terapêuticas limitadas, principalmente em casos avançados. Devido à falta de tratamento eficaz para os carcinomas prostáticos caninos, esse estudo objetivou avaliar o efeito do toceranib (inibidor de receptor tirosina quinase) e da rapamicina (inibidor de mTORC1) em células de carcinoma prostático canino. As duas células de cultura primária advindas de carcinoma prostático canino, denominadas PC1 e PC2, apresentaram expressão proteica de VEGFR2 e PDGFR- β e ausência da proteína c-KIT, os quais são alvos do fosfato de toceranib. Adicionalmente, após comparação do transcriptoma das células não tratadas e tratadas com fosfato de toceranib, observaram-se alterações em genes relacionados com a via PDGFR, angiogênese e resistência terapêutica. Além disso, realizou-se o tratamento das células PC1 e PC2 com rapamicina (inibidor de mTORC1) após a comparação do transcriptoma das células tumorais com células de próstata normal e identificação de genes envolvidos na via PI3K/AKT/mTOR. O tratamento com rapamicina diminuiu a expressão gênica de *mTOR* e *4E-BP1* e aumentou de *AKT*, podendo representar mecanismos de resistência. Após tratamento com fosfato de toceranib, apenas a PC1 reduziu a viabilidade celular, porém após tratamento com rapamicina, as células PC1 e PC2 reduziram a viabilidade celular de maneira dose dependente, havendo resposta biológica em ambas as terapias. Sendo assim, o bloqueio de múltiplos receptores tirosina quinase e inibição de mTOR representam alvos terapêuticos no carcinoma prostático canino, entretanto a resistência terapêutica ainda é desafiadora e, portanto, a medicina de precisão seria uma forma de superar o problema.

Palavras-chave: VEGFR, PDGFR, c-KIT, mTOR, transcriptoma

KOBAYASHI P.E. ***In vitro* evaluation of receptor tyrosine kinase inhibitor (Palladia®) and mTORC1 inhibitor (rapamycin) in canine prostatic carcinoma cells.** Botucatu, 2020, 106 p. Tese (Doutorado) _ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Canine prostatic carcinoma has a poor prognosis and limited therapeutic modalities, mainly in advanced cases. The aim of this study was to evaluate the effect of toceranib phosphate (receptor tyrosine kinase inhibitor) and rapamycin (mTORC1 inhibitor) in canine prostatic carcinoma cells due to the lack of efficient therapies. Two primary canine prostate cancer cell lines, PC1 and PC2, had protein expression of VEGFR2 and PDGFR- β and absent c-KIT expression, which are target toceranib phosphate targets. Additionally, we compared transcriptome before and after toceranib phosphate treatment and we observed gene alterations related to PDGFR pathway, angiogenesis and therapeutic resistance. Besides, we treated PC1 and PC2 cells with rapamycin after transcriptome analysis comparing canine prostatic cells from normal prostate and neoplastic cells and identification of genes involved in PI3K/AKT/mTOR pathway. Gene expression of *mTOR* and *4E-BP1* decreased and *AKT* increased after rapamycin treatment, and could represent a resistency mechanism. A decrease only in PC1 cell viability was observed after toceranib phosphate treatment, however decreased cell viability in a dose-dependent manner was observed in PC1 and PC2 cells after rapamycin treatment. Therefore, we could observe biological response of canine prostatic carcinoma cells to both therapies. Thus, multiple receptor tyrosine kinase inhibition and mTOR inhibition represent target therapies to canine prostatic carcinoma. However, therapeutic resistance still remains a challenge and precision medicine could be a way to overcome this problem.

Key- words: VEGFR, PDGFR, c-KIT, m-TOR, transcriptome

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer de próstata no homem será o mais incidente durante o ano de 2020, com exceção do câncer de pele não melanoma, com 65.840 novos casos, correspondendo a 29,2% de todas as neoplasias (INCA, 2019). Em cães, embora não existam dados retrospectivos atuais sobre prevalência, é reportado baixa prevalência de carcinoma prostático (CaP) canino em material provindo de necropsia (WEAVER, 1981).

Dentre os grandes mamíferos, o cão é o único que possui desenvolvimento espontâneo da neoplasia prostática, além de lesões prostáticas e sítios de metástases similares ao humano (osso, linfonodos, pulmão), tornando-o um importante modelo de estudo em neoplasias prostáticas (CORNELL et al., 2000; GUPTA; MASSAGUÉ, 2006; HENSEL; THALMANN, 2016; PINHO et al., 2012; WEAVER, 1981). Outra escolha para novos modelos de estudo é o uso do cultivo celular, como por exemplo, a utilização de linhagens celulares de neoplasias que tem proporcionado descobertas relacionadas à carcinogênese e metástases (ITOU et al., 2015). Além disso, o início de desenvolvimento da maioria dos agentes antineoplásicos dependem de testes *in vitro*, pois o baixo custo e a rápida avaliação permitem uma triagem e desenvolvimento rápido de novos agentes terapêuticos (GORDON; KHANNA, 2010), associado a minimização de problemas relacionados a questões éticas com o uso dos modelos *in vitro* (KRAMER et al., 2013).

O câncer de próstata é um complexo multifatorial, e apresenta grande importância devido a sua alta morbidade e mortalidade (KELLER et al., 2013; LEROY; NORTHRUP, 2009). Dentre os fatores que colaboram para essa estatística é a presença de metástase, com debilitação e complicações progressivas (ARYA et al., 2006). A metástase no carcinoma prostático é um mecanismo em que envolve processos múltiplos das células e do microambiente tumoral, incluindo a angiogênese, proliferação e invasão celular (ARYA et al., 2006; GUPTA; MASSAGUÉ, 2006).

Os eventos do início da carcinogênese até sua metástase são processos dinâmicos que envolvem vias de sinalização entre as células neoplásicas e imunes, estroma e vasos (LONG et al., 2014). A transição epitelial-mesênquimal participa em um desses processos, para que as células percam a polaridade e adesão celular, ganhem propriedades invasivas e migrem para outros locais (FONSECA-ALVES et al., 2015; KOBAYASHI et al., 2018).

Em humanos, apesar da melhoria dos métodos diagnósticos precoce, ainda ocorrem mortes devido à neoplasia prostática e sua progressão (WOZNEY; ANTONARAKIS, 2014). Portanto, apesar de o câncer prostático apresentar comportamento de crescimento lento, trata-se de uma doença potencialmente fatal com o avanço da neoplasia, havendo grande interesse no desenvolvimento de tratamentos com menor toxicidade e, conseqüentemente melhor qualidade de vida durante os anos (HACKSHAW-MCGEAGH et al., 2015).

Em cães, geralmente o CaP apresenta um prognóstico reservado, pois geralmente é diagnosticado em estágio avançado e com alta taxa de metástase, dificultando o tratamento (LEROY; NORTHRUP, 2009). Uma das causas no diagnóstico tardio é a ausência de sinais clínicos ou também sinais clínicos não patognomônicos que incluem hematúria, estrangúria e tenesmo (CORNELL et al., 2000; SUN; BÁEZ-DÍAZ; SÁNCHEZ-MARGALLO, 2017). Portanto, para o diagnóstico definitivo ser estabelecido também são necessários: exame físico, diagnóstico por imagem, exames citopatológico e histopatológico (BENNETT et al., 2018). Os tratamentos incluem terapias locais (prostatectomia, radioterapia, por exemplo) e sistêmicas (inibidor de ciclooxigenase, quimioterapia), porém sem uma taxa de sobrevida satisfatória (LEROY; NORTHRUP, 2009; SORENMO et al., 2004). Sendo assim, novas terapias também são necessárias nessa espécie e dentre elas a terapia alvo, a qual o objetivo é destruir as células neoplásicas ou antígenos associados, sem afetar as células normais (HOJJAT-FARSANGI, 2014).

O tratamento do câncer geralmente está correlacionado com tratamentos que atuam em alvos moleculares comuns para células normais e neoplásicas, dessa forma a pesquisa de novas terapias que interfiram com alvos intracelulares envolvidos na carcinogênese estão em progresso e são

necessárias para possível uso combinado com terapias convencionais (VICENTINI et al., 2003).

O Fosfato de Toceranib (Palladia®) é um medicamento inibidor de receptores de tirosina quinase, os quais possuem papel na proliferação e sobrevivência celular, além de ativação de células endoteliais para neovascularização (RANIERI et al., 2013). Os inibidores de tirosina quinase podem representar uma estratégia adicional de tratamento, atingindo a proliferação celular e metástase, reduzindo a morbidade associada aos carcinomas prostáticos e suas metástases (OJEMUYIWA; MADAN; DAHUT, 2014). Além disso, estudo *in vitro* com osteossarcoma canino reduziu a migração celular e após inoculação dessas células de cultura em camundongos, esses animais foram tratados e apresentou redução de crescimento celular *in vivo* (SÁNCHEZ-CÉSPEDES et al., 2019).

O uso do Palladia® foi aprovado na Medicina Veterinária e sua eficácia é sabidamente comprovada em casos de mastocitoma canino, porém o seu uso em outras neoplasias pode ser viável devido às alterações dos receptores alvos nos diferentes tumores (CHON et al., 2012; LEBLANC et al., 2012). Foram demonstradas respostas clínicas na fase I do medicamento em cães com diversos tipos de neoplasias com desenvolvimento espontâneo, incluindo melanoma, mieloma múltiplo, diferentes carcinomas e sarcomas, inclusive em alguns casos com metástases (LONDON et al., 2003). Além disso, tem sido avaliado o uso conjunto de Palladia® e outra medicação, dentre eles o piroxicam, doxorrubicina e vimblastina (CHON et al., 2012; PELLIN et al., 2017; ROBAT et al., 2012). A associação do fosfato de toceranib ao piroxicam em cães com carcinoma prostático demonstrou resposta parcial ao tratamento (PAN et al., 2014) ou estabilização da neoplasia (CHON et al., 2012).

Outro medicamento utilizado em terapia antineoplásica é a rapamicina, a qual inibe o mTORC1 (complexo 1 da proteína alvo da rapamicina em mamíferos), bloqueando assim a via de progressão do ciclo celular, proliferação e angiogênese (LARSON et al., 2016). Em humanos, a via PI3K/AKT/mTOR apresenta papel importante no desenvolvimento do CaP (RUSSO et al., 2019). Em cães, as proteínas dessa via têm sido avaliada em diferentes neoplasias, incluindo hemangiossarcoma (MURAI et al., 2012a), osteossarcoma (GORDON; YE; KENT, 2008a), melanoma (KENT; COLLINS;

YE, 2009) e, inclusive, em carcinoma prostático (RIVERA-CALDERÓN et al., 2019a). Diante disso, observa-se a alteração da via PI3K/AKT/ mTOR em diferentes neoplasias e podem apresentar possíveis alvo terapêuticos no tratamento antineoplásico em cães.

Portanto, diante da problemática que o câncer prostático representa na espécie canina e humana, associado à falta de alternativas no tratamento com alta eficácia dependendo do estágio clínico da doença, fazem-se necessários maiores estudos com novas terapias a fim de uma melhoria clínica para o paciente.

REVISÃO DE LITERATURA

1. PRÓSTATA CANINA

Em cães machos, a próstata é a única glândula sexual e localiza-se na cavidade pélvica ou abdômen caudal dependendo do tamanho, cranialmente a bexiga e envolve a uretra proximal (KUTZELER & YEAGER, 2005; EVANS & CHRISTENSEN, 1993). Apresenta formato oval a esférica, com um sulco dorsal e ventral, recoberta por cápsula fibromuscular (SMITH, 2008).

Além disso, a próstata canina é uma glândula serosa e sofre alteração histológica durante a maturação sexual do animal, como por exemplo, em glândulas imaturas a porção acinar é pouco desenvolvida, lúmen pequeno e sem evidência de atividade secretória (DORSO et al., 2008). Com o desenvolvimento da próstata, o lúmen das glândulas tubuloalveolares aumenta e, conseqüentemente, o estroma do tecido conjuntivo diminui (DORSO et al., 2008). Essas alterações são decorrentes da influência de andrógenos durante o desenvolvimento e crescimento de cães não castrados. E em casos de neoplasias prostáticas caninas, os andrógenos parecem ter efeito protetor (TESKE et al., 2002).

As células basais epiteliais prostáticas são apresentadas de forma descontínua e são pouco visíveis na coloração de hematoxilina e eosina (FONSECA-ALVES et al., 2015; LEAV et al., 2001).

2. NEOPLASIA PROSTÁTICA E SUA METÁSTASE

O câncer de próstata é um grande problema de saúde mundial e, de acordo com a GLOBOCAN, estimou-se 1,3 milhões de novos casos de câncer

de próstata no mundo e 359 mil associados a mortes para o ano de 2018 (BRAY et al., 2018). Nos Estados Unidos, a neoplasia prostática lidera o ranking do número de novos casos de câncer no homem (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018). No Brasil, esta liderança é similar, com previsão de aproximadamente 66 mil novos casos para o ano de 2020 (INCA, 2019).

Apesar da alta morbidade e mortalidade decorrente da neoplasia prostática, a etiologia do câncer prostático ainda é desconhecida, porém são citados e estudados diversos fatores de risco em humanos: idade, raça, dieta (gordura e carne vermelha), obesidade e histórico prévio familiar (BASHIR, 2015; BOSTWICK et al., 2004; HSING; DEVESA, 2001).

Assim como em outras neoplasias, o câncer prostático desenvolve-se através de alterações genéticas somáticas e epigenéticas (DE MARZO et al., 2007), além de inflamação e proliferação celular aumentada, os quais são alguns dos fatores que podem iniciar uma cascata de eventos que conduzem a lesões prostáticas, incluindo neoplasia (JOSHI et al., 2015).

A sinalização do andrógeno e seu receptor têm papel importante durante o desenvolvimento da glândula prostática humana, bem como na carcinogênese prostática e progressão, podendo tornar-se letal quando a neoplasia é independente de andrógeno (BANERJEE et al., 2018; TINDALL; LONERGAN, 2011). Em cães, observou-se perda do receptor de andrógeno nos carcinomas prostáticos em relação às próstatas normais, o que torna possível a utilização desses animais como modelo experimental de carcinoma prostático humano independente de andrógeno (RIVERA-CALDERÓN et al., 2016).

Para a iniciação e crescimento de células epiteliais, incluindo do carcinoma prostático, a proliferação celular excessiva e a angiogênese são etapas cruciais (KALLURI; WEINBERG, 2009). Porém, uma das etapas que determina um pior prognóstico em um paciente com carcinoma prostático é a aquisição da capacidade celular de invadir e migrar (VAN DE MERBEL et al., 2018). Em cães e no homem, há tendência para metástase esquelética durante o desenvolvimento espontâneo da neoplasia prostática, sendo que o tratamento em casos de metástases são apenas paliativos (KELLER et al., 2013; WIESNER et al., 2008).

Durante cada etapa na cascata da metástase, as células tumorais interagem com o microambiente e seus componentes (GANAPATHY; MOGHE; ROTH, 2015). As propriedades invasivas e migratórias são primordiais durante o processo de metástase, portanto são necessárias enzimas que participam na degradação da membrana basal, além de reorganização do citoesqueleto celular, perda de polaridade e adesão (KALLURI; WEINBERG, 2009; KHAN et al., 2015). Algumas dessas alterações estão presentes durante o processo de transição epitelial-mesenquimal que é caracterizado pela obtenção das células epiteliais de um fenótipo invasivo e mesenquimal que permite a migração celular para novos microambientes (WEI et al., 2008). Em cães e humanos, essa transição tem sido estudada como um evento importante para que o carcinoma prostático metastatize (FONSECA-ALVES et al., 2015; KHAN et al., 2015). Durante essa etapa as células tumorais apresentam aumento em sua motilidade, favorecendo a disseminação para locais distantes, porém há uma diminuição da capacidade proliferativa. Entretanto, o processo inverso pode ocorrer: as células com fenótipo mesenquimal adquirem novamente as características epiteliais, inclusive com maior capacidade de proliferação (LI; LI, 2015; MARCUCCI; STASSI; DE MARIA, 2016).

Devido à importância das neoplasias prostáticas nos cães e humanos e os diversos mecanismos envolvidos na carcinogênese e sua metástase, diferentes técnicas são necessárias para que se obtenha maiores informações a respeito dessa doença e suas terapias. Diante disso, a cultura celular é uma ferramenta que é utilizada em descobertas e testes de terapias diversas doenças, inclusive o carcinoma prostático humano (ELLEM; DE-JUAN-PARDO; RISBRIDGER, 2014). Assim como todo modelo experimental, a cultura celular em monocamada apresenta vantagens e desvantagens. Dentre as vantagens pode-se observar que são sistemas bem controlados, mais fáceis e rápidos para realização de testes em período curto, apresentam homogeneidade e possibilitam a utilização de drogas de maneira combinada com menor quantidade de fatores (como encontrada em amostras clínicas) que confundam a análise (NIU; WANG, 2015). Contudo, as principais limitações são: seleção fenotípica e genotípica das células durante a adaptação nas novas condições, isolamento das células do microambiente tumoral, mutações durante o decorrer

do tempo e isolamento das células do microambiente tumoral (CEKANOVA; RATHORE, 2014).

Portanto, a utilização das células *in vitro* permite que haja a avaliação do comportamento dessas células, com o desenvolvimento de ensaios sobre migração celular e realização de testes sobre estimuladores e inibidores de invasão celular, auxiliando na descoberta de novas drogas e suas respostas (BENTON et al., 2009).

3. RECEPTOR TIROSINA QUINASE

As proteínas quinases catalisam uma série de eventos na fosforilação e transferem um grupo fosforila (PO_3^{-2}) para proteínas alvo através de adenosina trifosfato (ATP). As proteínas tirosinas quinases são assim denominadas por apresentarem uma cadeia lateral fenólica e em humanos contém 90 membros dentro desta família de proteínas (ROSKOSKI, 2015). Dessas 90 proteínas, 58 são receptores tirosina quinase transmembrânicas e 32 são tirosina quinase não receptoras citoplasmáticas (GOCEK; MOULAS; STUDZINSKI, 2014; GSCHWIND; FISCHER; ULLRICH, 2004; ROSKOSKI, 2015).

Os receptores de tirosina quinase possuem um domínio extracelular de ligação, uma hélice transmembrana e um domínio intracelular catalítico (KRAUSE; VAN ETTEN, 2005). A maioria dos receptores tirosina quinase são monômeros na membrana celular, e a ligação de um fator de crescimento na região extracelular do receptor induz a dimerização desses receptores resultando em auto fosforilação (dependente de ATP) do domínio intracelular e ativação das cascatas de sinalização das quinases (GLÜCK et al., 2015; HUBBARD; MILLER, 2007; KRAUSE; VAN ETTEN, 2005; SUN; BERNARDS, 2014)(LEMMON; SCHLESSINGER, 2010).

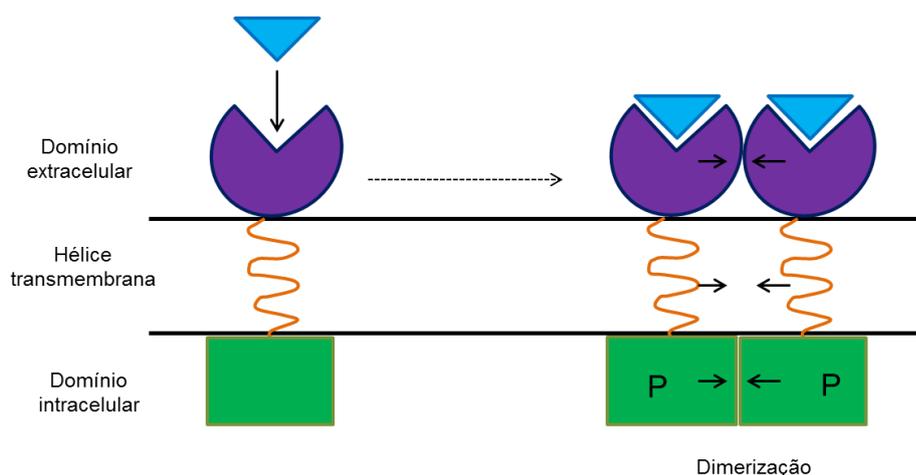


Figura 1: Estrutura de um receptor tirosina quinase monodímero (esquerda). Dimerização após ligação com fator de crescimento e posterior autofosforilação (P). Adaptado de (SCHLESSINGER, 2014).

Os receptores são essenciais para a transdução de sinal extracelular para o interior da célula e possuem papel de enzimas com atividade quinase (GOTINK; VERHEUL, 2010; PAUL; MUKHOPADHYAY, 2004). Participam em processos celulares fundamentais, como proliferação, diferenciação, migração, metabolismo, sobrevivência e comunicação celular durante desenvolvimento normal das células e tecidos (GSCHWIND; FISCHER; ULLRICH, 2004). Porém, mudanças ou anormalidades genéticas que alterem a atividade, distribuição celular, quantidade ou regulação dos receptores tirosina quinase, além de mutações e ativações aberrantes da sinalização intracelular estão ligados ao desenvolvimento do câncer, inflamação, doenças ósseas e angiogênese (LEMMON; SCHLESSINGER, 2010).

Os mecanismos associados à ativação patológica desses receptores são diversos, incluem mudanças estruturais (mutações pontuais ou proteína truncada, por exemplo), amplificação do gene e consequentemente aumento da expressão proteica, ativação excessiva através do ligantes e falta de mecanismos reguladores (TEMPLETON et al., 2014). Em cães, a desregulação dos receptores tirosina quinase em neoplasias é menos bem caracterizada, contudo as neoplasias com alterações nestes receptores têm apresentado mecanismos similares quando comparados ao humano (LONDON et al., 2003).

Nota-se que a participação dos receptores tirosina quinase tem sido relatada em diversas neoplasias em cães e humanos, portanto são alvos de drogas em diferentes tumores e podem representar uma opção em pacientes com metástase prostática (GALLICK et al., 2012; LONDON et al., 2003; OJEMUYIWA; MADAN; DAHUT, 2014). Em humanos com carcinoma prostático de maior risco ou que apresentem resistência à radioterapia, as drogas inibidoras de receptores de tirosina quinase estão entre os métodos alternativos (BROOKS et al., 2012; HOFER et al., 2004). Também é citada sua utilização e eficácia em outras neoplasias em humanos, como por exemplo, o uso de mesilato de imatinibe (Gleevec; Novartis, East Hanover, NJ, EUA), utilizado em casos de leucemia mieloide crônica e tumor gastrointestinal (GIST) (MOCELLIN et al., 2018; NISHIDA; DOI; NAITO, 2014). Além do mesilato de imatinibe, existem outras moléculas disponíveis para o tratamento do câncer, com diferentes proteínas quinase alvo, como mostra no quadro 1.

Nome	Proteína quinase alvo
Herceptin™ (trastuzumabe)	HER2
Dacomitinib	HER1(EGFR), HER2, HER4
Iressa™ (ZD1839)	EGFR
SU6668	PDGFR/VEGFR
ZD6474	VEGFR/EGF
Sunitinibe	VEGF
Imatinibe	KIT e VEGFR-A

Quadro 1: Diferentes inibidores tirosina quinase para tratamento de neoplasias em humano e seus respectivos alvos (JE; SCHUTZ; CHOUEIRI, 2009; MANLEY et al., 2002; MOCELLIN et al., 2018)

Na medicina veterinária, os inibidores de tirosina quinase têm sido utilizados, dentre eles Palladia (toceranib), Kinavet (masitinib) e Gleevec (imatinib) em cães, e o Gleevec em gatos (LONDON, 2009). Foi aprovado o uso de fosfato de toceranib (Palladia®) em mastocitomas canino devido sua eficácia, porém também têm sido abordadas suas atividades contra outros tipos de neoplasias, incluindo alguns carcinomas (BERNABE et al., 2013). Em um

estudo com cães, foram observados nos carcinomas uma resposta parcial (carcinoma mamário metastático) ou uma evolução estável (carcinoma de células transicionais da bexiga, carcinoma pulmonar e carcinoma de células escamosas) quando administrados o Palladia® via oral (LONDON, 2009).

O fosfato de toceranib (Palladia®) possui semelhanças com outros inibidores disponíveis para pacientes humanos, como o imatinibe, sorafenibe e sunitinibe (KHANNA; GORDON, 2009). Esta molécula age como inibidor seletivo de múltiplos receptores tirosina quinase, entre eles VEGFR, PDGFR, c-KIT, e compete diretamente com a adenosina trifosfato (ATP), prevenindo a fosforilação do receptor e transdução do sinal (YU et al., 2014). De acordo com observações em modelos experimentais de laboratório, a ativação de uma única proteína quando comparada com ativação de múltiplas proteínas quinases apresenta um fenótipo tumoral menos agressivo, portanto sugere-se que a inibição de diversos receptores tirosina quinase, como o Palladia®, produzirá um efeito antitumoral mais efetivo do que uma inibição única (STOMMEL et al., 2007).

3.1 Receptor de Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGFR)

As células tumorais e metastáticas, assim como as células normais, necessitam de nutrientes, oxigênio, fatores de crescimento, enzimas, hormônios, entre outras substâncias, além de habilidade de eliminar metabólitos e dióxido de carbono (CO₂) (HANAHAN; WEINBERG, 2011; HICKLIN; ELLIS, 2005). Portanto, para a sobrevivência e proliferação dessas células é necessário que haja a angiogênese, o qual é o processo de formação de novos vasos sanguíneos através de redes vasculares pré-existentes. Durante esse processo as células endoteliais se dividem e são incorporadas nos novos capilares (ROSKOSKI, 2007).

A angiogênese é regulada por diversos fatores de crescimento e citocinas que estão presentes em condições normais, entretanto os níveis desses fatores se equilibram após a perfusão sanguínea ter sido estabelecida (MOENS et al., 2014). Dentre esses fatores está o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) que se liga a seus receptores (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3), sendo o VEGFR2 um importante fator em situações patológicas que

envolvem a neovascularização tumoral (GOTINK; VERHEUL, 2010; YU et al., 2014).

Em condições patológicas há geração de vasos sanguíneos com anormalidades estruturais e funcionais, pois os sinais pró angiogênicos geralmente excedem os sinais anti angiogênicos e fatores de maturação do vaso (WANG et al., 2015). Dentre os efeitos, observa-se a falta de conexão das células endoteliais e pericitos, o que compromete a função da barreira endotelial vascular, permitindo passagem do plasma e células, inclusive tumorais (BALUK; HASHIZUME; MCDONALD, 2005; MORIKAWA et al., 2002). A passagem do plasma faz com que a pressão intersticial aumente e impede a distribuição de droga, também altera o transporte adequado de nutrientes e oxigênio, e conseqüentemente as células neoplásicas estimulam a angiogênese em um ciclo compensatório (POTENTE; GERHARDT; CARMELIET, 2011).

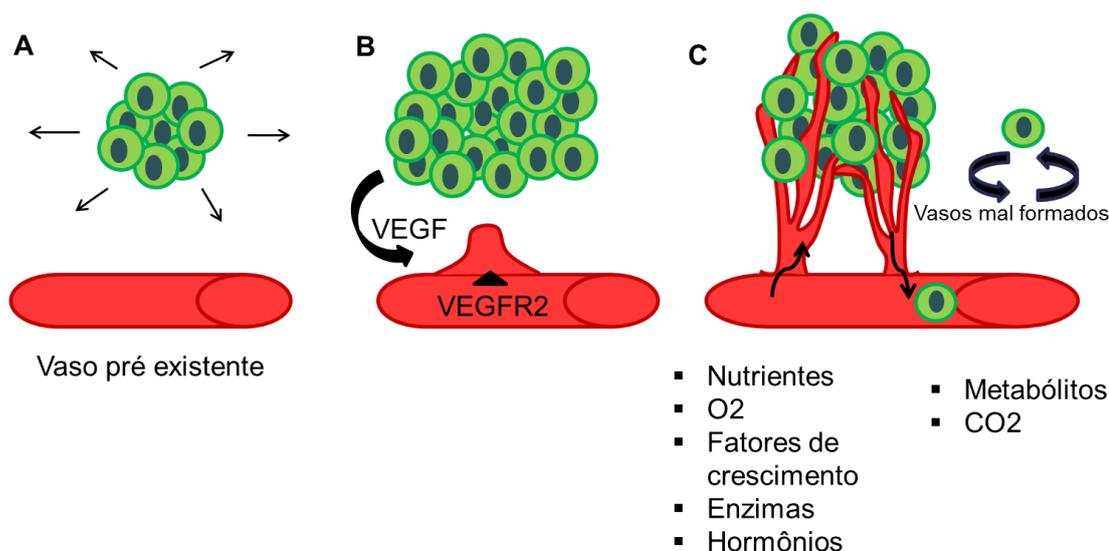


Figura 2: Papel da angiogênese na carcinogênese. **A)** Quando o tumor é pequeno, as células neoplásicas se mantêm com o oxigênio e nutrientes de vasos pré-existentes. **B)** Conforme as células neoplásicas se multiplicam, há liberação de sinais pró angiogênicos, como por exemplo, o VEGF que se liga ao VEGFR2 para que haja proliferação de novos vasos. **C)** Os novos vasos que são mal formados permitem a nutrição das células, mas também permitem a passagem do plasma e células para o interstício, impedindo transporte adequado de oxigênio e nutrientes. Portanto as células estimulam ainda mais a angiogênese, em um ciclo compensatório.

Imagem: Adaptado Vasudev & Reynolds (2014)

O VEGF representa um dos agentes promotores angiogênicos tumorais mais potentes e permite aumento da atividade angiogênica, mitogênica e

permeabilidade vascular específica para as células endoteliais, com função importante na formação de metástases distantes (WERGIN; KASER-HOTZ, 2004). Em câncer prostático humano, os níveis de VEGF no sangue e urina parecem estar correlacionados com o resultado dos pacientes e a densidade microvascular tem sido utilizada para prever a progressão tumoral e relacionada com grau mais elevado no escore de Gleason (HWANG; HEATH, 2010). A densidade microvascular nos carcinomas é mais alta quando comparada às próstatas normais, e os carcinomas por sua vez apresentam maior densidade microvascular quando possuíam metástases, sugerindo uma relação entre densidade microvascular e estágio tumoral (ARYA et al., 2006).

Diante da importância da angiogênese no crescimento tumoral e metástases, a utilização de inibidores incluindo VEGFR e seu ligante (VEGF) tem sido uma estratégia eficaz em alguns tipos tumorais associados a quimioterapias, porém no carcinoma prostático não está bem definido e ainda apresenta uma área promissora de pesquisa (BILUSIC; WONG, 2014; COHEN et al., 2007; MUKHERJI et al., 2013; RAJABI; MOUSA, 2017; WANG; JAIN; BATCHELOR, 2017)

3.2 Receptor do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGFR)

Existem no total quatro genes de fator de crescimento de plaquetas (PDGF A, B, C e D) que produzem cinco tipos de proteínas biologicamente ativas: quatro homodímeros (PDGF AA, BB, CC, DD) e uma heterodímera (PDGF AB) (NAJY et al., 2012). Há dois receptores tirosina quinase: PDGFR α e PDGFR β , o primeiro se liga a todas as isoformas da proteína, exceto PDGF DD, enquanto que o segundo receptor é ativado pela isoforma PDGF BB e PDGF DD (DEMOULIN; ESSAGHIR, 2014). Ambos os receptores podem ser ativados diretamente pela ligação da proteína VEGF-A (PENNOCK; KAZLAUSKAS, 2012).

O PDGF é secretado por plaquetas ativadas e diversas outras células: endotelial, epitelial, glial e células inflamatórias (DEMOULIN; ESSAGHIR, 2014). Em condições fisiológicas, as ações biológicas das PDGFs e seus receptores (PDGFRs) são controladas de maneira parácrina, reguladas pelo microambiente celular, citocinas e estímulos de crescimento, e participam em processos de cicatrização, inflamação e angiogênese (CAO, 2013; RANIERI et

al., 2013). A sinalização via PDGFR α atua no desenvolvimento de folículo piloso, oligodendrócitos, pulmão e vilosidade intestinal, enquanto que a via PDGFR β é importante no desenvolvimento de vasos sanguíneos, rins e adipócito unilocular (HELDIN, 2013; KARLSSON et al., 2000; SORIANO, 1997).

Entretanto, na tumorigênese, os membros da família PDGF interagem com os receptores tirosina quinase localizados na transmembrana e implica em sinalização através de diversos mecanismos: sinalização autócrina proliferativa, angiogênese e contribuição na transição epitelial mesenquimal, contribuindo no comportamento invasivo e metastático da neoplasia (HWANG; HEATH, 2010). Existem ainda estudos que comprovam a ativação do PDGFR através de mecanismos que não sejam a ligação direta das proteínas PDGF (RUSSELL et al., 2010).

PDGFs e PDGFRs também possuem papel importante no estroma tumoral através do recrutamento de pericitos e células musculares lisa do vaso, que por sua vez estabilizam os vasos neoformados e estimulam as células do estroma a produzir VEGF-A e consequente angiogênese (KILVAER et al., 2014). Em diferentes tipos de neoplasias, o PDGFR β também é expresso vinculado a fibroblastos associados ao câncer, demonstrando que o PDGFRs estromais podem regular múltiplas etapas da carcinogênese, metástase e interferir na eficácia da droga (ÖSTMAN, 2017). Em um estudo realizado em ratos, utilizado com modelo de câncer prostático, mostrou que a terapia alvo de PDGFR- β estromal resultou em densidade vascular diminuída, aumento de apoptose celular e menor crescimento tumoral quando comparados com grupos que realizaram apenas a castração como terapia (NIU; XIA, 2009).

Em humanos, nos carcinomas prostáticos e suas metástases ósseas o PDGFR- β geralmente está aumentado em 88% e 80% dos casos, respectivamente (NAJY et al., 2012), além da expressão proteica de PDGFR em lesões pré neoplásicas (neoplasia intraepitelial), sugerindo um papel deste receptor na progressão tumoral (HOFER et al., 2004). Em linhagens celulares de carcinoma prostático celulares (PC3) foi demonstrado um aumento de PDGF-D, com consequente transição epitelial mesenquimal e um fenótipo de célula tronco, o que pode explicar o aumento da invasividade (KONG et al., 2010).

Diferentes estratégias têm sido desenvolvidas na utilização de terapias inibidoras em doenças que o PDGFR possui um papel importante, com resultados positivos em associação com outros tratamentos, como em casos de glioblastoma (REARDON et al., 2005; ROBERTS; COSSIGNY; QUAN, 2013). Entretanto, os estudos com inibidor de receptor tirosina quinase nos carcinomas prostáticos, assim como em diferentes neoplasias, ainda apresentam muitos efeitos colaterais e ineficácia, necessitando de maiores estudos (HELDIN, 2013).

3.3 c-KIT

O proto oncogene *c-KIT* codifica um receptor de tirosina quinase de transmembrana, denominado c-Kit (também nomeado CD117), e estruturalmente está relacionado com outros receptores transmembrânicos: VEGFR e PDGFR (ARBER; TAMAYO; WEISS, 1998; QIU et al., 1988). O receptor c-KIT tem como ligante a proteína SCF (fator de célula tronco), fator de crescimento que existe como glicoproteína ligada a membrana e também na isoforma solúvel (LIANG et al., 2013; ROSKOSKI, 2005).

O sistema SCF/c-KIT é um sistema expresso em diversas células e tecidos: fibroblastos, células endoteliais, células tronco hematopoiéticas, germinativas, prostáticas, endometriais, intersticiais de Cajal, mastócitos, melanócitos, entre outros (FIGUEIRA et al., 2015; LAMMIE et al., 1994; LENNARTSSON; RONNSTRAND, 2012; ROSKOSKI, 2005). A interação de ambos possuem papel importante nas vias de ativação da diferenciação, proliferação, apoptose e sobrevivência celular (DI LORENZO et al., 2004; EDLING; HALLBERG, 2007). A proteína SCF é uma citocina inflamatória e considerada a maior ativadora de mastócitos, os quais levam a uma mudança no microambiente tumoral devido ao aumento de inflamação e imunossupressão (HUANG et al., 2008).

Entretanto, uma correlação positiva entre desregulação do *c-KIT* e a transformação maligna de diferentes células tem sido descrita (PARONETTO et al., 2004; SHI et al., 2016). Uma das alterações é devido a mutações que ativam o receptor tirosina quinase independente de ligantes ou que codificam o c-KIT truncado independente de ATP para ativá-lo (ABBASPOUR BABAEI et al., 2016; TOYOTA et al., 1994). Em humanos as mutações em éxons

específicos são reportadas em diversos tumores, como é o caso de tumores gastrointestinais (GISTs), leucemia mielóide e seminomas testiculares (BLUME-JENSEN; HUNTER, 2001; HEINRICH et al., 2002). Em mastocitomas caninos também é relatada mutações do proto oncogene *c-KIT* com alta graduação histológica (ZEMKE; YAMINI; YUZBASIYAN-GURKAN, 2002).

Além disso, durante a carcinogênese é relatado o aumento na expressão do receptor tirosina quinase, sensibilidade aumentada em relação ao seu ligante SCF, e estímulo autócrino (células tumorais) ou parácrino (microambiente tumoral) (ABBASPOUR BABAEI et al., 2016; PARONETTO et al., 2004). Carcinomas prostáticos humanos apresentam aumento da expressão proteica de SCF quando comparados com tecido prostático normal, além de correlação positiva com os carcinomas mais agressivos (ALABIAD et al., 2018). Em relação ao receptor c-KIT, observou-se maior expressão proteica em lesões metastáticas do que em tumores primários de carcinoma prostático humano, sugerindo uma interação entre células neoplásicas e microambiente tumoral ósseo na progressão da doença (MAINETTI et al., 2015). Em carcinomas prostáticos caninos a expressão proteica de c-KIT apresenta heterogeneidade de marcação e possivelmente sem relação com a metástase, porém todos os CaP classificados com escore de Gleason 10 apresentavam a proteína, sugerindo uma possibilidade de tratamento personalizado com inibidores de c-KIT nestes casos (FONSECA-ALVES et al., 2017).

4. INIBIDOR DE mTORC (RAPAMICINA)

A rapamicina é um macrolídeo descoberta como um metabólito produzido por *Streptomyces hygroscopicus* e inicialmente utilizada como antifúngico (VÉZINA; KUDELSKI; SEHGAL, 1975). Posteriormente, o fármaco passou a ser utilizado como terapia imunossupressora após transplante para minimizar a rejeição do órgão, pois inibe a habilidade das células dendríticas sofrerem maturação em células apresentadora de antígeno (APC), as quais estimulam as células T (BAROJA-MAZO et al., 2016). Além disso, possui funções anti proliferativas em células de mamíferos, pois inibe a proteína mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos), a qual seu nome é derivado devido a ação do fármaco (XIE; WANG; PROUD, 2016).

A proteína mTOR é uma proteína serina/treonina quinase, e é classificada desta forma pois contém uma cadeia lateral alcóolica (ROSKOSKI, 2015). Estruturalmente (figura 3) é composta pela porção N-terminal que possui duas repetições HEAT (fator de alongamento da huntingtina3, subunidade da proteína fosfatase 2A e a quinase Tor 1) em tandem (ZHOU; HUANG, 2010). A extremidade C-terminal da proteína possui o domínio FAT e FATC, ambos necessários à função catalítica (YANG et al., 2013). Adjacente ao domínio FAT, há o domínio ligante FKBP12-rapamicina (FRB), que se liga ao complexo mTOR e FKBP, os quais estão ligados a rapamicina (NASR et al., 2015). O domínio quinase catalítico (KIN) possui uma pequena região chamada de domínio regulatório negativo (NRD) que possui sítios de fosforilação da treonina 2446, serina 2448 e serina 2481, e relacionadas com maior atividade de mTOR quando fosforiladas (HOEFFER; KLANN, 2010).

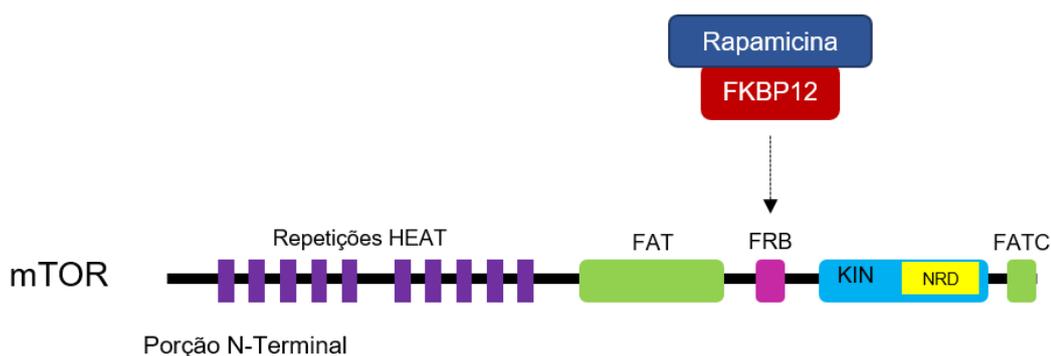


Figura 3: Representação estrutural esquemática da proteína mTOR. Porção N-terminal com duas repetições HEAT em tandem. Domínio FAT e FATC apresentam função catalítica, seguido de domínio FRB, o qual se liga ao complexo FKBP12-rapamicina, e, portanto, onde atua o fármaco (rapamicina). O domínio quinase catalítico (KIN) possui um domínio repressor (NRD). Adaptado (LI et al., 2014).

A proteína mTOR está presente em duas formas distintas de complexo multiproteico, denominados complexos 1 e 2 da mTOR, mTORC1 e mTORC2, respectivamente (BALLOU; LIN, 2008; MOCELLIN et al., 2018). O primeiro complexo citado é classificado como sensível e o segundo insensível a rapamicina (BALLOU; LIN, 2008; LI et al., 2016). Em ambos os complexos, a proteína mTOR é a subunidade catalítica (DAN et al., 2014). Cada um desses complexos apresenta proteínas diferentes em sua composição, além de fosforilar diferentes substratos (KENNEDY; LAMMING, 2016).

O mTORC1 consiste nas proteínas mTOR, mLST8 (proteína 8 Sec13 mamífero letal), Raptor (proteína regulatória de mTOR), e dois inibidores endógenos do complexo: DEPTOR (proteína de interação mTOR contendo domínio DEP) e PRAS 40 (substrato de AKT rico em prolina)(DIBBLE; CANTLEY, 2015). Após ativação de mTORC1, o complexo fosforila diretamente as proteínas PRAS 40 e DEPTOR, reduzindo interação com o complexo e ativando a sinalização deste complexo (LAPLANTE; SABATINI, 2009). O complexo 2 da mTOR contém as proteínas mTOR, mLST8, Rictor (proteína associada a mTOR insensível a rapamicina) e mSIN1 (proteína de interação da quinase de mamíferos ativada por estresse 1) (DAN et al., 2014).

mTORC1 é sensível a rapamicina, pois a interação do fármaco com a proteína FKBP12 (proteína de ligação FK506), resulta em um complexo que se liga ao domínio FRB da proteína mTOR (HAUSCH et al., 2013; MENG; ZHENG, 2015). Conseqüentemente, interrompe a ligação com a proteína Raptor, bloqueando assim a sinalização da via PI3K/AKT/mTOR (BOVÉ; MARTÍNEZ-VICENTE; VILA, 2011). O mTORC1 é responsivo a fatores nutricionais celulares e do organismo, incluindo aminoácidos, glucose e oxigênio (DAN et al., 2014; DIBBLE; MANNING, 2013; RAMIREZ-RANGEL et al., 2011). Comparado ao mTORC1, as vias que regulam mTORC2 são muito menos conhecidas, sendo a via PI3K a única via descrita (OH; JACINTO, 2011). Além disso, devido à ausência de ligação do complexo FKBP12-rapamicina ao mTORC2, sugere-se inibição da rapamicina apenas a mTORC1. Porém, em algumas células, o uso prolongado de rapamicina (mais de 24 horas) tem apresentado supressão de mTORC2, contribuindo no efeitos do medicamento (SARBASSOV et al., 2006).

O complexo 1 controla diferentes vias, incluindo a síntese e produção de ribossomos, transcrição, apoptose, lipogênese e síntese de nucleotídeo, os quais são funções importantes para crescimento celular e tecidual (XIE; WANG; PROUD, 2016). Este complexo é mediado por substratos que incluem o fator de iniciação eucariótico 4E (4E-BP1), proteína quinase ribossomal 6S (S6K1), ULK, entre outros (KENNEDY; LAMMING, 2016). Também participa da via fosfatidilinositol-3 -quinase (PI3K) /AKT/mTOR, a qual regula o crescimento e sobrevivência celular por meio do controle da taxa de processo anabólico, capacidade de síntese proteica e atividade mitocondrial (KIM; GUAN, 2015).

A desregulação da via PI3K/AKT/mTOR principalmente devido hiperativação de mTOR está descrita em diferentes tipos de câncer, incluindo em câncer prostático (HSIEH et al., 2015) (MABUCHI et al., 2015). A perda de função de genes supressores, incluindo PTEN (homólogo da fosfatase e tensina) e TSC 1 / 2 (complexo esclerose tuberosa), ou a mutação em oncogenes , por exemplo KRAS, AKT, PIK3CA, também estão relacionadas com a hiperativação da via PI3K/AKT mTOR (JHANWAR-UNIYAL et al., 2019).

A ativação da via PI3K/AKT/mTOR se dá pela fosforilação da classe IA PI3Ks na membrana celular (figura 3), através de sinais extracelulares, como por exemplo insulina, ativação do receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR), oncogenes , dentre outros (KIM; GUAN, 2015; LOPICCOLO et al., 2008; MABUCHI et al., 2015). A classe I da proteína PI3K possui uma subunidade catalítica (p110) e reguladora (p85), e após fosforilação da PI3K a subunidade p110 fosforila o componente lipídico da membrana celular: fosfatidilinositol-3,4 bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol-3,4,5 bifosfato (PIP3) (LI et al., 2016). Posteriormente, a proteína AKT é fosforilada e ativa diferentes proteínas, incluindo o complexo 1 da mTOR que por sua vez regula outros substratos, como por exemplo, fosforila a proteína 1 ligante (4E-BP1) do fator de iniciação eucariótico 4E (eIF-4E) e S6Ks, os quais regulam a síntese proteica (KIM; GUAN, 2015; ZHANG et al., 2017). A proteína 4E-BP1 liga-se a eIF-4E, porém após sua fosforilação esta associação entre ambas é desfeita, permitindo a tradução proteica (QIN; JIANG; ZHANG, 2016).

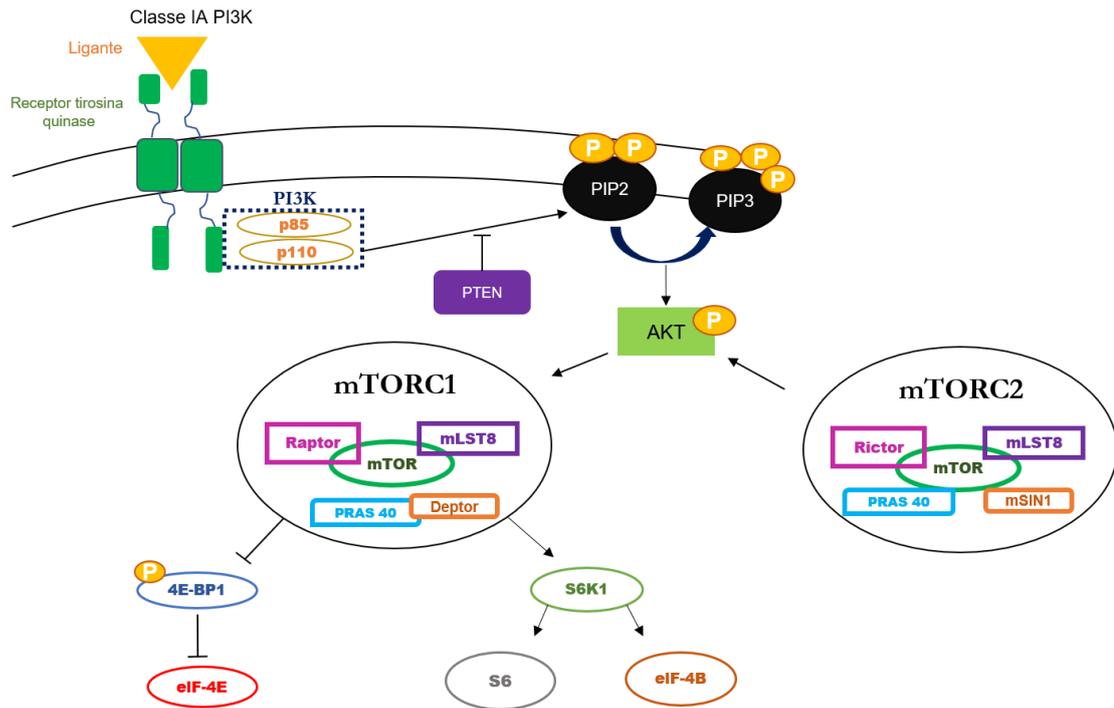


Figura 4: Via PI3K/AKT/mTOR simplificada. Ativação da classe IA PI3K com as subunidades p85 e p110, subsequente fosforilação (P) de PIP2 em PIP3, posterior fosforilação de AKT e ativação do complexo 1 mTOR (mTORC1). Ativação de mTORC1 resulta em ativação de S6K1, e fosforilação da proteína 4E-BP1 gera diminuição de afinidade com a proteína eIF-4E, soltando-a. Ativação de mTORC2 resulta em fosforilação de AKT.

Em cães, o aumento de proteínas relacionados com a ativação da via PI3K/AKT/mTOR têm sido descritos em diferentes neoplasias, como por exemplo hemangiossarcoma (MURAI et al., 2012b), carcinoma prostático (RIVERA-CALDERÓN et al., 2019b), células de melanoma (KENT; COLLINS; YE, 2009) e células de osteossarcoma (GORDON; YE; KENT, 2008b). Nos carcinomas prostáticos caninos com alto escore de Gleason (maior ou igual a oito) foi observado aumento de expressão proteica de mTOR fosforilado e eIF4E quando comparado a próstata normal (RIVERA-CALDERÓN et al., 2019b). Além disso, uma diminuição na expressão proteica de PTEN nos carcinomas prostáticos caninos foi reportada (RIVERA-CALDERÓN et al., 2016). Esses achados indicam alterações de proteínas envolvidas na ativação da via PI3K/AKT/mTOR e, portanto, sendo uma via de possíveis alvos terapêuticos no tratamento de carcinoma prostático em cães.

CONCLUSÕES GERAIS

Diante do exposto, as utilizações do fosfato de toceranib e da rapamicina apresentam certa resposta biológica *in vitro*, porém necessitam maiores pesquisas para que se obtenham maiores informações sobre a eficácia dos tratamentos em carcinomas prostáticos caninos. Além disso, devido a presença de possíveis mecanismos de resistência em ambos os tratamentos, deve-se considerar a medicina personalizada ou de precisão para obter-se uma melhor resposta antineoplásica.

As células de carcinoma prostático canino apresentaram perfil de expressão gênica e resposta antitumoral distintas, indicando uma heterogeneidade intertumoral. A célula PC2 apresentou uma maior resistência ao fosfato de toceranib, e pode ser utilizada como modelo de resistência quimioterápica intrínseca dos carcinomas prostáticos caninos.

BIBLIOGRAFIA

- ABBASPOUR BABAEI, M. et al. Receptor tyrosine kinase (c-Kit) inhibitors: a potential therapeutic target in cancer cells. **Drug Design, Development and Therapy**, v. Volume 10, p. 2443–2459, ago. 2016.
- ALABIAD, M. A. et al. Prognostic and Clinic-Pathological Significances of SCF and COX-2 Expression in Inflammatory and Malignant Prostatic Lesions. **Pathology & Oncology Research**, 6 nov. 2018.
- ARBER, D. A.; TAMAYO, R.; WEISS, L. M. Paraffin section detection of the c-kit gene product (CD 117) in human tissues: Value in the diagnosis of mast cell disorders. **Human Pathology**, v. 29, n. 5, p. 498–504, maio 1998.
- ARYA, M. et al. The metastatic cascade in prostate cancer. **Surgical Oncology**, v. 15, n. 3, p. 117–128, nov. 2006.
- BALLOU, L. M.; LIN, R. Z. Rapamycin and mTOR kinase inhibitors. **Journal of Chemical Biology**, v. 1, n. 1–4, p. 27–36, 15 nov. 2008.
- BALUK, P.; HASHIZUME, H.; MCDONALD, D. M. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 15, n. 1, p. 102–111, fev. 2005.
- BANERJEE, P. P. et al. Androgen action in prostate function and disease. **American journal of clinical and experimental urology**, v. 6, n. 2, p. 62–77, 2018.

- BAROJA-MAZO, A. et al. Immunosuppressive potency of mechanistic target of rapamycin inhibitors in solid-organ transplantation. **World Journal of Transplantation**, v. 6, n. 1, p. 183, 2016.
- BASHIR, M. N. Epidemiology of Prostate Cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 13, p. 5137–5141, 3 ago. 2015.
- BENNETT, T. C. et al. Total prostatectomy as a treatment for prostatic carcinoma in 25 dogs. **Veterinary Surgery**, v. 47, n. 3, p. 367–377, abr. 2018.
- BENTON, G. et al. Advancing science and technology via 3D culture on basement membrane matrix. **Journal of Cellular Physiology**, v. 221, n. 1, p. 18–25, out. 2009.
- BERNABE, L. F. et al. Evaluation of the adverse event profile and pharmacodynamics of toceranib phosphate administered to dogs with solid tumors at doses below the maximum tolerated dose. **BMC veterinary research**, v. 9, n. 1, p. 190, 2013.
- BILUSIC, M.; WONG, Y. Anti-angiogenesis in prostate cancer: knocked down but not out. **Asian journal of andrology**, v. 16, n. 3, p. 372–7, 2014.
- BLUME-JENSEN, P.; HUNTER, T. Oncogenic kinase signalling. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 355–65, 17 maio 2001.
- BOSTWICK, D. G. et al. Human prostate cancer risk factors. **Cancer**, v. 101, n. S10, p. 2371–2490, 15 nov. 2004.
- BOVÉ, J.; MARTÍNEZ-VICENTE, M.; VILA, M. Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 12, n. 8, p. 437–452, 20 ago. 2011.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, nov. 2018.
- BROOKS, C. et al. Preclinical evaluation of sunitinib, a multi-tyrosine kinase inhibitor, as a radiosensitizer for human prostate cancer. **Radiation Oncology**, v. 7, n. 1, p. 154, 2012.
- CAO, Y. Multifarious functions of PDGFs and PDGFRs in tumor growth and metastasis. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, n. 8, p. 460–473, 2013.
- CEKANOVA, M.; RATHORE, K. Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 8, p. 1911, out. 2014.

- CHON, E. et al. Safety evaluation of combination toceranib phosphate (Palladia®) and piroxicam in tumour-bearing dogs (excluding mast cell tumours): a phase I dose-finding study. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 10, n. 3, p. 184–193, set. 2012.
- COHEN, M. H. et al. FDA Drug Approval Summary: Bevacizumab (Avastin(R)) Plus Carboplatin and Paclitaxel as First-Line Treatment of Advanced/Metastatic Recurrent Nonsquamous Non-Small Cell Lung Cancer. **The Oncologist**, v. 12, n. 6, p. 713–718, 1 jun. 2007.
- CORNELL, K. K. et al. Clinical and pathologic aspects of spontaneous canine prostate carcinoma: A retrospective analysis of 76 cases. **The Prostate**, v. 45, n. 2, p. 173–183, 1 out. 2000.
- DAN, H. C. et al. Akt-dependent Activation of mTORC1 Complex Involves Phosphorylation of mTOR (Mammalian Target of Rapamycin) by I κ B Kinase α (IKK α). **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 36, p. 25227–25240, 5 set. 2014.
- DE MARZO, A. M. et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 4, p. 256–269, abr. 2007.
- DEMOULIN, J.-B.; ESSAGHIR, A. PDGF receptor signaling networks in normal and cancer cells. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 25, n. 3, p. 273–283, jun. 2014.
- DI LORENZO, G. et al. Expression of proto-oncogene c-kit in high risk prostate cancer. **European Journal of Surgical Oncology (EJSO)**, v. 30, n. 9, p. 987–992, nov. 2004.
- DIBBLE, C. C.; CANTLEY, L. C. Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 9, p. 545–555, 1 set. 2015.
- DIBBLE, C. C.; MANNING, B. D. Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output. **Nature Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 555–564, 3 jun. 2013.
- DORSO, L. et al. Variability in weight and histological appearance of the prostate of beagle dogs used in toxicology studies. **Toxicologic pathology**, v. 36, p. 917–925, 2008.
- EDLING, C. E.; HALLBERG, B. c-Kit—A hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 11, p. 1995–1998, jan. 2007.

- ELLEM, S. J.; DE-JUAN-PARDO, E. M.; RISBRIDGER, G. P. In vitro modeling of the prostate cancer microenvironment. **Advanced drug delivery reviews**, v. 79–80, p. 214–21, 15 dez. 2014.
- FIGUEIRA, M. I. et al. Estrogens down-regulate the stem cell factor (SCF)/c-KIT system in prostate cells: Evidence of antiproliferative and proapoptotic effects. **Biochemical Pharmacology**, p. 10–13, nov. 2015.
- FONSECA-ALVES, C. E. et al. Evidence of epithelial–mesenchymal transition in canine prostate cancer metastasis. **Research in Veterinary Science**, v. 100, p. 176–181, jun. 2015.
- FONSECA-ALVES, C. E. et al. Investigation of c-KIT and Ki67 expression in normal, preneoplastic and neoplastic canine prostate. **BMC Veterinary Research**, v. 13, n. 1, p. 380, 6 dez. 2017.
- GALLICK, G. E. et al. Small-molecule protein tyrosine kinase inhibitors for the treatment of metastatic prostate cancer. **Future Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 107–119, jan. 2012.
- GANAPATHY, V.; MOGHE, P. V.; ROTH, C. M. Targeting tumor metastases: Drug delivery mechanisms and technologies. **Journal of Controlled Release**, v. 219, p. 215–223, dez. 2015.
- GLÜCK, A. A. et al. Interplay between receptor tyrosine kinases and hypoxia signaling in cancer. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 62, p. 101–114, maio 2015.
- GOCEK, E.; MOULAS, A. N.; STUDZINSKI, G. P. Non-receptor protein tyrosine kinases signaling pathways in normal and cancer cells. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 51, n. 3, p. 125–137, 22 jun. 2014.
- GORDON, I. K.; KHANNA, C. Modeling Opportunities in Comparative Oncology for Drug Development. **ILAR Journal**, v. 51, n. 3, p. 214–220, 1 jan. 2010.
- GORDON, I. K.; YE, F.; KENT, M. S. Evaluation of the mammalian target of rapamycin pathway and the effect of rapamycin on target expression and cellular proliferation in osteosarcoma cells from dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 69, n. 8, p. 1079–1084, ago. 2008a.
- GORDON, I. K.; YE, F.; KENT, M. S. Evaluation of the mammalian target of rapamycin pathway and the effect of rapamycin on target expression and cellular proliferation in osteosarcoma cells from dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 69, n. 8, p. 1079–1084, ago. 2008b.

- GOTINK, K. J.; VERHEUL, H. M. W. Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? **Angiogenesis**, v. 13, n. 1, p. 1–14, 11 mar. 2010.
- GSCHWIND, A.; FISCHER, O. M.; ULLRICH, A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 5, p. 361–370, 1 maio 2004.
- GUPTA, G. P.; MASSAGUÉ, J. Cancer Metastasis: Building a Framework. **Cell**, v. 127, n. 4, p. 679–695, 17 nov. 2006.
- HACKSHAW-MCGEAGH, L. E. et al. A systematic review of dietary, nutritional, and physical activity interventions for the prevention of prostate cancer progression and mortality. **Cancer Causes & Control**, v. 26, n. 11, p. 1521–1550, 9 nov. 2015.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.
- HAUSCH, F. et al. FKBP5 and the Akt/mTOR pathway. **Cell Cycle**, v. 12, n. 15, p. 2366–2370, 28 ago. 2013.
- HEINRICH, M. C. et al. Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 20, n. 6, p. 1692–703, 15 mar. 2002.
- HELDIN, C.-H. Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. **Cell Communication and Signaling**, v. 11, n. 1, p. 97, 2013.
- HENSEL, J.; THALMANN, G. N. Biology of Bone Metastases in Prostate Cancer. **Urology**, jan. 2016.
- HICKLIN, D. J.; ELLIS, L. M. Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 5, p. 1011–1027, 10 fev. 2005.
- HOEFFER, C. A.; KLANN, E. mTOR signaling: At the crossroads of plasticity, memory and disease. **Trends in Neurosciences**, v. 33, n. 2, p. 67–75, fev. 2010.
- HOFER, M. D. et al. Expression of the Platelet-Derived Growth Factor Receptor in Prostate Cancer and Treatment Implications with Tyrosine Kinase Inhibitors. **Neoplasia**, v. 6, n. 5, p. 503–512, set. 2004.
- HOJJAT-FARSANGI, M. Small-molecule inhibitors of the receptor tyrosine

- kinases: promising tools for targeted cancer therapies. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 8, p. 13768–801, 8 ago. 2014.
- HSIEH, A. C. et al. Cell type-specific abundance of 4EBP1 primes prostate cancer sensitivity or resistance to PI3K pathway inhibitors. **Science Signaling**, v. 8, n. 403, p. ra116–ra116, 17 nov. 2015.
- HSING, A. W.; DEVESA, S. S. Trends and Patterns of Prostate Cancer: What Do They Suggest? **Epidemiologic Reviews**, v. 23, n. 1, p. 3–13, 1 jan. 2001.
- HUANG, B. et al. SCF-mediated mast cell infiltration and activation exacerbate the inflammation and immunosuppression in tumor microenvironment. **Blood**, v. 112, n. 4, p. 1269–1279, 13 maio 2008.
- HUBBARD, S. R.; MILLER, W. T. Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 19, n. 2, p. 117–123, abr. 2007.
- HWANG, C.; HEATH, E. I. Angiogenesis inhibitors in the treatment of prostate cancer. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 3, n. 1, p. 26, 2010.
- INCA. **Estimativa 2020. Incidência de câncer no Brasil**. [s.l: s.n.].
- ITOU, J. et al. Data of a fluorescent imaging-based analysis of anti-cancer drug effects on three-dimensional cultures of breast cancer cells. **Data in Brief**, v. 5, p. 429–433, dez. 2015.
- JE, Y.; SCHUTZ, F. A.; CHOUEIRI, T. K. Risk of bleeding with vascular endothelial growth factor receptor tyrosine-kinase inhibitors sunitinib and sorafenib: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. **The Lancet Oncology**, v. 10, n. 10, p. 967–974, out. 2009.
- JHANWAR-UNIYAL, M. et al. Diverse signaling mechanisms of mTOR complexes: mTORC1 and mTORC2 in forming a formidable relationship. **Advances in Biological Regulation**, v. 72, n. April, p. 51–62, maio 2019.
- JOSHI, G. et al. Growth factors mediated cell signalling in prostate cancer progression: Implications in discovery of anti-prostate cancer agents. **Chemico-Biological Interactions**, v. 240, p. 120–133, out. 2015.
- KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 6, p. 1420–1428, 1 jun. 2009.
- KARLSSON, L. et al. Abnormal gastrointestinal development in PDGF-A and PDGFR-(alpha) deficient mice implicates a novel mesenchymal structure with

- putative instructive properties in villus morphogenesis. **Development (Cambridge, England)**, v. 127, n. 16, p. 3457–66, ago. 2000.
- KELLER, J. M. et al. A novel canine model for prostate cancer. **The Prostate**, v. 73, n. 9, p. 952–959, jun. 2013.
- KENNEDY, B. K.; LAMMING, D. W. The Mechanistic Target of Rapamycin: The Grand Conductor of Metabolism and Aging. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 6, p. 990–1003, 14 jun. 2016.
- KENT, M. S.; COLLINS, C. J.; YE, F. Activation of the AKT and mammalian target of rapamycin pathways and the inhibitory effects of rapamycin on those pathways in canine malignant melanoma cell lines. **American Journal of Veterinary Research**, v. 70, n. 2, p. 263–269, fev. 2009.
- KHAN, M. et al. Role of Epithelial Mesenchymal Transition in Prostate Tumorigenesis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n. 10, p. 1240–1248, 3 fev. 2015.
- KHANNA, C.; GORDON, I. Catching Cancer by the Tail: New Perspectives on the Use of Kinase Inhibitors. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 11, p. 3645–3647, 1 jun. 2009.
- KILVAER, T. K. et al. The VEGF- and PDGF-family of angiogenic markers have prognostic impact in soft tissue sarcomas arising in the extremities and trunk. **BMC clinical pathology**, v. 14, p. 5, 2014.
- KIM, Y. C.; GUAN, K.-L. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 1, p. 25–32, 2 jan. 2015.
- KOBAYASHI, P. E. et al. Deregulation of E-cadherin, β -catenin, APC and Caveolin-1 expression occurs in canine prostate cancer and metastatic processes. **Research in Veterinary Science**, v. 118, p. 254–261, jun. 2018.
- KONG, D. et al. Epithelial to Mesenchymal Transition Is Mechanistically Linked with Stem Cell Signatures in Prostate Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, p. e12445, 27 ago. 2010.
- KRAMER, N. et al. In vitro cell migration and invasion assays. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 752, n. 1, p. 10–24, 1 jan. 2013.
- KRAUSE, D. S.; VAN ETTEN, R. A. Tyrosine Kinases as Targets for Cancer Therapy. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 2, p. 172–187, 14 jul. 2005.

- LAMMIE, A. et al. Expression of c-kit and kit ligand proteins in normal human tissues. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 42, n. 11, p. 1417–1425, 5 nov. 1994.
- LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 122, n. 20, p. 3589–3594, 2009.
- LARSON, J. C. et al. Pharmacokinetics of orally administered low-dose rapamycin in healthy dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 77, n. 1, p. 65–71, jan. 2016.
- LEAV, I. et al. Role of canine basal cells in prostatic post natal development, induction of hyperplasia, sex hormone-stimulated growth; and the ductal origin of carcinoma. **The Prostate**, v. 47, n. 3, p. 149–163, 15 maio 2001.
- LEBLANC, A. K. et al. PRELIMINARY EVALUATION OF SERIAL 18FDG-PET/CT TO ASSESS RESPONSE TO TOCERANIB PHOSPHATE THERAPY IN CANINE CANCER. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 53, n. 3, p. 348–357, fev. 2012.
- LEMMON, M. A.; SCHLESSINGER, J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. **Cell**, v. 141, n. 7, p. 1117–1134, jun. 2010.
- LENNARTSSON, J.; RONNSTRAND, L. Stem Cell Factor Receptor/c-Kit: From Basic Science to Clinical Implications. **Physiological Reviews**, v. 92, n. 4, p. 1619–1649, 1 out. 2012.
- LEROY, B. E.; NORTHRUP, N. Prostate cancer in dogs: Comparative and clinical aspects. **The Veterinary Journal**, v. 180, n. 2, p. 149–162, maio 2009.
- LI, J. et al. The mTOR Signaling Pathway is an Emerging Therapeutic Target in Multiple Myeloma. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 1, p. 125–135, 31 jan. 2014.
- LI, L.; LI, W. Epithelial–mesenchymal transition in human cancer: Comprehensive reprogramming of metabolism, epigenetics, and differentiation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 150, p. 33–46, jun. 2015.
- LI, X. et al. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 22, p. 33440–33450, 31 maio 2016.
- LIANG, J. et al. The C-Kit receptor-mediated signal transduction and tumor-related diseases. **International Journal of Biological Sciences**, v. 9, p. 435–443, 2013.
- LONDON, C. A. Tyrosine Kinase Inhibitors in Veterinary Medicine. **Topics in**

Companion Animal Medicine, v. 24, n. 3, p. 106–112, ago. 2009.

LONDON, C. A et al. Phase I dose-escalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with spontaneous malignancies. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 9, n. 7, p. 2755–68, jul. 2003.

LONG, T. J. et al. Prostate cancer xenografts engineered from 3D precision-porous poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels as models for tumorigenesis and dormancy escape. **Biomaterials**, v. 35, n. 28, p. 8164–8174, set. 2014.

LOPICCOLO, J. et al. **Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: Effective combinations and clinical considerations** *Drug Resistance Updates*, fev. 2008.

MABUCHI, S. et al. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 137, n. 1, p. 173–179, abr. 2015.

MANLEY, P. W. et al. Imatinib: a selective tyrosine kinase inhibitor. **European Journal of Cancer**, v. 38, p. S19–S27, set. 2002.

MARCUCCI, F.; STASSI, G.; DE MARIA, R. Epithelial-mesenchymal transition: A new target in anticancer drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 5, p. 311–325, 2016.

MENG, L.; ZHENG, X. S. Toward rapamycin analog (rapalog)-based precision cancer therapy. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 36, n. 10, p. 1163–1169, 24 out. 2015.

MOCELLIN, S. et al. Tyrosine kinase inhibitor therapies for gastrointestinal stromal tumours. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2018, n. 2, 15 fev. 2018.

MOENS, S. et al. The multifaceted activity of VEGF in angiogenesis – Implications for therapy responses. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 25, n. 4, p. 473–482, 2014.

MORIKAWA, S. et al. Abnormalities in Pericytes on Blood Vessels and Endothelial Sprouts in Tumors. **The American Journal of Pathology**, v. 160, n. 3, p. 985–1000, mar. 2002.

MUKHERJI, D. et al. Angiogenesis and anti-angiogenic therapy in prostate cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 87, n. 2, p. 122–131, ago. 2013.

- MURAI, A. et al. Immunohistochemical Analysis of the Akt/mTOR/4E-BP1 Signalling Pathway in Canine Haemangiomas and Haemangiosarcomas. **Journal of Comparative Pathology**, v. 147, n. 4, p. 430–440, nov. 2012a.
- MURAI, A. et al. Immunohistochemical Analysis of the Akt/mTOR/4E-BP1 Signalling Pathway in Canine Haemangiomas and Haemangiosarcomas. **Journal of Comparative Pathology**, v. 147, n. 4, p. 430–440, nov. 2012b.
- NAJY, A. J. et al. Differential tumorigenic potential and matriptase activation between PDGF B versus PDGF D in prostate cancer. **Molecular cancer research : MCR**, v. 10, n. 8, p. 1087–97, 1 ago. 2012.
- NASR, A. et al. Molecular Docking studies of FKBP12-mTOR inhibitors using binding predictions. **Bioinformatics**, v. 11, n. 6, p. 307–315, 30 jun. 2015.
- NISHIDA, T.; DOI, T.; NAITO, Y. Tyrosine kinase inhibitors in the treatment of unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 15, n. 14, p. 1979–1989, 3 out. 2014.
- NIU, N.; WANG, L. In vitro human cell line models to predict clinical response to anticancer drugs. **Pharmacogenomics**, v. 16, n. 3, p. 273–285, mar. 2015.
- NIU, Y.-N.; XIA, S.-J. Stroma–epithelium crosstalk in prostate cancer. **Asian Journal of Andrology**, v. 11, n. 1, p. 28–35, jan. 2009.
- OH, W. J.; JACINTO, E. mTOR complex 2 signaling and functions. **Cell Cycle**, v. 10, n. 14, p. 2305–2316, 15 jul. 2011.
- OJEMUYIWA, M. A.; MADAN, R. A.; DAHUT, W. L. Tyrosine kinase inhibitors in the treatment of prostate cancer: taking the next step in clinical development. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 19, n. 4, p. 459–470, dez. 2014.
- ÖSTMAN, A. PDGF receptors in tumor stroma: Biological effects and associations with prognosis and response to treatment. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 121, p. 117–123, nov. 2017.
- PAN, X. et al. Safety evaluation of combination CCNU and continuous toceranib phosphate (Palladia®) in tumour-bearing dogs: a phase I dose-finding study. **Veterinary and comparative oncology**, p. n/a-n/a, 16 abr. 2014.
- PARONETTO, M. P. et al. Expression of a Truncated Form of the c-Kit Tyrosine Kinase Receptor and Activation of Src Kinase in Human Prostatic Cancer. **The American Journal of Pathology**, v. 164, n. 4, p. 1243–1251, abr. 2004.
- PAUL, M. K.; MUKHOPADHYAY, A. K. Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer. **International Journal of Medical Sciences**, v. 1, n. 283, p. 101–

115, 2004.

PELLIN, M. A. et al. Safety evaluation of combination doxorubicin and toceranib phosphate (Palladia®) in tumour bearing dogs: a phase I dose-finding study.

Veterinary and Comparative Oncology, v. 15, n. 3, p. 919–931, set. 2017.

PENNOCK, S.; KAZLAUSKAS, A. Vascular Endothelial Growth Factor A Competitively Inhibits Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)-Dependent Activation of PDGF Receptor and Subsequent Signaling Events and Cellular Responses. **Molecular and Cellular Biology**, v. 32, n. 10, p. 1955–1966, 15 maio 2012.

PINHO, S. S. et al. Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. **Translational Research**, v. 159, n. 3, p. 165–172, mar. 2012.

POTENTE, M.; GERHARDT, H.; CARMELIET, P. Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis. **Cell**, v. 146, n. 6, p. 873–887, set. 2011.

QIN, X.; JIANG, B.; ZHANG, Y. 4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein. **Cell Cycle**, v. 15, n. 6, p. 781–786, 18 mar. 2016.

QIU, F. H. et al. Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family--oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus. **The EMBO journal**, v. 7, n. 4, p. 1003–11, abr. 1988.

RAJABI, M.; MOUSA, S. The Role of Angiogenesis in Cancer Treatment. **Biomedicines**, v. 5, n. 4, p. 34, 21 jun. 2017.

RAMIREZ-RANGEL, I. et al. Regulation of mTORC1 Complex Assembly and Signaling by GRp58/ERp57. **Molecular and Cellular Biology**, v. 31, n. 8, p. 1657–1671, 15 abr. 2011.

RANIERI, G. et al. Tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in human and pet tumours with special reference to breast cancer: A comparative review. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 88, n. 2, p. 293–308, nov. 2013.

REARDON, D. A. et al. Phase II Study of Imatinib Mesylate Plus Hydroxyurea in Adults With Recurrent Glioblastoma Multiforme. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 36, p. 9359–9368, 20 dez. 2005.

RIVERA-CALDERÓN, L. G. et al. Alterations in PTEN, MDM2, TP53 and AR protein and gene expression are associated with canine prostate carcinogenesis. **Research in Veterinary Science**, v. 106, p. 56–61, jun. 2016.

RIVERA-CALDERÓN, L. G. et al. p-mTOR, p-4EBP-1 and eIF4E expression in

canine prostatic carcinoma. **Research in Veterinary Science**, v. 122, n. November 2018, p. 86–92, fev. 2019a.

RIVERA-CALDERÓN, L. G. et al. p-mTOR, p-4EBP-1 and eIF4E expression in canine prostatic carcinoma. **Research in Veterinary Science**, v. 122, p. 86–92, 1 fev. 2019b.

ROBAT, C. et al. Safety evaluation of combination vinblastine and toceranib phosphate (Palladia®) in dogs: a phase I dose-finding study. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 10, n. 3, p. 174–183, set. 2012.

ROBERTS, E.; COSSIGNY, D. A. F.; QUAN, G. M. Y. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Metastatic Prostate Cancer to the Skeleton. **Prostate Cancer**, v. 2013, n. 5, p. 1–8, out. 2013.

ROSKOSKI, R. Signaling by Kit protein-tyrosine kinase—The stem cell factor receptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 337, n. 1, p. 1–13, nov. 2005.

ROSKOSKI, R. Sunitinib: a VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 356, n. 2, p. 323–8, 4 maio 2007.

ROSKOSKI, R. A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. **Pharmacological Research**, v. 100, p. 1–23, 1 out. 2015.

RUSSELL, M. R. et al. The α -Receptor for Platelet-Derived Growth Factor Confers Bone-Metastatic Potential to Prostate Cancer Cells by Ligand- and Dimerization-Independent Mechanisms. **Cancer Research**, v. 70, n. 10, p. 4195–4203, 15 maio 2010.

RUSSO, G. I. et al. Intratumoral Heterogeneity Determines the Expression of mTOR-pathway Proteins in Prostate Cancer. **Disease Markers**, v. 2019, p. 1–8, 11 dez. 2019.

SÁNCHEZ-CÉSPEDES, R. et al. In vitro and in vivo effects of toceranib phosphate on canine osteosarcoma cell lines and xenograft orthotopic models. **Veterinary and Comparative Oncology**, n. May, p. vco.12562, 15 dez. 2019.

SARBASSOV, D. D. et al. Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. **Molecular Cell**, v. 22, n. 2, p. 159–168, 2006.

SCHLESSINGER, J. Receptor Tyrosine Kinases: Legacy of the First Two Decades. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 3, p. a008912–a008912, 1 mar. 2014.

- SHI, X. et al. Distinct cellular properties of oncogenic KIT receptor tyrosine kinase mutants enable alternative courses of cancer cell inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 33, p. E4784–E4793, 16 ago. 2016.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2018. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 1, p. 7–30, jan. 2018.
- SMITH, J. Canine prostatic disease: A review of anatomy, pathology, diagnosis, and treatment. **Theriogenology**, v. 70, p. 375–383, 2008.
- SORENMO, K. U. et al. Evaluation of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 expression and the effect of cyclooxygenase inhibitors in canine prostatic carcinoma. **Veterinary and comparative oncology**, v. 2, n. 1, p. 13–23, mar. 2004.
- SORIANO, P. The PDGF alpha receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites. **Development (Cambridge, England)**, v. 124, n. 14, p. 2691–700, jul. 1997.
- STOMMEL, J. M. et al. Coactivation of Receptor Tyrosine Kinases Affects the Response of Tumor Cells to Targeted Therapies. **Science**, v. 318, n. 5848, p. 287–290, 12 out. 2007.
- SUN, C.; BERNARDS, R. Feedback and redundancy in receptor tyrosine kinase signaling: relevance to cancer therapies. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 10, p. 465–474, out. 2014.
- SUN, F.; BÁEZ-DÍAZ, C.; SÁNCHEZ-MARGALLO, F. M. Canine prostate models in preclinical studies of minimally invasive interventions: part II, benign prostatic hyperplasia models. **Translational Andrology and Urology**, v. 6, n. 3, p. 547–555, jun. 2017.
- TEMPLETON, A. J. et al. Prognostic relevance of receptor tyrosine kinase expression in breast cancer: A meta-analysis. **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, n. 9, p. 1048–1055, out. 2014.
- TESKE, E. et al. Canine prostate carcinoma: epidemiological evidence of an increased risk in castrated dogs. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 197, n. 1–2, p. 251–255, nov. 2002.
- TINDALL, D.; LONERGAN, P. Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. **Journal of Carcinogenesis**, v. 10, n. 1, p. 20, 2011.

- TOYOTA, M. et al. Complementary DNA cloning and characterization of truncated form of c-kit in human colon carcinoma cells. **Cancer research**, v. 54, n. 1, p. 272–5, 1 jan. 1994.
- VAN DE MERBEL, A. F. et al. Protocols for Migration and Invasion Studies in Prostate Cancer. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1786, p. 67–79, 2018.
- VÉZINA, C.; KUDELSKI, A.; SEHGAL, S. N. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. **The Journal of Antibiotics**, v. 28, n. 10, p. 721–726, 1975.
- VICENTINI, C. et al. Prostate cancer cell proliferation is strongly reduced by the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 in vitro on human cell lines and primary cultures. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 129, n. 3, p. 165–74, mar. 2003.
- WANG, N.; JAIN, R. K.; BATCHELOR, T. T. New Directions in Anti-Angiogenic Therapy for Glioblastoma. **Neurotherapeutics**, v. 14, n. 2, p. 321–332, 12 abr. 2017.
- WANG, Z. et al. Broad targeting of angiogenesis for cancer prevention and therapy. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. S224–S243, dez. 2015.
- WEAVER, A. D. Fifteen cases of prostatic carcinoma in the dog. **Veterinary Record**, v. 109, n. 4, p. 71 LP – 75, 25 jul. 1981.
- WEI, J. et al. Overexpression of vimentin contributes to prostate cancer invasion and metastasis via src regulation. **Anticancer research**, v. 28, n. 1A, p. 327–34, 2008.
- WERGIN, M. C.; KASER-HOTZ, B. Plasma vascular endothelial growth factor (VEGF) measured in seventy dogs with spontaneously occurring tumours. **In vivo (Athens, Greece)**, v. 18, n. 1, p. 15–9, 2004.
- WIESNER, C. et al. C-Kit and Its Ligand Stem Cell Factor: Potential Contribution to Prostate Cancer Bone Metastasis. **Neoplasia**, v. 10, n. 9, p. 996–1003, set. 2008.
- WOZNEY, J. L.; ANTONARAKIS, E. S. Growth factor and signaling pathways and their relevance to prostate cancer therapeutics. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 33, n. 2–3, p. 581–594, 9 set. 2014.
- XIE, J.; WANG, X.; PROUD, C. G. mTOR inhibitors in cancer therapy.

F1000Research, v. 5, p. 2078, 25 ago. 2016.

YANG, H. et al. mTOR kinase structure, mechanism and regulation. **Nature**, v. 497, n. 7448, p. 217–223, 1 maio 2013.

YU, P. et al. NSK-01105, a Novel Sorafenib Derivative, Inhibits Human Prostate Tumor Growth via Suppression of VEGFR2/EGFR-Mediated Angiogenesis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–19, 31 dez. 2014.

ZEMKE, D.; YAMINI, B.; YUZBASİYAN-GURKAN, V. Mutations in the Juxtamembrane Domain of c- KIT Are Associated with Higher Grade Mast Cell Tumors in Dogs. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 5, p. 529–535, 26 set. 2002.

ZHANG, Y. et al. A Pan-Cancer Proteogenomic Atlas of PI3K/AKT/mTOR Pathway Alterations. **Cancer Cell**, v. 31, n. 6, p. 820- 832.e3, 12 jun. 2017.

ZHOU, H.; HUANG, S. The Complexes of Mammalian Target of Rapamycin. **Current Protein & Peptide Science**, v. 11, n. 6, p. 409–424, 1 set. 2010.