

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 29/07/2024.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – JÚLIO DE MESQUITA FILHO||
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**Avaliação da heterogeneidade da expressão de HER-2 e efeito
antitumoral do Lapatinibe em Osteossarcomas caninos**

MAYARA SIMÃO FRANZONI

Botucatu –
SP Julho
2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**Avaliação da heterogeneidade da expressão de HER-2 e efeito
antitumoral do Lapatinibe em Osteossarcomas caninos**

MAYARA SIMÃO FRANZONI

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia Animal da Faculdade
de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade
Estadual Paulista como pré-
requisito para obtenção do título de
Mestre

Orientador: Dr. Carlos Eduardo
Fonseca Alves

Coorientador: Dra. Renee Laufer Amorim

Botucatu –
SP Julho
2022

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

Franzoni, Mayara Simão.

Avaliação da heterogeneidade da expressão de HER-2 e
efeito antitumoral do Lapatinibe em osteossarcomas caninos
/ Mayara Simão Franzoni. - Botucatu, 2022

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

Orientador: Carlos Eduardo Fonseca Alvez

Coorientador: Renee Laufer Amorim

Capes: 50501003

1. Cães - Doenças. 2. Heterogeneidade genética.
3. Osteossarcoma. 4. Lapatinibe. 5. Genes erbB-2.

Palavras-chave: HER-2; Lapatinibe; Osteossarcoma.

Nome do autor (a): Mayara Simão Franzoni

Título: AVALIAÇÃO DA HETEROGENEIDADE DA EXPRESSÃO DE HER-2 E EFEITO ANTITUMORAL DO LAPATINIBE EM OSTEOSARCOMAS CANINOS

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca

Presidente e Orientador

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal FMVZ - UNESP - Botucatu /SP

Prof. Dr. Denner Santos dos Anjos

Membro

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária FCAV - UNESP - Jaboticabal /SP

Profa. Dra. Marxa Leão Figueiredo

Membro

Department of Basic Medical Sciences - Purdue University

Data da Defesa: 29 de julho de 2022.

DEDICO aos meus pais (Marcia Helena Simão Franzoni e Valmir Franzoni), que sempre se fizeram presentes mesmo com a distância física.

AGRADECIMENTOS

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001".

Agradeço primeiramente a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), que concedeu apoio ao projeto (processo n.º2019_24468-8), e possibilitou o desenvolvimento deste estudo da melhor maneira possível, corroborando sempre com o desenvolvimento da pesquisa no país.

Agradeço também aos meus pais, Marcia e Valmir, por todo e qualquer tipo de apoio concedido ao longo dessa jornada na Medicina Veterinária, eles foram e são fundamentais para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Meus mais sinceros agradecimentos ao meu querido orientador Carlos Eduardo Fonseca Alves, que admiro infinitamente tanto na atuação profissional quanto pessoal, acredito que pessoas como ele mudam o mundo e acima de tudo, mudam nossa profissão.

Aos integrantes do nosso grupo de pesquisa do Setor de Patologia Animal do Hospital Veterinário da UNESP Botucatu - SP, essas pessoas que além de parceiros de projetos, tornaram-se amigos que serão lembrados sempre com muito carinho, agradeço principalmente a Patrícia de Faria Lainetti, Antonio Fernando Leis Filho e ao Luíz Guilherme Dércore Benevenuto que me acompanharam e auxiliaram em todas as etapas do projeto, e foram responsáveis por toda a leveza e sucesso durante esse período.

Além disso, agradeço aos amigos que graças a Medicina Veterinária eu tive o prazer de conhecer, excelentes profissionais que eu admiro da maneira mais bela possível: Fernanda Fiorani, Caroline Medeiros, Eloise Carbajo, Gabriela de Sousa, Alexandre Battazza, Thayna de Oliveira, Fernanda Zuliani, Mariana Sampaio, Ester Vieira, Cristianne Dantas, Maurício Mariani, Isadora Mestriner e Geovane Pereira, Gustavo Calheiros.

Por fim, mas não menos importante, agradeço aos meus amigos de infância, que se mostraram pacientes e um ponto de apoio nos momentos que eu mais precisei: Bruna Scaglia, Leonardo dos Santos e Marina Avila, agradeço por me acompanharem há 18 anos sem falhar.

“Tudo pode morrer, exceto o amor. Só o amor merece a imortalidade dentro de nós”.

Ana Claudia Quintana Arantes

SUMÁRIO

ABSTRACT	<i>ii</i>
CAPÍTULO 1.....	<i>ii</i>
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	<i>1</i>
2. REVISÃO DA LITERATURA	<i>2</i>
2.1 Osteossarcoma	2
2.2 Sinais clínicos e diagnósticos.....	3
2.3 Classificação histopatológica do osteossarcoma	6
2.4 Fatores prognósticos.....	7
2.5 Tratamento e prognóstico	8
2.6 HER-2	9
2.7 Lapatinibe	10
2.8 Imunohistoquímica.....	12
2.9. Cultura celular	13
REFERÊNCIAS	<i>14</i>
HIPÓTESE	<i>20</i>
OBJETIVOS.....	<i>20</i>
CAPÍTULO 2.....	<i>21</i>
ARTIGO I*.....	<i>22</i>
Abstract	<i>23</i>
1. INTRODUÇÃO.....	<i>24</i>
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	<i>25</i>
2.1 Design do estudo	25
2.2 Exame histopatológico	26
2.3 Imunohistoquímica.....	27
2.4 Análise estatística	28
3. RESULTADOS	<i>30</i>
3.1 Características clínicas.....	30
3.2 Avaliações histopatológicas.....	31
3.3 Imunohistoquímica.....	35
3.4 Análise multivariada dos dados histopatológicos e da expressão de HER-2..	39

4. DISCUSSÃO.....	42
5. CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS	48
CAPÍTULO 3.....	52
ARTIGO II*.....	53
RESUMO	54
1. INTRODUÇÃO.....	55
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
2.1 Coletas das amostras para cultura celular	57
2.2 Exame histopatológico	59
2.3 Imunohistoquímica.....	59
2.4 Cultura celular	61
2.4.1. Reagentes	61
2.4.2 Cultivo celular	61
2.4.3 Expansão das culturas primárias.....	62
2.4.4 Avaliação da tumorigenicidade.....	63
2.4.5 Análise morfológica das células por coloração de Hematoxilina.....	63
2.4.6 Análise matriz óssea	64
2.4.7 Ensaio MTT	64
3. RESULTADOS	65
3.1 Cultura celular	65
3.2 Características clínicas, histopatológicas e imunohistoquímicas OSA8	67
3.3 Avaliação da tumorigenicidade	68
3.4 Análise morfológica das células por coloração de Hematoxilina e Alizarina...	68
3.5 Ensaio MTT	70
4. DISCUSSÃO.....	72
5. CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS	74

RESUMO

O câncer é uma importante causa de mortalidade em cães, sendo o osteossarcoma um tipo de neoplasia óssea que tem grande incidência nessa espécie. Pesquisas recentes demonstraram que o HER-2, um receptor de tirosina quinase, é expresso nesse tipo de tumor, e está associado à baixa sobrevida dos pacientes e resistência quimioterápica. Além disso, estimula a diferenciação celular, migração, apoptose e angiogênese. Portanto, o bloqueio desta via pode impedir a diferenciação e a migração celular, induzir apoptose das células neoplásicas e diminuir a angiogênese. O objetivo desse estudo foi avaliar a marcação do HER-2 intra e inter-tumoral através da imuno-histoquímica em 20 amostras de osteossarcoma de esqueleto apendicular canino, e correlacionar esses dados com os aspectos clínicos e histopatológicos. Como resultado foi observado que o maior escore de marcação e coloração desse marcador pode ser correlacionado aos aspectos negativos dos pacientes, além disso, há heterogeneidade intratumoral foi significativa tanto em características histopatológicas quanto de marcação do HER-2, situação que deve ser considerada para estabelecer novas condutas terapêuticas para o osteossarcoma, pois apenas um fragmento de biópsia pode não ser significativo para o todo.

Palavras-chave: osteossarcoma, HER-2, lapatinibe.

ABSTRACT

Cancer is one of the most important causes of death in dogs, and osteosarcoma is a type of bone cancer with high incidence in dogs. Recent studies has shown that HER-2, a tyrosine kinase receptor, is expressed in canine osteosarcoma, and is associated with poor overall survival and chemotherapy resistance. In addition to stimulating cell differentiation, migration, apoptosis and angiogenesis. Therefore blocking HER2 pathway may prevent cell differentiation and migration, induce neoplastic cell apoptosis and decrease angiogenesis. The aim of this study was to evaluate intra and inter-tumor HER-2 labeling through immunohistochemistry, and to correlate these data with clinical and histopathological aspects. We observed that the highest score of marking and staining of this marker can be correlated with the negative aspects of the patients, in addition, intratumoral heterogeneity was significant both in histopathological characteristics and in HER-2 marking, a situation that should be considered to establish new therapeutic approaches for osteosarcoma, as only a biopsy fragment may not be significant for the whole.

Keywords: osteosarcoma, HER-2, lapatinibe.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O câncer é a principal causa de mortalidade em cães, seguido de traumas, doenças locomotoras e, por fim, neurológicas (BONNETT et al., 2005). Devido à importância e impacto causados pelas doenças oncológicas nos animais, atualmente há maior foco para o desenvolvimento de novos tratamentos e manejo dos indivíduos acometidos (RANIERI et al., 2013, GRÜNTZIG et al., 2015).

O cão pode ser considerado um modelo comparado para auxiliar na compreensão e tratamento das doenças desenvolvidas em humanos (PINHO et al., 2012). Em cães, a incidência do osteossarcoma difere de acordo com as raças, e pode variar de 0,2 a 8% de todos os tipos de neoplasias que essa espécie pode desenvolver, sendo a incidência em relação aos humanos, vinte e sete vezes maior (EGENVALL et al., 2007).

Pesquisas recentes têm demonstrado a superexpressão de HER-2 em osteossarcomas humanos e caninos (MASON et al., 2016, STROUD et al., 2016), esse receptor apresenta superexpressão em carcinomas de mama, próstata, pâncreas e de trato gastrointestinal, além de ser relacionado a um prognóstico desfavorável (WARREN et al., 2006). Em osteossarcoma canino esse receptor também pode ser associado à baixa resposta quimioterápica e menor sobrevida global (ZHOU et al., 2003, RAINUSSO et al., 2012).

Em relação ao tratamento para a espécie canina, a cirurgia para remoção do tumor, comumente a amputação do membro acometido, é associada à quimioterapia (MORELLO et al., 2011, SELMIC et al., 2014), que atualmente envolve doxorrubicina ou carboplatina. Considerando a importância do HER-2 no osteossarcoma canino, o Lapatinibe pode ser considerado uma possibilidade de tratamento, pois proporciona uma ligação reversível e citoplasmática do domínio da tirosina quinase, e consequentemente, há o bloqueio da fosforilação do receptor e inibição de toda a cascata de fosforilação desse receptor (LACKEY, 2006).

Assim, a presente pesquisa pretende investigar a expressão de HER-2 em amostras de osteossarcomas caninos de esqueleto apendicular, avaliando a heterogeneidade intra-tumoral da expressão de HER-2, bem como avaliar o efeito

antitumoral do Lapatinibe em células de osteossarcomas caninos, comparado ao efeito antitumoral da doxorrubicina, que atualmente é o fármaco mais utilizado nos protocolos quimioterápicos para osteossarcomas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Osteossarcoma

Na espécie canina as neoplasias ósseas malignas são mais frequentes do que as formações benignas nesse órgão, diferentemente do que ocorre na espécie humana (BRODEY, 1979). Dentre os possíveis diagnósticos de neoplasias ósseas malignas primárias em cães, o osteossarcoma apresenta maior prevalência, cerca de 90% dos casos, enquanto hemangiossarcoma, condrossarcoma, lipossarcoma e fibrossarcoma também podem ser observados, porém em menor frequência (DERNELL et al., 2001, EGENVALL et al., 2007).

Cerca de 90% dos cães diagnosticados com osteossarcoma apresentam micrometástases no momento do diagnóstico, e mesmo com intervenção cirúrgica e quimioterápica vão a óbito em aproximadamente um ano (SELMIC et al., 2014). O sítio de localização mais comum para o aparecimento do osteossarcoma é principalmente em ossos longos, denominado esqueleto apendicular, e essa localização corresponde a 75% de todos os casos (BERG et al., 1992). Em esqueleto apendicular o local de origem mais frequente é o canal medular, e a região metafisária é a mais acometida (STRAW et al., 1990), além de ser mais comum o desenvolvimento em membros torácicos do que em membros pélvicos (MAULDIN et al., 1988).

Em relação à incidência, o osteossarcoma em esqueleto apendicular é mais comum em raças de grande porte e gigante (RU et al., 1998), e existe predisposição racial, como no caso do Pastor Alemão, Golden Retriever, Boxer (BRODEY, 1965), São Bernardo e Rottweiler (SHAPIRO et al., 1988). Há algumas publicações que sugerem machos serem mais acometidos do que fêmeas, na proporção de 1,5:1, porém não há um consenso na literatura que correlacione o sexo com a incidência (MISDORP et al., 1979; KRAEGEL et al., 1991; HAMMER

et al., 1995). Trata-se de um tipo de neoplasia em que a faixa etária média de maior ocorrência é de sete anos (BRODEY & RISER, 1969), mas pode apresentar-se de modo bimodal e acometer cães jovens, entre seis e 18 meses de idade (PHILLIPS et al., 1986).

A etiologia do osteossarcoma não é totalmente elucidada, porém há algumas hipóteses para o seu desenvolvimento em cães, a teoria que justifica o aparecimento em regiões fisárias de ossos longos é o fato de serem ossos que amparam maior peso e dispõem de um fechamento tardio das fises, que principalmente em cães de porte grande, são regiões já predispostas a vários traumas e alto nível de atividade celular, características que podem corroborar para carcinogênese do osteossarcoma (GELLASCH et al., 2002). Outra condição em que foi relatado o diagnóstico de osteossarcoma em cães, foi em fraturas não tratadas, osteossínteses com atraso na consolidação ou não união óssea, além de fraturas associadas a implantes metálicos (ROSIN & ROWLAND, 1981). O fator genético também pode ter relação ao surgimento do osteossarcoma, como alterações no gene P53, um gene supressor tumoral (JOHNSON et al., 1998).

2.2 Sinais clínicos e diagnósticos

Normalmente os primeiros sinais clínicos associados ao osteossarcoma de esqueleto apendicular são claudicação, dor e aumento de volume no membro acometido (KLEINER & SILVA, 2003). Além disso, devido à obstrução das vias linfáticas adjacentes pelo próprio tumor ou processo inflamatório, há comprometimento do retorno da linfa e, como consequência, aparecimento de edema, evidenciado pelo sinal de —Godetll positivo (KLEINER & SILVA, 2003), como ilustrado na Figura 01. O aumento de volume pode apresentar-se de consistência firme e dolorosa à palpação (CHUN & LORIMIER, 2003).



Figura 01. Osteossarcoma em membro pélvico esquerdo em um cão da raça Golden Retriever utilizado para execução do projeto. Nota-se edema em região proximal do membro (seta azul) e o aumento de volume proximal de tíbia correspondente ao osteossarcoma (seta vermelha). Fonte: Elaboração dos autores.

Sinais clínicos inespecíficos como apatia e anorexia também são comuns, e na presença de metástase pulmonar, dispneia ou tosse podem estar associadas à queixa principal (BRODEY, 1979).

Para o diagnóstico do osteossarcoma deve-se primeiramente considerar histórico, sinais clínicos e exame físico dos pacientes (LAMB, 1990), no entanto há vários exames complementares que podem apoiar o diagnóstico dessa neoplasia. Quanto aos exames de imagens, o exame radiográfico é o mais utilizado para auxiliar ao diagnóstico, e em neoplasias ósseas primárias observam-se padrões líticos ou proliferativos, com consequente perda da organização trabecular óssea. (OGILVIE, 2001). Os ossos longos frequentemente apresentam bordas irregulares devido às lesões osteolíticas, além de outros achados típicos como reações periosteais que se assemelham a —explosão solarll, observadas em cerca de 90%

dos exames radiográficos de osteossarcoma canino (STRAW, 1996), alguns desses achados estão ilustrados na Figura 02.

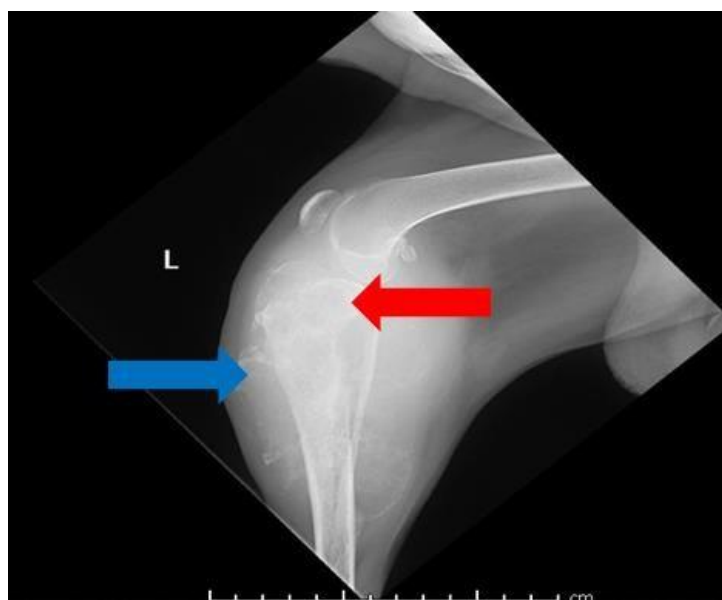


Figura 02. Osteossarcoma em membro pélvico esquerdo em um cão da raça Golden Retriever utilizado para execução do projeto. Pode-se notar lise óssea (seta vermelha) e reações periosteais (seta azul). Fonte: Elaboração dos autores.

A citologia aspirativa por agulha fina faz parte do exame de triagem para auxiliar ao diagnóstico dessa doença, trata-se de um exame rápido, menos invasivo e menos custoso (STRAW, 1996). Os achados observados nas lâminas provenientes desse exame podem incluir presença de células mesenquimais, osteoblastos malignos ou benignos e osteoclastos, desse modo é útil principalmente para exclusão de outros diagnósticos diferenciais, como osteomielite fúngica ou bacteriana (CHUN & LORIMIER, 2003).

O diagnóstico definitivo do osteossarcoma é obtido através do exame histopatológico (LANG & SULZBACHER, 2001), em que a coleta do material pode ser realizada de duas formas: biópsia aberta ou fechada. A biópsia aberta envolve um procedimento cirúrgico mais invasivo, pois há incisão da pele e divulsão do tecido adjacente (STRAW, 1996), e as possíveis consequências desse método são fraturas iatrogênicas e infecção pós-operatória (DERNELL et al., 2001). A biópsia fechada é realizada através de agulhas com maiores diâmetros ou trépanos, e apesar da quantidade de material obtido ser menor em relação ao

fragmento ósseo coletado na biópsia aberta, as complicações pós-operatórias são menores (POWERS et al., 1988).

2.3 Classificação histopatológica do osteossarcoma

O osteossarcoma é considerado uma neoplasia produtora de matriz (STRAW, 1996), a classificação dos subtipos histopatológicos definidos para osteossarcomas caninos, baseia-se na desenvolvida para humanos, essa adaptação foi realizada, pois há muitas características semelhantes entre as duas espécies, como apresentação clínica, comportamento biológico, tipos celulares e propagação metastática (THOMPSON & POOL, 2002).

O osteossarcoma osteoblástico é caracterizado por produção de matriz óssea delimitada por osteoblastos atípicos, e representa a maioria dos casos de osteossarcoma em cães, cerca de 60 a 70% dos diagnósticos (MUFF et al., 2012). No subtipo condroblástico há prevalência de matriz cartilaginosa associada à matriz hialina, enquanto o fibroblástico é descrito em amostras que células fusiformes com fibroblastos atípicos estão presentes em maior parte do corte histológico (CHUN & LORIMIER, 2003).

O osteossarcoma telangiectásico é representado por grande quantidade de capilares ou lacunas sanguíneas desorganizadas, enquanto no indiferenciado há células indiferenciadas e poucos osteóides pela extensão do corte (CHUN & LORIMIER, 2003). Já o osteossarcoma de células gigantes inclui amostras em que há regiões com células neoplásicas gigantes multinucleadas (CHUN & LORIMIER, 2003).

Os osteossarcomas podem ser classificados em graus que variam de 1 a 3, de acordo com a somatória dos escores das características histopatológicas observadas (MOORE et al., 2007), como descrito nas Tabelas 01 e 02.

Tabela 01. Características histopatológicas consideradas para determinação do escore total do osteossarcoma.

Característica histopatológica	Escore	Descrição
Quantidade de matriz	0	Ausente
	1	Escasso
	2	Moderado
	3	Abundante
Quantidade de necrose	0	Ausente
	1	Escasso
	2	Moderado
	3	Abundante
Pleomorfismo nuclear	1	Leve
	2	Moderado
	3	Grave
Tamanho nuclear	0	Pequeno
	1	Médio
	2	Grande
Número nuclear	0	Único
	1	Múltiplo
Mitose (10 campos 400x)	0	Ausente
	1	11-20
	2	21-50
	3	51-74
	4	75 ou mais

Tabela 02. Definição do grau do osteossarcoma de acordo com a somatória dos escores histopatológicos.

Grau histopatológico	Escore total
Grau I	<7
Grau II	07-9
Grau III	> 9

2.4 Fatores prognósticos

Apesar de haver predisposição genética associada à etiologia do osteossarcoma, a raça não tem relação com o prognóstico, mas animais com maior peso corporal são associados a um menor tempo livre de doença e sobrevida (BERGMAN et al., 1996).

A faixa etária pode ser considerada um fator importante, pois cães jovens aparentemente apresentam menor sobrevida, cursando com um comportamento clínico e biológico mais agressivo da doença (SPODNICK et al., 1992).

Outros fatores que podem ser associados ao prognóstico dessa doença são presença de metástase no momento do diagnóstico, o subtipo telangiectásico, escápula (HAMMER et al., 1995) e úmero proximal (BERG et al., 1992), além de excisão cirúrgica incompleta (HAMMER et al., 1995).

O nível elevado de fosfatase alcalina, uma isoenzima total, hepática ou óssea, é associado a um pior prognóstico e animais com essa alteração podem apresentar metade do tempo da sobrevida de cães com a fosfatase alcalina normal (GARZOTTO et al., 2000).

2.5 Tratamento e prognóstico

O tratamento preconizado para o osteossarcoma é a realização de excisão cirúrgica associada a protocolo quimioterápico, e os fármacos mais utilizados são doxorrubicina ou carboplatina (STRAW, 1996). O objetivo da quimioterapia adjuvante é garantir maior controle da doença, pois essa neoplasia apresenta elevadas taxas metastáticas (SHAPIRO et al., 1988).

O procedimento cirúrgico é baseado em duas opções, a amputação total do membro acometido ou a amputação parcial, nessa condição o osso acometido é excisado e substituído por um enxerto ou aparato metálico (LARUE et al., 1989). No entanto, a sobrevida média envolvendo somente o procedimento cirúrgico é de, em média, quatro meses (SPODNICK et al., 1992). A excisão cirúrgica também proporcionar controle da dor, pode ser considerada como protocolopaliativo, e não curativa, quando usada como agente único (BRODEY et al., 1965). Quando o procedimento cirúrgico é associado a protocolos quimioterápicos, a sobrevida dos animais aumenta em torno de um ano (CHUN & LORIMIER, 2003), e não há diferença significativa entre o intervalo livre de doença ou sobrevida em cães que são submetidos aos protocolos com apenas doxorrubicina ou carboplatina, ou a combinação delas (SELMIC et al., 2014).

Outra técnica de tratamento que pode ser utilizada é a radioterapia (WALTER et al., 2005), esse procedimento é mais indicado em pacientes em que a amputação total ou parcial não pode ser realizada, e há algumas possíveis complicações após a radioterapia como infecção, fratura do osso irradiado e recorrência local (FARESE et al., 2004).

2.6 HER-2

Pesquisas recentes têm demonstrado a superexpressão de HER-2 em osteossarcomas humanos e caninos (MASON et al., 2016, STROUD et al., 2016), ele faz parte da família de fator de crescimento epidérmico (EGFR), além de ser um receptor de tirosina quinase, apresenta super expressão em carcinomas de mama, próstata, pâncreas e trato gastrointestinal, e se relaciona a prognóstico desfavorável, devido à alta taxa de metástase quando há sua expressão (WARREN et al., 2006).

Em osteossarcoma caninos esse receptor também pode ser associado à baixa resposta quimioterápica e menor sobrevida global (ZHOU et al., 2003, RAINUSSO et al., 2012). A ativação de HER-2 ocorre pela dimerização desta proteína com outras proteínas da família EGFR (Figura 03), ao enviar para o núcleo das células sinal para diferenciação celular, migração, apoptose e angiogênese, portanto, o bloqueio desta via pode impedir a diferenciação e a migração celular, induzir apoptose das células neoplásicas e diminuir a angiogênese (LOIBL & GIANNI, 2017).

Apesar do HER-2 ter um importante papel no prognóstico dos pacientes humanos com osteossarcoma, sua expressão deve ser avaliada com cuidado. Considerando que em muitos casos a primeira avaliação do tumor é realizada por amostra de biópsia, é incerto o quanto aquela amostra representa o padrão de expressão de HER-2 de um tumor (ZHANG et al., 2016).

Uma revisão sistemática de pacientes humanos com osteossarcoma, demonstrou que existe um padrão heterogêneo da expressão de HER-2, de acordo com a amostra coletada (ZHANG et al., 2016). Portanto, a avaliação da expressão do HER-2 em amostras representativas faz-se necessário para considerar o HER-

2 como fator preditivo, a heterogeneidade da expressão de HER-2 é demonstrada em carcinomas mamários de mulheres (BUCKLEY et al., 2016). Portanto, amostras pouco representativa podem trazer informações errôneas quanto ao padrão de expressão do tumor, bem como ter um impacto direto no prognóstico do paciente (BUCKLEY et al., 2016, SAHA et al., 2018). Apesar de estudos recentes indicarem o efeito positivo de uma vacina anti-HER-2 (MASON et al., 2016), existem pouca literatura prévia descrevendo a expressão de HER-2 em amostras de tecidos e células de osteossarcoma canino (FLINT et al., 2004).

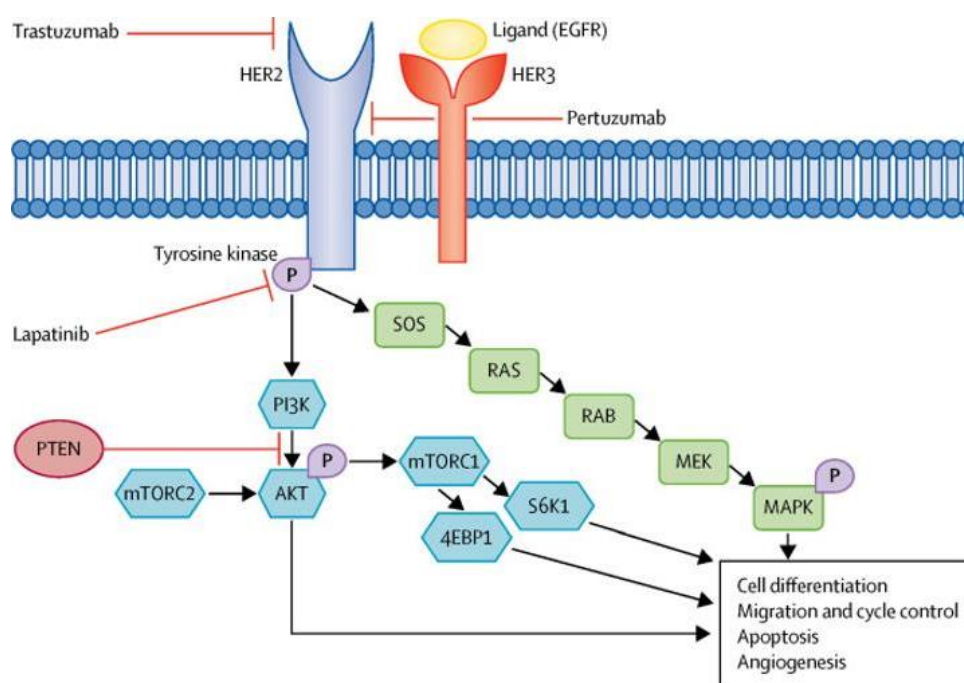


Figura 03. Esquematização da ativação da proteína HER-2, pela dimerização com a proteína HER-3. A dimerização pode ocorrer com outras proteínas da família EGFR (Incluindo EGFR-1), e ativa sinais de migração e diferenciação celular, apoptose e angiogênese. Portanto, o bloqueio com fármacos anti-HER-2 (por exemplo, o Lapatinibe), inibem essa via. FONTE: LOIBL & GIANNI (2017).

2.7 Lapatinibe

Na busca para novas terapias, um grupo da Universidade da Pensilvânia avaliou o efeito clínico de uma vacina contra o receptor HER-2 (transfecção em bactéria *Listeria sp.*) em pacientes com osteossarcoma canino (MASON et al.,

2016). A vacina apresentou excelente resposta terapêutica, com aumento da sobrevida global acima de dois anos (MASON et al., 2016). Demonstrando assim, a importância de terapias que bloqueiem o receptor HER-2 em osteossarcoma caninos.

O Lapatinibe inibe a via de sinalização e fosforilação do HER-2 (SPECTOR et al., 2005, RUSNAK et al., 2001), com consequente inibição da proliferação das células cancerígenas em humanos (KALOUS et al., 2012). É um fármaco primariamente utilizado para mulheres com carcinomas de mama que super expressam HER-2 e são resistentes à terapia com trastuzumabe ou com doença metastática (WUERSTLEIN & HARBECK., 2017). Portanto, o Lapatinibe é um fármaco com potencial antineoplásico no osteossarcoma canino.

Previamente, o efeito do Lapatinibe foi avaliado em células de carcinomas de células de transição de bexiga de cães, através da avaliação do efeito antitumoral e inibição da proteína HER-2 (SAKAI et al., 2018). Brevemente, os autores identificaram efeito antitumoral do Lapatinibe associado à inibição da proteína HER-2. Portanto, tumores com maior expressão de HER-2 apresentaram melhor efeito antitumoral e houve diminuição da expressão de proteínas nestas células (SAKAI et al., 2018).

Os estudos farmacocinéticos para o Lapatinibe incluíram cães, e foi possível observar que na dose de 10mg/kg, o Lapatinibe é metabolizado pelo fígado e excretado pela bile. Um achado importante, foi que doses de até 500 mg/kg não causaram alterações clínicas nos pacientes testados (dois cães machos) (Agência Europeia de Medicina, 2019). Apesar de serem resultados preliminares focados para a farmacocinética de pacientes humanos, este fármaco demonstra o potencial para o tratamento dos cães com câncer. Uma grande vantagem da utilização do Lapatinibe, é que ele está disponível no mercado brasileiro, o que facilitaria o acesso dos médicos veterinários. No entanto, estudos avaliando o efeito antitumoral, bem como farmacocinética devem ser realizados antes da indicação desse fármaco para futuras terapias.

2.8 Imunohistoquímica

O princípio dessa técnica é conhecido desde 1930, porém o primeiro estudo data de 1941, em que o objetivo foi evidenciar a presença de *Streptococcus pneumoniae* por meio de anticorpos marcados com isotiocianato de fluoresceína (RAMOS-VARA, 2005).

Esse procedimento inclui duas etapas principais: a primeira envolve a preparação das lâminas com o material a ser analisado, processamento do tecido e fixação com recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena, bloqueio do sítio não específico, incubação dos anticorpos e coloração; a segunda abrange a interpretação e quantificação das imunomarcações obtidas (MATOS et al., 2010).

De acordo com Ramos-Vara (2005), existem dois modos praticáveis para realização desta técnica. O método direto consiste no uso de apenas um anticorpo associado a uma substância que permite sua visualização após a devida coloração. Já no método indireto, há dois anticorpos, sendo o primário responsável pela ligação ao antígeno e o secundário por ligar-se ao primeiro anticorpo, e assim há a marcação do complexo antígeno-anticorpo.

Há dois tipos de anticorpos primários que podem ser utilizados nos protocolos de imunohistoquímica (BRODEY, 2002, AMORIM, 2009). Os monoclonais, que foram desenvolvidos em ratos e com maior especificidade para os epítomos humanos, são de difícil emprego em Medicina Veterinária, a despeito da menor chance de reação cruzada (AMORIM, 2009). O outro tipo é o policlonal, produzido em coelhos e com capacidade de interação com vários epítomos antigênicos de várias espécies, embora seja menos específico e com possibilidade de maior reação cruzada (BRODEY, 2002). Conforme Amorim (2009), os anticorpos secundários ligam-se ao anticorpo primário, por isso devem ser produzidos em outra espécie animal e agregados às moléculas de peroxidase. Desse modo, ao receberem um elétron do cromógeno coram-se de castanho ou vermelho, permitindo a visualização da ligação específica do anticorpo e realização da leitura dos marcadores.

A imunohistoquímica aplicada à oncologia pode ser usada para determinar antígenos celulares, aminoácidos, proteínas, agentes infecciosos e populações celulares específicas (BRANDTZAEG, 1998), incluindo as células neoplásicas metastáticas e fatores prognósticos tumorais (JAFFER & BLEIWEISS, 2004). Segundo Taylor (1992), o antígeno pode ser detectado no citoplasma, núcleo ou superfície celular, bem como nas substâncias produzidas pelo tumor, como no caso da secreção parácrina. Além disso, é possível identificar o tecido de origem da neoplasia, graduar a proliferação celular, linfática, endotelial e avaliar o prognóstico da doença.

2.9. Cultura celular

Há dois tipos celulares utilizados em cultura, um deles é a linhagem primária em que as células adquirem característica de imortalização e podem se multiplicar indefinidamente, e o outro tipo é a secundária, em que as células são obtidas diretamente de um tecido (FRESHNEY, 2006).

A cultura celular pode trazer inúmeros benefícios para a pesquisa, pois é um modelo biológico menos complexo quando comparado ao uso de animais de experimentação (FRESHNEY, 2006), além de possuir algumas características como custo razoável e ambiente controlado (BROCK et al., 2018). Além disso, as informações obtidas como resultados de testes em células *in vitro*, podem ser úteis para estudos funcionais, bioquímicos e moleculares, assim consequentemente, mostra-se eficaz para análises farmacológicas (FRESHNEY, 2006).

Na área de oncologia especificamente, a cultura celular auxilia o desenvolvimento de novos quimioterápicos e eficácia do protocolo, além da compreensão do comportamento biológico neoplásico, como avaliação de oncogenes e vias de sinalização celular (BROCK et al., 2018).

Outras vantagens da cultura celular são resultados confiáveis, uma vez que é possível realizar os mesmos testes em diferentes momentos de repetições, utilizando a mesma passagem celular fidedigna (VAN STAVEREN et al., 2009, BROCK et al., 2018).

No entanto, algumas desvantagens em relação à cultura primária devem

ser consideradas ao realizar experimentos, como: mudança da expressão gênica tecidual devido à ausência da matriz extracelular, contaminações por fibroblastos ou por agentes externos, que também colaboram para alterações celulares importantes (VAN STAVEREN et al., 2009, BROCK et al., 2018).

Desse modo, é importante ressaltar que os achados *in vitro* podem não ser diretamente correlacionados com os achados *in vivo* (BROCK et al., 2018), porém ainda assim a cultura celular é de extrema relevância para estudos de neoplasias, principalmente humanas (VAN STAVEREN et al., 2009).

REFERÊNCIAS

AMORIM R. L. Imunoistoquímica em Oncologia Veterinária. In: De Nardi A.B., Daleck C.R., Rodaski S. Oncologia em cães e gatos. Ed. São Paulo: Roca., pp. 135-150, 2009.

BERG, J.; WEINSTEIN, M. J.; SHELLING, S. H. et al. Treatment of dogs with osteosarcoma by administration of cisplatin after amputation or limb-sparing surgery: 22 cases (1987-1990). J. Am. Vet. Med. Assoc. v.200, n.12, p.2005-2008, 1992.

BERGMAN, P.J.; MACEWEN, E.G.; KURZMAN, I.D.; et al. Amputation and carboplatin for treatment of dogs with osteosarcoma: 48 cases (1991 to 1993). J Vet Intern Med. v.10, n.2, pp.76–81, 1996.

BONNETT, B.N.; EGENVALL, A.; HEDHAMMAR, A.; OLSON, P. Mortality in over 350,000 insured Swedish dogs from 1995–2000: I. Breed-, gender-, age- and cause-specific rates. Acta Vet. Scand.v.46, pp.105–120, 2005.

BRANDTZAEG P. The increasing power of immunohistochemistry and immunocytochemistry. Journal Immunol Methods. v. 216, n.1, pp.49-67, 1998.

BROCK, E. J.; JI, K.; SHAH, S.; MATTINGLY, R. R; et al. In vitro models for studying invasive transitions of ductal carcinoma in situ. Journal of mammary gland biology and neoplasia, p. 1-15, 2018.

BRODEY, R. S.; Surgical treatment of canine osteosarcoma. J. A. V. M. A. v.147, n.7, pp.729-735, 1965.

BRODEY, R.S.; RISER W. Canine osteosarcoma: A clinicopathological study of 194 cases. Clin. Orthop.v. 62, pp. 54-64, 1969.

BRODEY, R.S. The use of naturally occurring cancer in domestic animals for research into human cancer: general considerations and a review of canine skeletal osteosarcoma. *Yale J. Biol. Med.* v.52,v.4, pp.345-361, 1979.

BRODEY, B. The significance of immunohistochemistry in the diagnosis and therapy of neoplasms. *Journal Expert Opinion on Biological Therapy.* v. 2, pp. 371-393, 2002.

BUCKLEY, N.E.; FORDE, C; MCART, D.G.; BOYLE, D.P.; et al. Quantification of HER2 heterogeneity in breast cancer-implications for identification of sub-dominant clones for personalised treatment. *Sci Rep.* 21; 6:23383, 2016.

CHUN, R.; LORIMIER, L. P. Update on the biology and management of canine osteosarcoma. In: Kitchell, B. E. *The veterinary clinics of north america: small animal practice.* 1. Ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. pp.492-516, 2003.

DERNELL, W.S.; STRAW, R.C.; WITHROW, S.J. Tumors of the skeletal system. In: MacEwen, E. *Small animal clinical oncology,* 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, pp.378-417, 2001.

EGENVALL, A.; NØDTVEDT, A.; VON EULER, H. Bone tumors in a population of 400 000 insured Swedish dogs up to 10 y of age: incidence and survival. *Can J Vet Res.*v.71, pp. 292–299, 2007.

FARESE, J.P.; Milner, R.; Thompson, M.S.; Lester, N.; et al. Stereotactic radiosurgery for treatment of osteosarcomas involving the distal portions of the limbs in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* v. 225, n.10, pp.1567–1572, 2004.

FLINT A.F.; U'REN L.; LEGARE M.E.; WITHROW S.J.; et al. Overexpression of the erbB-2 proto-oncogene in canine osteosarcoma cell lines and tumors. *Vet Pathol.* v.41, n.3, pp.291-6, 2004.

FRESHNEY, R. I. *Basic Principles of Cell Culture, in Culture of Cells for Tissue Engineering* (eds G. Vunjak-Novakovic and R. I. Freshney), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2006.

GARZOTTO, C. K.; BERG, J; HOFFMANN, W. E.; RAND, W.M. Prognostic Significance of Serum Alkaline Phosphatase Activity in Canine Appendicular Osteosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine,* v. 14, n. 6, p. 587–592, 2000.

GELLASCH, K.L.; KALSCHEUR, V.L.; CLAYTON, M.K.; et al. Fatigue microdamage in the radial predilection site for osteosarcoma in dogs. *Am. J. Vet. Res.* v. 63, n.6, pp. 896-899, 2002.

GRÜNTZIG, K.; GRAF, R.; HÄSSIG, M.; WELLE, M.; et al. The swiss canine cancer registry: a retrospective study on the occurrence of tumours in dogs in Switzerland from 1955 to 2008. *J Comp Pathol.* v.152, pp.161–71, 2015.

HAMMER, A.S.; WEEREN, F.R.; WEISBRODE, S.E.; et al. Prognostic factors in dogs with osteosarcomas of the flat or irregular bones. *J Am Anim Hosp Assoc.* v. 31, n. 4, pp.321–326, 1995.

JAFFER, S.; BLEIWEISS, I. J. Beyond hematoxylin and eosin: the role of immunohistochemistry in surgical pathology. *Cancer Investigation.* v. 22, n.3, pp. 445-465, 2004.

JOHNSON, A. S.; COUTO, C. G.; WEGHORST, C. M. Mutation of the p53 tumor suppressor gene in spontaneously occurring osteosarcomas of the dog. *Carcinogenesis.* v.19, n. 1, p.213-217, 1998.

KALOUS, O.; CONKLIN, D.; DESAI, A.J.; O'BRIEN, NA; et al. Dacomitinib (PF-00299804), an irreversible Pan-HER inhibitor, inhibits proliferation of HER2-amplified breast cancer cell lines resistant to trastuzumab and lapatinib. *Mol Cancer Ther.* v.11, n.9. pp.1978-1987, 2012.

KLEINER, J. A.; SILVA, E. G. Bone tumors affecting small animals. *MedVet.* v.1, n.3, 2003.

KRAEGEL, S.A.; MADEWELL, B.R.; SIMONSON, E.; GREGORY, C.L. Osteogenic sarcoma and cisplatin chemotherapy in dogs: 16 cases (1986–1989). *Journal of the American Veterinary Medical Association.* v.199, pp. 1057 – 1059, 1991.

LACKEY, K.E. Lessons from the drug discovery of lapatinib, a dual ErbB1/2 tyrosine kinase inhibitor. *Curr Top Med Chem.* v 6, n. 5, pp.435–460, 2006.

LAMB, R. C. Preoperative measurement of canine primary bone tumors using radiography and bone scintigraphy. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* v.196, n.9, pp.1032-1037, 1990.

LANG, S.; SULZBACHER, I. Differential diagnostic problems in assessment of benign bone tumors. *Radiologe.* v.41, n.7, p.533-539, 2001.

LARUE S. M.; WITHROW S.J.; POWERS B.E.; WRIGLEY R.H.; GILLETTE E.L.; et al. Limb-sparing treatment for osteosarcoma in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association,* v. 195, n. 12, pp. 1734–44, 1989.

LOIBL, S.; GIANNI L. HER2-positive breast cancer. *Lancet.* v.17, n.389, pp.2415-2429, 2017.

MASON, N.J.; GNANANDARAJAH, J.S.; ENGILES, J.B.; GRAY, F.; et al. Immunotherapy with a HER2-Targeting listeria induces HER2-Specific immunity

and demonstrates potential therapeutic effects in a phase I trial in canine osteosarcoma. *Clin. Cancer Res.* v. 22, n. 17, pp. 4380–4390, 2016.

MATOS, L. L.; TRUFELLI, D. C.; MATOS, M. G. L.; et al. Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice. *Journal Biomarker Insights*, v. 5, pp. 9-20, 2010.

MAULDIN, G. N.; MATOS, R. E.; WITHROW, S. J. et al. Canine osteosarcoma: treatment by amputation versus amputation and adjuvant chemotherapy using doxorubicin and cisplatin. *J. Vet. Intern. Med.* v. 2, n. 4, pp.177-180, 1988.

MISDORP, W.; Hart A. Some prognostic and epidemiologic factors in canine osteosarcoma. *J Natl Cancer Inst.* v. 62, n.3, pp. 537– 545, 1979.

MOORE, A.S.; DERNELL, W.S.; OGILVIE, G.K.; KRISTAL, O; et al. Doxorubicin and BAY 12–9566 for the treatment of osteosarcoma in dogs: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Vet Intern Med.* v.21, n. 4, pp.783–790, 2007.

MORELLO, E.; MARTANO, M.; BURACCO, P. Biology, diagnosis and treatment of canine appendicular osteosarcoma: similarities and differences with human osteosarcoma. *Vet J.* v.189, n.3, pp. 268–277, 2011.

MUFF, R.; KUMAR, R. M. R.; BOTTER, S. M.; BORN, W.; FUCHS, B. Genes Regulated in Metastatic Osteosarcoma: Evaluation by Microarray Analysis in Four Human and Two Mouse Cell Line Systems. *Sarcoma.* pp. 1–13, 2012.

OGILVIE, G. K. Bone tumors. In: Rosenthal R. C. *Veterinary oncology secrets*. 1. ed. Philadelphia: HANLEY & BELFUS, p.139-147, 2001.

PHILLIPS, L.; HAGER D.; PARKER, R.; YANIK, D. Osteosarcoma with a pathological fracture in a six-month-old dog. *Veterinary Radiology.* v. 27, n.1, pp. 18-19, 1986.

PINHO, S.S.; CARVALHO, S.; CABRAL, J.; REIS, C.A.; GÄRTNER, F. Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. *Transl Res.*v.159, pp.165–72, 2012.

POWERS, B. E.; LARUE, S. M.; WITHROW, S. J. et al. Jamshidi needle biopsy for diagnosis of bone lesions in small animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v.193, n.2 p.205- 210, 1988.

RAINUSSO, N.; BRAWLEY, V.S.; GHAZI, A.; HICKS M.J.; et al. Immunotherapy targeting HER2 with genetically modified T cells eliminates tumor-initiating cells in osteosarcoma. *Cancer Gene Ther.* v.19, n.3, pp.212-217, 2012.

RAMOS-VARA J. A. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*. v. 42, n. 4, pp.405-426, 2005.

RANIERI, G.; GADALETA, C.D.; PATRUNO, R.; ZIZZO N.; et al. A model of study for human cancer: spontaneous occurring tumors in dogs. Biological features and translation for new anticancer therapies. *Crit Rev Oncol Hematol*. V.88, pp:187–97, 2013.

ROSIN, A.; ROWLAND, G. N. Undifferentiated sarcoma in a dog following chronic irritation by a metallic foreign body and concurrent infection. *Journal American Animal Hospital Association*. v.17, p.593-598, 1981.

RU, G.; TERRACINI B.; GLICKMAN, L.T. Host related risk factors for canine osteosarcoma. *Vet J*. v. 156, n. 1, pp.31– 39, 1998.

RUSNAK, D.W.; LACKEY, K.; AFFLECK, K.; WOOD, E.R.; et al. The effects of the novel, reversible epidermal growth factor receptor/ErbB-2 tyrosine kinase inhibitor, GW2016, on the growth of human normal and tumor-derived cell lines in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther*. v.1, n.2, pp. 85-94, 2001.

SAHA, A.; HAROWICZ, M.R.; CAIN, E.H.; HALL, A.H.; et al. Intra-tumor molecular heterogeneity in breast cancer: definitions of measures and association with distant recurrence-free survival. *Breast Cancer Res Treat*. v.172, n.1, pp.123-132, 2018.

SAKAI, K.; MAEDA, S.; SAEKI, K.; NAKAGAWA, T.; et al. Anti-tumor effect of lapatinib in canine transitional cell carcinoma cell lines. *Vet. Comp. Oncol*. v.16, n.4, pp. 642–649, 2018.

SELMIC, L.E.; BURTON, J.H.; THAMM, D.H.; WITHROW, S.J.; LANA, S.E. Comparison of carboplatin and doxorubicin-based chemotherapy protocols in 470 dogs after amputation for treatment of appendicular osteosarcoma. *J Vet Intern Med*. v. 28, n. 2, pp. 554-563, 2014.

SHAPIRO, W.; FOSSUM, T. W.; KITCHELL, B. E. et al. Use of cisplatin for treatment of appendicular osteosarcoma in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc*. v. 192, n.15, pp. 507-511, 1988.

SPECTOR, N.L.; XIA, W.; BURRIS, H.; HURWITZ, H.; et al. Study of the biologic effects of lapatinib, a reversible inhibitor of ErbB1 and ErbB2 tyrosine kinases, on tumor growth and survival pathways in patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol*. v.23, n.11, pp. 2502-2512, 2005.

SPODNICK, G.J.; BERG, J.; RAND, W.M.; et al. Prognosis for dogs with appendicular osteosarcoma treated by amputation alone: 162 cases (1978–1988). *J Am Vet Med Assoc*. v.200, n.7, pp.995–999, 1992.

STRAW, R.C.; WITHROW, S.J.; POWERS, B.E. Management of canine appendicular osteosarcoma. *Vet. Clin. North. Amer: Small Animal Practice*. v.20, n.4, 1141-1161, pp.1990.

STRAW, R.C. Tumors of the skeletal system. In: Withrow, S.J.; Macewen, E.G. *Small animal clinical oncology*. 2.ed. Philadelphia: WB Saunders, pp. 287-315, 1996.

STROUD C.; DMITRIEV I.; KASHENTSEVA E.; et al. A One Health overview, facilitating advances in comparative medicine and translational research. *Clin Transl Med*. (Suppl 1):26, 2016.

TAYLOR C. R. Quality assurance and standardization in immunohistochemistry. A proposal for the annual meeting of the Biological Stain Commission, *Biotechnic & Histochemistry*. v. 67, n.2, pp. 110-117, 1992.

THOMPSON K. G.; POOL R. R. Tumors of bones. In Meuten, D. J. *Tumors in Domestic Animals*. 4th ed. EUA: Iowa State Press, pp.245-317, 2002.

VAN STAVEREN, W. C. G.; SOLÍS, D. W.; HEBRANT, A.; DETOURS, V.; DUMONT, J. E.; MAENHAUT, C. Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, v. 1795, n. 2, p. 92-103, 2009.

WALTER, C.U.; DERNELL, W.S.; LARUE, S.M.; LANA, S.E.; LAFFERTY, M.H.; et al. Curative-intent radiation therapy as a treatment modality for appendicular and axial osteosarcoma: a preliminary retrospective evaluation of 14 dogs with the disease. *Vet Comp Oncol*. v.3, n. 1, pp.1-7, 2005.

WARREN, C.M.; LANDGRAF, R. Signaling through ERBB receptors: multiple layers of diversity and control. *Cell Signal*. v. 18, n.7, pp.923–933, 2006.

WUERSTLEIN, R.; HARBECK, N. Neoadjuvant Therapy for HER2-positive Breast Cancer. *Rev Recent Clin Trials*. v.12, n.2, pp.:81-92, 2017.

ZHANG, Q.; LIU, F.; WANG, B.; LI, Z.; et al. HER-2 expression in biopsy and surgical specimen on prognosis of osteosarcoma: A systematic review and meta-analysis of 16 studies. *Medicine (Baltimore)*. v.95, n.23:3661. 2016.

ZHOU, H.; RANDALL, R.L.; BROTHMAN, A.R.; MAXWELL, T.; et al. Her-2/neu expression in osteosarcoma increases risk of lung metastasis and can be associated with gene amplification. *J Pediatr Hematol Oncol*. v. 25, n. 1, pp. 27-32, 2003.

5. CONCLUSÃO

Com o presente estudo concluímos que o OSA8 mostrou características importantes e condizentes com outras linhagens pré-estabelecidas de osteossarcoma, e demonstra potencial *in vitro* para colaborar em novos projetos que favoreçam a espécie canina e humana.

Além disso, o uso do Lapatinibe em nossa cultura de osteossarcoma com a expressão de HER-2, foi favorável de acordo com os resultados esperados, em que um fármaco inibidor desse receptor, seja capaz de uma melhor resposta dose-dependente na célula cancerígena, quando comparados a outros quimioterápicos.

Por fim, mesmo com a heterogeneidade encontrada em alguns critérios entre os dois fragmentos do OSA8, como o score final de HER-2 ou diferença entre as doses dos fármacos, não alterou significativamente a resposta do Lapatinibe, que segue promissor mesmo com as possíveis diferenças que possam ser encontradas em uma massa neoplásica quando considerada como um todo.

Corroboramos com a ideia de que é necessário mais estudos que avaliem a heterogeneidade do osteossarcoma para consolidar ainda mais o uso de inibidores de tirosina quinase.

REFERÊNCIAS

ANFENSEN K.P., GROTMOL T., BRULAND O.S., JONASDOTTIR T.J..Breed-specific incidence rates of canine primary bone tumors—a population based survey of dogs inNorway. Can J Vet Res 75:209–215, 2011.

BERG J. Canine Osteosarcoma. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 26:111–21. doi: 10.1016/S0195-5616(96)50010-0, 1996.

CHUN, R.; LORIMIER, L. P. Update on the biology and management of canine osteosarcoma. In: Kitchell, B. E. The veterinary clinics of north america: small animal practice. 1. Ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. pp.492-516, 2003.

DREXLER, H.G, UPHOFF, C.C. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. Cytotechnol. 39:23-38, 2002.

ENDICOTT, M. Principles of treatment for osteosarcoma. Clin Tech Small Anim Pract. 18:110–4. doi: 10.1053/svms.2003.36626, 2003.

FAN TM, KHANNA C. Comparative aspects of osteosarcoma pathogenesis in humans and dogs. Vet Sci 2:210–230, 2015.

FENGER, J.M., London C.A., Kisseberth W.C. Canine osteosarcoma: a naturally occurring disease to inform pediatric oncology. ILAR J 55:69–85, 2014.

FONSECA-ALVES, C.E., PALMIERI C., DAGLI M.L.Z., LAUFER-AMORIM R. Editorial: Precision Medicine in Veterinary Oncology. Front Vet Sci. 14;8:718891. doi: 10.3389/fvets.2021.718891. PMID: 34336983; PMCID: PMC8316583, 2021.

FRESHNEY, R. I. Basic Principles of Cell Culture, in Culture of Cells for Tissue Engineering (eds G. Vunjak-Novakovic and R. I. Freshney), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2006.

GUIJARRO M.V., GHIVIZZANI, S.C. Animal models in osteosarcoma. Front Oncol 4:189 3. Sanmamed MF, Chester C, Melero I, Kohrt H (2016) Defining the optimal murine models to investigate immune checkpoint blockers and their combination with other immunotherapies. Ann Oncol 27:1190–1198, 2014.

HINGORANI, P., KRAILO, M., BUXTON, A., HUTSON, P., et al.. Phase 2 study of anti-disialoganglioside antibody, dinutuximab, in combination with GM-CSF in patients with recurrent osteosarcoma: A report from the Children's Oncology Group. Eur J Cancer. 6;172:264-275. doi: 10.1016/j.ejca.2022.05.035. Epub ahead of print. PMID: 35809374, 2022.

JARVIS, S., KOUMADORAKI, E., MADOUROS, N., et al.. Non-rodent animal models of osteosarcoma: A review. Cancer Treat Res Commun.27:100307. doi: 10.1016/j.ctarc.2021.100307. Epub 2021 Jan 9. PMID: 33453605, 2021.

KALOUS, O.; CONKLIN, D.; DESAI, A.J.; O'BRIEN, NA; et al. Dacomitinib (PF-00299804), an irreversible Pan-HER inhibitor, inhibits proliferation of HER2-amplified breast cancer cell lines resistant to trastuzumab and lapatinib. Mol Cancer Ther. v.11, n.9. pp.1978-1987, 2012.

KENT, M.S., STROM, A., LONDON, C.A., SEGUIN, B. Alternating carboplatin and doxorubicin as adjunctive chemotherapy to amputation or limb-sparing surgery in the treatment of appendicular osteosarcoma in dogs. *J Vet Intern Med* 18:540–544, 2004.

LOIBL, S.; GIANNI L. HER2-positive breast cancer. *Lancet*. v.17, n.389, pp.2415-2429, 2017.

MARTINS-NEVES, S.R., LOPES, Á.O., DO CARMO, A., PAIVA, A.A., et al. Therapeutic implications of an enriched cancer stem-like cell population in a human osteosarcoma cell line. *BMC Cancer*. 4;12:139. doi: 10.1186/1471-2407-12-139. PMID: 22475227; PMCID: PMC3351999, 2012.

MASON, N.J.; GNANANDARAJAH, J.S.; ENGILES, J.B.; GRAY, F.; et al. Immunotherapy with a HER2-Targeting listeria induces HER2-Specific immunity and demonstrates potential therapeutic effects in a phase I trial in canine osteosarcoma. *Clin. Cancer Res*. v. 22, n. 17, pp. 4380–4390, 2016.

MAULDIN, G. N.; MATUS, R. E.; WITHROW, S. J. et al. Canine osteosarcoma: treatment by amputation versus amputation and adjuvant chemotherapy using doxorubicin and cisplatin. *J. Vet. Intern. Med*. v. 2, n. 4, pp.177-180, 1988.

MISAGHI, A., GOLDIN, A., AWAD, M., KULIDJIAN, A.A.. Osteosarcoma: a comprehensive review. *SICOT J*. 2018;4:12. doi: 10.1051/sicotj/2017028. Epub. PMID: 29629690; PMCID: PMC5890448, 2018.

MOHSENY, A., MACHADO, I., CAI, Y. et al. Functional characterization of osteosarcoma cell lines provides representative models to study the human disease. *Lab Invest* 91, 1195–1205, 2011.

MOORE, A.S.; DERNELL, W.S.; OGILVIE, G.K.; KRISTAL, O; et al. Doxorubicin and BAY 12–9566 for the treatment of osteosarcoma in dogs: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Vet Intern Med*. v.21, n. 4, pp.783–790, 2007.

NUOVO G. False-positive results in diagnostic immunohistochemistry are related to horseradish peroxidase conjugates in commercially available assays. *Ann Diagn Pathol*.Dec;25:54-59. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2016.09.010, 2016.

PHILLIPS, B., POWERS, B.E., DERNELL, W.S., et al. Use of single-agent carboplatin as adjuvant or neoadjuvant therapy in conjunction with amputation for appendicular osteosarcoma in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 45:33–38, 2009.

RAINUSSO, N.; BRAWLEY, V.S.; GHAZI, A.; HICKS M.J.; et al. Immunotherapy targeting HER2 with genetically modified T cells eliminates tumor-initiating cells in osteosarcoma. *Cancer Gene Ther*. v.19, n.3, pp.212-217, 2012.

RU, G.; TERRACINI B.; GLICKMAN, L.T. Host related risk factors for canine osteosarcoma. *Vet J.* v. 156, n. 1, pp.31– 39, 1998.

SELMIC. L.E.; BURTON, J.H.; THAMM, D.H.; WITHROW, S.J.; LANA, S.E. Comparison of carboplatin and doxorubicin-based chemotherapy protocols in 470 dogs after amputation for treatment of appendicular osteosarcoma. *J Vet Intern Med.* v. 28, n. 2, pp. 554-563, 2014.

SIEGEL, R., NAISHADHAM, D., JEMAL, A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 63:11–30, 2013.

SPECTOR, N.L.; XIA, W.; BURRIS, H.;HURWITZ, H.; et al: Study of the biologic effects of lapatinib, a reversible inhibitor of ErbB1 and ErbB2 tyrosine kinases, on tumor growth and survival pathways in patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol.* v.23, n.11, pp. 2502-2512, 2005.

SPODNICK, G.J.; BERG, J.; RAND, W.M.; et al. Prognosis for dogs with appendicular osteosarcoma treated by amputation alone: 162 cases (1978–1988). *J Am Vet Med Assoc.* v.200, n.7, pp.995–999, 1992.

STRAW, R.C., WITHROW S.J., POWERS B.E. Management of canine appendicular osteosarcoma. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 20:1141–61. doi: 10.1016/S0195-5616(90)50089-3.1990.

STROUD C.; DMITRIEV I.; KASHENTSEVA E.; et al. A One Health overview, facilitating advances in comparative medicine and translational research. *Clin Transl Med.* (Suppl 1):26, 2016.

RANGARAJAN, A., WEINBERG, R.A. Opinion: comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice. *Nat Rev Cancer* 3:952–959, 2003.

RUGGERI, B.A., CAMP, F., MIKNYOCZKI, S.A.. Animal models of disease: pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. *Biochem Pharmacol.* 87:150–61. doi: 10.1016/j.bcp.2013.06.020, 2014.

RUSNAK, D.W.; LACKEY, K.; AFFLECK, K.; WOOD, E.R.; et al. The effects of the novel, reversible epidermal growth factor receptor/ErbB-2 tyrosine kinase inhibitor, GW2016, on the growth of human normal and tumor-derived cell lines in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther.* v.1, n.2, pp. 85-94, 2001.

UPHOFF, C.C. AND DREXLER, H.G. Contamination of cell cultures, mycoplasma. In *The Encyclopedia of Industrial Biotechnology. Volume 5* (M. Flickinger, ed.) pp. 3611-3630. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2010.

VAN STAVEREN, W. C. G.; SOLÍS, D. W.; HEBRANT, A.; DETOURS, V.; DUMONT, J. E.; MAENHAUT, C. Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For

cancer stem cells?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, v. 1795, n. 2, p. 92-103, 2009.

WARREN, C.M.; LANDGRAF, R. Signaling through ERBB receptors: multiple layers of diversity and control. *Cell Signal*. v. 18, n.7, pp.923–933, 2006.

ZHOU, H.; RANDALL, R.L.; BROTHMAN, A.R.; MAXWELL, T.; et al. Her-2/neu expression in osteosarcoma increases risk of lung metastasis and can be associated with gene amplification. *J Pediatr Hematol Oncol*. v. 25, n. 1, pp. 27-32, 2003.