

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

**EFEITOS DO LAPATINIBE SOBRE AS CÉLULAS DO CARCINOMA  
MAMÁRIO CANINO HER2+ E HER2- CULTIVADAS *IN VITRO***

ANTONIO FERNANDO LEIS FILHO

Botucatu – SP

2020

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

**EFEITOS DO LAPATINIBE SOBRE AS CÉLULAS DO  
CARCINOMA MAMÁRIO CANINO HER2+ E HER2- CULTIVADAS  
*IN VITRO***

ANTONIO FERNANDO LEIS FILHO

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

Orientadora: Professora Associada  
Renée Laufer Amorim

Coorientador: Professor Dr. Carlos  
Eduardo Fonseca Alves

Botucatu – SP

2020

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

Leis Filho, Antonio Fernando.

Efeitos do lapatinibe sobre as células do carcinoma mamário canino HER2+ e HER2- cultivadas in vitro / Antonio Fernando Leis Filho. - Botucatu, 2020

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

Orientador: Renée Laufer Amorim

Coorientador: Carlos Eduardo Fonseca Alves

Capes: 50501003

1. Cães - Doenças. 2. Mamas - Câncer. 3. Lapatinibe.  
4. Medicina de precisão. 5. Oncologia.

Palavras-chave: Alvos moleculares; Câncer; Cão; Oncologia; Terapia de precisão.

Nome do autor (a): Antonio Fernando Leis Filho

Título: Efeitos do lapatinibe sobre as células do carcinoma mamário canino  
HER2+ e HER2- cultivadas *in vitro*

### COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Associada Dra. Renée Laufer Amorim

Presidente e Orientadora

Departamento de Clínica Veterinária - FMVZ UNESP - Botucatu /SP

Prof. Associado Dr. Wellerson Rodrigo Scarano

Membro

Departamento de Morfologia IBB - UNESP - Botucatu /SP

Profa. Dra. Flávia Karina Delella

Membro

Departamento de Morfologia IBB - UNESP - Botucatu /SP

Data da Defesa: 28 de agosto de 2020.

*Dedico esta dissertação aos meus pais (Antonio Fernando Leis e Maria Beatris Marinho Mauad Leis), ao meu irmão (José Antonio Mauad Leis) e à minha companheira para todos os momentos (Patrícia de Faria Lainetti), que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e incentivando.*

## **Agradecimentos**

Agradeço em primeiro lugar a minha família por todo apoio e incentivo que sempre tive. Pais, tudo que eu conquistei em minha vida foi devido às oportunidades que vocês me proporcionaram, só tenho a agradecer pela dedicação, amor e carinho que vocês demonstram todos os dias.

A minha melhor amiga e companheira em todos os momentos dos últimos quase 9 anos, Patrícia de Faria Lainetti. Obrigado por me fazer uma pessoa melhor a cada momento juntos, por todo carinho, amor e companheirismo. Nada disso seria possível sem você.

À minha orientadora Renée Laufer Amorim por toda ajuda e boa vontade. Obrigado por me receber de braços abertos e me ajudar a evoluir durante esses 2 anos.

Ao meu co-orientador e amigo Carlos Eduardo Fonseca Alves por toda confiança, ajuda, boa vontade e carinho. Sempre terei você como exemplo de um profissional excepcional e uma pessoa melhor ainda.

À Priscila Emiko Kobayashi por todos ensinamentos no laboratório, mas principalmente pelas risadas.

À Professora Flávia Karina Delella por compartilhar de seu laboratório para a realização desta pesquisa e pela ajuda sempre que dúvidas surgiam.

Ao Márcio Carvalho, por toda ajuda no laboratório, sempre com paciência e boa vontade.

A todos meus amigos que são essenciais em momentos tanto de apreensão e quanto de descontração. Obrigado por compartilharem tantos momentos especiais ao longo desses anos.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

Ao financiamento do presente trabalho, realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo nº 2018/14041-4 e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*"Happiness is only real when shared."*

Christopher McCandless

## SUMÁRIO

RESUMO .....	ii
ABSTRACT .....	ii
CAPÍTULO 1 .....	1
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Neoplasias mamárias.....	2
2.2 Sinais clínicos e diagnóstico .....	4
2.3 Estadiamento .....	6
2.4 Tratamento .....	7
2.5 Receptores .....	9
2.6 Características clínicas associadas com a expressão de HER2 .....	14
2.7 Tratamento das neoplasias HER2+ .....	16
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	19
REFERÊNCIAS .....	21
HIPÓTESE .....	33
OBJETIVOS.....	33
CAPÍTULO 2 .....	34
ARTIGO I .....	35
RESUMO .....	35
1. INTRODUÇÃO.....	36
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	38
2.1 Reagentes .....	38
2.2 Critérios de inclusão .....	39
2.3 Grupos experimentais .....	40
2.4 Imunorreatividade de HER2 .....	41
2.5 Cultivo celular.....	43
2.6 Tratamento com lapatinibe e avaliação da atividade metabólica celular	45
2.7 Extração de RNA e RT-qPCR dos blocos de parafina e das amostras de cultura celular .....	46
2.8 Ensaio de migração celular .....	48
2.9 Análise estatística .....	49
3. RESULTADOS.....	50
3.1 RT-qPCR.....	50

3.2 MTT .....	52
3.3 Ensaio de migração.....	54
3.4 Correlação entre a expressão de HER2 e o IC <sub>50</sub> .....	55
4. DISCUSSÃO .....	56
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	58
FINANCIAMENTO .....	58
REFERÊNCIAS .....	58

LEIS-FILHO, A. F. **Efeitos do lapatinibe sobre as células do carcinoma mamário canino HER2+ e HER2- cultivadas *in vitro***. Botucatu – SP. 2020. 75 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP.

## RESUMO

O HER2 é um marcador prognóstico e preditivo amplamente utilizado em câncer de mama de mulheres e a sua superexpressão está ligada à um menor tempo livre de doença, diminuição da expressão de receptores de estrógeno e progesterona, maior taxa de proliferação e migração celular, invasividade tumoral, frequência de metástases, angiogênese e diminuição da apoptose. Nas neoplasias mamárias de cães, o papel do HER2 ainda não está satisfatoriamente esclarecido, porém já foi observado que sua superexpressão está relacionada com pleomorfismo celular e aumento do número de figuras de mitoses, sendo que esta relação também já foi notada em mulheres. O lapatinibe é um inibidor tirosina-quinase que age bloqueando a fosforilação dos receptores HER2. O seu uso está relacionado com melhores resultados no tratamento em mulheres com tumores HER2+. Nesse estudo, objetivou-se verificar os efeitos do lapatinibe em cultura celular *in vitro*, provenientes de carcinoma mamário canino primário e metastático. Quatro culturas celulares de carcinoma mamário primário e duas metástases previamente estabelecidas e caracterizadas foram expandidas, tratadas com lapatinibe nas concentrações de 0.1, 0.5, 1 e 3 $\mu$ M, por 24h, e tiveram a sua concentração inibitória de 50% das células (IC<sub>50</sub>) determinado. Além disso, verificamos a expressão de *HER2* de todas as culturas celulares. A IC<sub>50</sub> das células variou de 0.01 até 0.58 $\mu$ M. Ademais, o lapatinibe foi capaz de inibir a viabilidade de todas as culturas celulares tratadas, sendo que quanto maior a expressão de HER2 de uma cultura, mais sensível ela foi ao lapatinibe. Portanto, o tratamento com lapatinibe pode ser uma opção promissora para pacientes caninos com carcinoma mamário primário ou metastático, podendo ser utilizado principalmente em animais com neoplasias HER2+.

**Palavras-chave:** cão, câncer, oncologia, alvos moleculares, terapia de precisão

LEIS-FILHO, A. F. **Lapatinib effects on HER2+ and HER2- canine mammary carcinoma cells cultured *in vitro***. Botucatu – SP. 2020. 75 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP.

## **ABSTRACT**

HER2 is a prognostic and predictive marker widely used in breast cancer diagnosis in women and its overexpression is linked to shorter disease-free survival, decreased expression of estrogen and progesterone receptors, higher proliferation rate and cell migration, tumor invasiveness, frequency of metastases, angiogenesis and decreased apoptosis. In the mammary neoplasms of dogs, the role of HER2 is not yet satisfactorily clarified, however it has already been observed that its overexpression is related to cellular pleomorphism and increased numbers of mitosis figures. This relationship has also been noticed in women. Lapatinib is a tyrosine kinase inhibitor that acts by blocking the phosphorylation of HER2 receptors. Its use is linked to better results in the treatment of women with HER2+ tumors. The aim was to access the effects of lapatinib on primary and metastatic canine mammary gland carcinoma cell cultures *in vitro*. Cell cultures from four primary mammary carcinoma and two metastases that were previously established and characterized were expanded, treated with lapatinib at concentrations of 0.1, 0.5, 1 and 3 $\mu$ M, for 24h, and had their inhibitory concentration of 50% of the cells (IC<sub>50</sub>) determined. In addition, we verified the expression of HER2 from all cell cultures. The IC<sub>50</sub> of the cells ranged from 0.01 to 0.58  $\mu$ M. Furthermore, lapatinib was able to inhibit the viability of all treated cell cultures. The higher the expression of *HER2* in a culture the more sensitive it was to lapatinib. Therefore, treatment with lapatinib can be a promising option for canine patients with primary or metastatic mammary gland carcinoma and can be used especially in animals with HER2+ neoplasms.

**Key words:** dog, cancer, oncology, molecular targets, target therapy

# **CAPÍTULO 1**

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Devido aos avanços na medicina veterinária, a expectativa de vida dos cães vem aumentando progressivamente. Conseqüentemente, doenças ligadas ao envelhecimento tornam-se cada vez mais comuns entre esses animais e nesse contexto, as neoplasias representam uma das mais importantes enfermidades que acometem os cães (ROWELL et al., 2011).

O câncer é considerado a principal causa de óbito em animais de idade avançada e a segunda causa mais comum nos animais de companhia de todas as idades. Nos cães, as mais frequentemente diagnosticadas são as de pele, mama e testículo (BENTUBO et al., 2007; TRAPP et al., 2010).

Nas fêmeas, dentre todas as neoplasias, as de mama são as mais comuns, principalmente em animais acima de 7 anos, não castrados ou castrados após a idade adulta e com histórico de pseudociese (FONSECA; DALECK, 2000; OLIVEIRA et al., 2003). Estas neoplasias representam cerca de 50% dos diagnósticos de neoplasias, sendo que mais da metade é maligna (SLEECKX et al., 2011; PEÑA et al., 2014).

Geralmente, as neoplasias mamárias são de origem epitelial, contudo podem ter origem mista (componente epitelial e mesenquimal, concomitante) ou mesenquimal (SORENMO, 2003; GOLDSCHMIDT et al., 2011). Sua incidência está relacionada com os hormônios sexuais e em países onde a ovariectomia (OHE) é realizada precocemente, a incidência desta neoplasia é extremamente baixa (SORENMO, 2003; SLEECKX et al., 2011).

Do ponto de vista epidemiológico e morfológico, as neoplasias mamárias de humanos e cães possuem diversas semelhanças, principalmente quanto a classificação histológica (PINHO et al., 2012) e aspectos moleculares (NAM et al., 2020; KHAND et al., 2020). Uma possível justificativa para estas semelhanças é o fato de que, por viverem no mesmo ambiente, ambas espécies são expostas aos mesmos agentes carcinogênicos, sendo que os fatores de risco são semelhantes. Esta relação entre o ambiente e o aparecimento de neoplasias em humanos e cães já foi observada em casos de carcinoma mamário, linfoma, carcinoma de pulmão e osteossarcoma (YU; CHEAH, 2017).

Na medicina humana, o estudo das alterações genéticas relacionados ao desenvolvimento de neoplasias, levou ao descobrimento de marcadores moleculares tanto gênicos quanto proteicos, que além de possibilitarem a

detecção precoce de neoplasias, também possuem valor prognóstico e preditivo. O estudo desses marcadores fez com que a medicina humana caminhasse em direção a medicina de precisão, sendo que cada paciente é tratado levando em conta as especificidades da neoplasia que se desenvolveu. Como exemplos desses marcadores, podemos citar o receptor do fator de crescimento epidérmico (ERBB2 ou HER2), que quando super expresso está associado à maior malignidade da neoplasia. Nestas situações, os pacientes podem ser tratados com o anticorpo monoclonal trastuzumab e os resultados se demonstram satisfatórios (SINDRANSKY, 2002; DANIELS et al., 2019).

O receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) é um gene que se apresenta amplificado em aproximadamente 15% a 20% dos cânceres de mama em mulheres, conseqüentemente a proteína correspondente a esse gene é também encontrada em maior quantidade nestas células (WOLFF et al., 2013; WAKS et al., 2019). Sua principal função é mediar a proliferação celular e progressão do ciclo celular promovendo um comportamento mais agressivo dos tumores (HOLBRO et al., 2003; ASIF et al., 2016). Assim, estudos mostraram que mulheres cujas neoplasias exibem superexpressão de HER2 têm uma forma mais agressiva de câncer de mama, associada a uma sobrevida livre de doença e sobrevida global significativamente reduzidas em comparação com mulheres cujos tumores não superexpressam HER2 (ROSS et al., 2009; ASIF et al., 2016).

Como o HER2 é de extrema importância nas neoplasias mamárias de humanos, tendo um papel fundamental no prognóstico e tratamento, na medicina veterinária o estudo desse receptor pode trazer grandes benefícios aos cães, uma vez que o HER2 pode participar dos mesmos processos biológicos dos tumores nas cadelas, assim como ocorre nas mulheres.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### *2.1 Neoplasias mamárias*

As doenças que acometem animais idosos, como as neoplasias, são cada vez mais frequentes, uma vez que os animais de companhia estão atingindo uma maior expectativa de vida a cada ano. Isso ocorre devido as novas técnicas diagnósticas e tratamentos descobertos devido ao avanço tecnológico. Fatores

ambientais e condições genéticas também influenciam o aparecimento de neoplasias (GRÜNTZIG et al., 2016).

Em humanos, o câncer é uma das principais causas de mortalidade mundial, com aproximadamente 14 milhões de novos casos relatados em 2012 (FERLAY et al., 2013). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) o câncer é a segunda maior causa de morte em humanos no mundo, sendo responsável por 9,6 milhões em 2018, sendo que 1 em cada 6 mortes está ligada as neoplasias.

De acordo com a *International Agency for Research on Cancer*, dentre todas as neoplasias, as mamárias são o tipo mais frequente em mulheres. Em 2018, 626.679 mulheres morreram em decorrência desta afecção, o que representa cerca de 15% de todas as mortes relacionadas às neoplasias em mulheres. Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) em 2018, 16.724 mulheres morreram de câncer de mama no Brasil. Em mulheres, a neoplasia mamária mais diagnosticada é o carcinoma ductal invasivo (ABDELMEGEED; MOHAMMED, 2018).

Em um estudo realizado por Bronson em 1982, no qual 2002 animais foram necropsiados, 39% desses tiveram suas mortes diretamente ligadas a neoplasias, sendo que em animais com até 5 anos, as neoplasias foram responsáveis por 20% das mortes e acima de 10 anos o óbito foi diretamente relacionado à complicações decorrentes de neoplasias em pelo menos 40% dos animais necropsiados.

Nas cadelas, as neoplasias mamárias apresentam alta incidência, especialmente nos animais não castrados (SORENMO, 2003). É a segunda neoplasia mais comum em cães, atrás apenas das cutâneas, sendo mais comuns ainda em cadelas idosas e não castradas (BENTUBO et al., 2007; TRAPP et al., 2010).

As neoplasias mamárias representam cerca de 50% de todas as neoplasias em fêmeas caninas (NOVOSAD, 2003). Em um estudo nacional, cerca de 70% dos tumores de mama de cadelas, foram, classificados como malignos, sendo que a maioria das neoplasias malignas são carcinomas (OLIVEIRA et al., 2003). Além disso, das cadelas que apresentam neoplasias malignas, aproximadamente 30% possuem metástases em linfonodos (OLIVEIRA FILHO et al., 2010).

A maioria das cadelas possuem cinco pares de glândulas mamárias e sua classificação ocorre pelo posicionamento das mesmas. Os dois pares de mamas torácicas são divididos em mamas torácicas craniais (M1) e caudais (M2), os dois pares de mamas abdominais, divididos em craniais (M3) e caudais (M4), e um par de mamas inguinais (M5). As mamas classificadas como M4 e M5 são as mais acometidas pelos tumores, devido à maior quantidade de tecido adiposo e glandular nessa região (DALECK; DE NARDI, 2016).

Os hormônios esteroides são responsáveis pelo desenvolvimento da glândula mamária da cadela e, por esse motivo, algumas neoplasias podem ser consideradas hormônio-dependentes. Nos primeiros ciclos estrais da cadela, que ocorrem em sua puberdade, o aumento do estrógeno produzido pelos folículos ovarianos estimula o crescimento ductal, levando a uma hiperplasia das células secretoras mamárias. Além do aumento do estrógeno, a progesterona produzida pelos corpos lúteos após a ovulação também irá apresentar níveis sanguíneos elevados, levando ao crescimento dos lóbulos alveolares (PEÑA, et al., 2014).

Outro hormônio envolvido no desenvolvimento da glândula mamária da cadela é a prolactina, produzida na adeno-hipófise, que atua estimulando o crescimento das glândulas mamárias durante a gestação, além de estimular a produção e secreção láctea (QUEIROGA et al., 2005; SLEECKX et al., 2011). Apesar de raro, as neoplasias mamárias podem acometer machos (SABA et al., 2007; KWON, et al., 2017). Contudo, são mais frequentes nas fêmeas, já que ao longo da vida o tecido mamário delas é submetido diversas vezes a ação dos hormônios durante o ciclo estral (DE NARDI et al., 2002; SORENMO, 2003). Sendo o estrógeno o principal hormônio do ciclo estral que estimula a proliferação do epitélio mamário (FONSECA; DALECK, 2000; SORENMO et al., 2000; QUEIROGA et al., 2005).

## *2.2 Sinais clínicos e diagnóstico*

Animais que desenvolvem neoplasias mamárias geralmente se apresentam saudáveis, sendo a principal queixa o aparecimento de um ou múltiplos nódulos na região mamária. O diagnóstico em um primeiro momento é realizado pela associação do histórico, exame clínico, especialmente uma cuidadosa palpação das glândulas mamárias (SORENMO et al., 2011). Estas

neoplasias têm diversas apresentações clínicas, podendo surgir como nódulos únicos, múltiplos ou em placa, de tamanho variado, com consistência firme ou macia, podendo ser móveis ou aderidos à pele e/ou musculatura. Além disso podem ser ulcerados e acompanhados de inflamação ou infecção local (CASSALI et al., 2011).

O próximo passo após a suspeita clínica de neoplasia mamária, é o exame de citologia aspirativa por agulha fina, com o intuito de diferenciar a possível neoplasia mamária de outros processos que podem ocorrer na região, como inflamação ou hiperplasia da glândula mamária e até mesmo neoplasias de outra origem (SIMEONOV; STOIKOV, 2006; KUPPUSAMY et al., 2019).

Assim como na maioria das neoplasias, o diagnóstico definitivo deve ser realizado pelo exame histopatológico, seja por biópsia ou após excisão cirúrgica (SIMEONOV; STOIKOV, 2006). Por meio desta técnica é possível se obter mais informações sobre a lesão como o grau de malignidade da neoplasia, além de classificá-la quanto à sua origem (ELSTON; ELLIS, 1998; PAGE et al., 1998; CASSALI et al., 2017).

Em associação com o diagnóstico da neoplasia, é de fundamental importância avaliar o estado geral do animal. Exames complementares, como hemograma e bioquímico, podem elucidar alterações que muitas vezes estão relacionadas com a neoplasia mamária como anemia, coagulopatias, leucopenia ou leucocitose, alterações hepáticas, renais e síndromes paraneoplásicas (CHILDRESS., 2012). Após o diagnóstico é essencial a realização de exames de imagem, como raio-x e ultrassom, que tornarão possível a detecção de metástases distantes em tórax e tecidos moles (CASSALI et al., 2011).

Outra característica das neoplasias mamárias que deve ser levada em conta no momento do diagnóstico é a sua alta taxa de metástase em linfonodos. Portanto, a avaliação desses também serve como fator prognóstico dos pacientes. Além da palpação dos órgãos, a citologia aspirativa por agulha fina pode ser empregada, já que é o método mais seguro para o diagnóstico quando há algum tipo de alteração no formato, tamanho ou consistência dos linfonodos (SORENMO, 2011).

### 2.3 Estadiamento

Após o diagnóstico da neoplasia, é de grande importância realizar o estadiamento tumoral do paciente. O estadiamento tem a função de auxiliar o médico veterinário tanto na determinação do prognóstico do animal, quanto na escolha da terapia a ser instituída (OWEN, 1980; CASSALI et al., 2017).

O estadiamento é realizado com base em três avaliações, sendo elas a extensão do tumor primário (T), o comprometimento dos linfonodos regionais (N) e a presença ou ausência de metástases distantes (M). Esses resultados são subdivididos em classificações que variam de acordo com as características da neoplasia (Tabela 1) (OWEN, 1980).

**Tabela 1.** Classificação baseada nas características da neoplasia encontrada no paciente (Adaptado de OWEN, 1980 e CASSALI et al., 2017).

(T) Tumor primário	(N) Linfonodos regionais	(M) Metástase em órgãos distantes
T0: não é possível identificar o tumor primário	N0: sem metástase em linfonodo	M0: sem metástase em órgãos distantes
T1: tumores menores que 3 cm	N1: linfonodo regional ipsilateral ao tumor	M1: presença de metástase em órgãos distantes, inclusive linfonodos distantes
T2: tumores entre 3 e 5 cm	N2: linfonodos regionais bilaterais envolvidos	
T3: tumores maiores que 5 cm		
T4: carcinoma inflamatório de qualquer tipo		

A partir das classificações quanto ao TNM o animal será estadiado de I a V (Tabela 2). De maneira geral, os animais em estádios mais baixos apresentam maior tempo de sobrevivência e um prognóstico mais favorável do que os animais em estádios mais altos. Entretanto, apesar do estadiamento ser uma ferramenta importante, nem sempre animais de um mesmo estágio têm uma evolução semelhante do quadro clínico. Isso se dá pela grande heterogeneidade quanto ao comportamento biológico entre as neoplasias, fazendo com que o prognóstico de neoplasias aparentemente semelhantes em um primeiro momento possa ser muito diferente (OWEN, 1980; VAN'T VEER et al., 2002; CASSALI et al., 2017).

**Tabela 2.** Possíveis estádios de acordo com o sistema TNM. T: tamanho do tumor; N: acometimento dos linfonodos regionais; M: presença ou ausência de metástases distantes. Adaptado de OWEN, 1980 e CASSALI et al., 2017.

	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>Estádio I</b>	Qualquer T1 (< 3cm)	N0	M0
<b>Estádio II</b>	Qualquer T2 (3 - 5cm)	N0	M0
<b>Estádio III</b>	Qualquer T3 (> 5cm)	N0	M0
<b>Estádio IV</b>	Todos os T	N1	M0
<b>Estádio V</b>	Todos os T	Todos os N	M1

#### 2.4 Tratamento

O tratamento de eleição para as neoplasias mamárias de cadelas é a cirurgia, e a técnica a ser utilizada depende do tamanho e localização do tumor, condição clínica do paciente e presença ou não de metástases (CASSALI et al., 2018). Em casos de tumores benignos ou tumores malignos sem metástases, pequenos, não invasivos, bem diferenciados, a cirurgia pode ser a única terapia instituída e as margens cirúrgicas devem sempre ser avaliadas em exame histopatológico da peça cirúrgica. Em casos de carcinomas inflamatórios a cirurgia é contraindicada (SLEECKX et al., 2011; CASSALI et al., 2018).

Em casos de neoplasias ER e/ou PR positivas a associação OHE é fundamental, e nos demais casos, essa a associação ainda será benéfica para prevenir novas neoplasias de útero e/ou ovário e infecções do sistema reprodutivo da fêmea, como a piometra (FONSECA; DALECK, 2000; SLEECKX et al., 2011; KRISTIANSEN et al., 2016). Além do caráter terapêutico, a OHE, quando realizada precocemente, tem caráter preventivo pois pode reduzir consideravelmente o risco do desenvolvimento de neoplasias mamárias por meio da remoção da influência hormonal do estrogênio e da progesterona no tecido mamário (SORENMO et al., 2000; SLEECKX et al., 2011).

A quimioterapia deve ser associada ao protocolo terapêutico com o intuito de evitar metástases e recidivas, além de auxiliar na eliminação de células tumorais residuais. Em casos de neoplasias inoperáveis ou em pacientes com metástases, a quimioterapia pode ser realizada de maneira paliativa, com o

objetivo de proporcionar uma melhor qualidade e expectativa de vida ao animal. Os quimioterápicos mais utilizados na medicina veterinária para o tratamento das neoplasias mamárias de cadelas são a doxorubicina associada com a ciclofosfamida, cisplatina, carboplatina, gencitabina e paclitaxel (DALECK; DE NARDI, 2016). A associação de inibidores de COX-2 é geralmente utilizada em neoplasias mais agressivas ou indiferenciadas, já que estas geralmente apresentam aumento da expressão de COX-2. Os fármacos mais utilizados com esse intuito na medicina veterinária são o Piroxicam, Firocoxibe, Carprofeno e Cetoprofeno (LAVALLE et al., 2009; CASSALI et al., 2017).

Mesmo com alto custo e baixa acessibilidade em regiões distantes de grandes centros urbanos, a radioterapia também pode ser uma opção para neoplasias que não foram completamente removidas ou em locais de difícil acesso, como tentativa de redução de uma massa muito grande ou em caso de metástases (SORENMO, 2003; SLEECKX et al., 2011).

Apesar da terapia alvo já ser amplamente difundida na oncologia humana, na medicina veterinária ainda é um conceito de difícil aplicação na rotina clínica. Existem poucos estudos nesta área dentro da medicina de animais e o custo das terapias muitas vezes é proibitivo. Pesquisas na área podem alavancar o desenvolvimento de medicamentos destinados ao uso veterinário, objetivando a medicina personalizada e, conseqüentemente, fazendo com que os clínicos tenham mais alternativas terapêuticas frente às neoplasias mamárias em cães (SLEECKX et al., 2011), uma vez que atualmente, o tratamento indicado na grande maioria dos casos é a exérese cirúrgica e em casos mais agressivos, a associação da quimioterapia (CASSALI et al., 2018).

Em casos de metástase, a remoção do linfonodo sentinela é recomendada durante a mastectomia e o corante o azul patente na dose de 2mg/kg pode ser utilizado para facilitar a localização dos linfonodos. Tanto nas metástases locais quanto distantes a quimioterapia adjuvante é indicada, sendo que a associação de fármacos na quimioterapia apresenta melhores resultados do que quando apenas um fármaco é utilizado. Em casos de doença metastática avançada, em que o animal se encontra debilitado, a quimioterapia metronômica com ciclofosfamida e carprofeno ou firocoxibe pode ser indicada (CASSALI et al., 2018).

## 2.5 Receptores

Atualmente é fundamental o entendimento de que as neoplasias mamárias, tanto em humanos quanto em cães, apresentam grande heterogeneidade entre si (BERTUCCI; BIRNBAUM, 2008). Portanto, a identificação de fatores que possam ser utilizados como focos da terapia antineoplásica de modo a individualizar os pacientes é de grande valia, de maneira que para cada caso possa se instituir uma terapia de precisão, tendo em foco as particularidades de cada indivíduo (BERTUCCI; BIRNBAUM, 2008). Em vista disso, a classificação das neoplasias em humanos quanto a expressão de receptores HER2 (fator de crescimento epidérmico 2), receptores de estrógenos e receptores de progesterona é fundamental para instituir a terapia adequada a cada subtipo tumoral (CHACÓN; CONSTANZO, 2010).

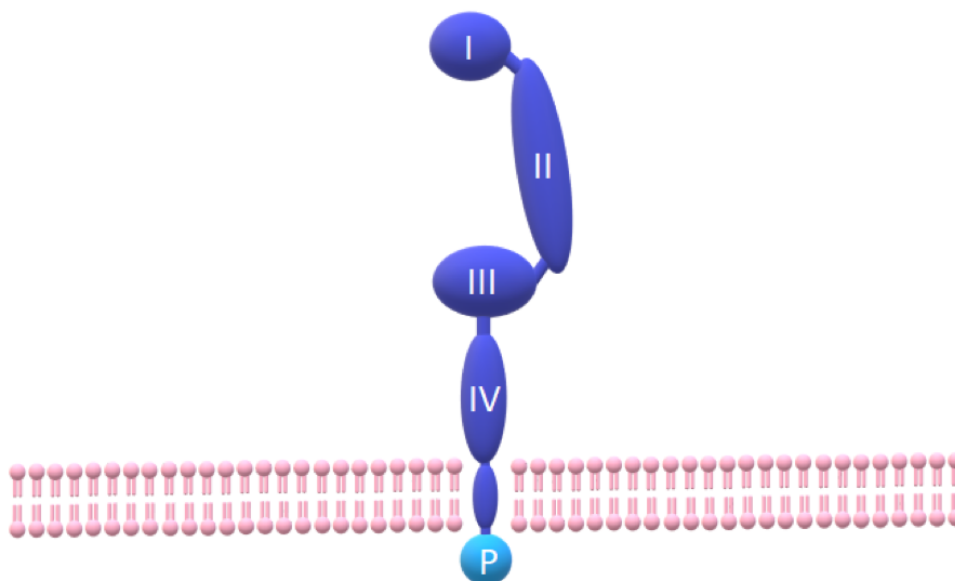
O *HER2* foi descrito em 1984 por SHRETCHEER et al. (1984), e em cães está localizado no cromossomo 1 (ESCOBAR et al., 2001), codificando uma proteína transmembrana do tipo receptor tirosina-quinase, que é um membro da família dos receptores de fator de crescimento epidérmico (EGFR) (ROSS et al., 2004). Além disso, a localização do gene *HER2*, no cromossomo 1 do cão (1q13) coincide com uma região frequentemente acometida por mutações em neoplasias caninas. Portanto, possivelmente mutações no *HER2* podem ter um papel importante em diversos tipos de neoplasias em cães (ESCOBAR et al., 2001; YOSHIMOTO et al., 2019a; YOSHIMOTO et al., 2019b; YOSHIMOTO et al., 2020).

Além do HER2, outras proteínas pertencem a esta família, incluindo o HER1 ou EGFR, HER3 e o HER4, sendo que todas estas são receptores transmembrana do tipo tirosina-quinase (ANDERSON et al., 2002). Após a conexão com um ligante, esses receptores formam homodímeros ou heterodímeros com outros membros da família, causando a autofosforilação do domínio tirosina-quinase intracelular e iniciando uma cascata de sinalização (ROSKOSKI, 2004; ARKHIPOV et al., 2013).

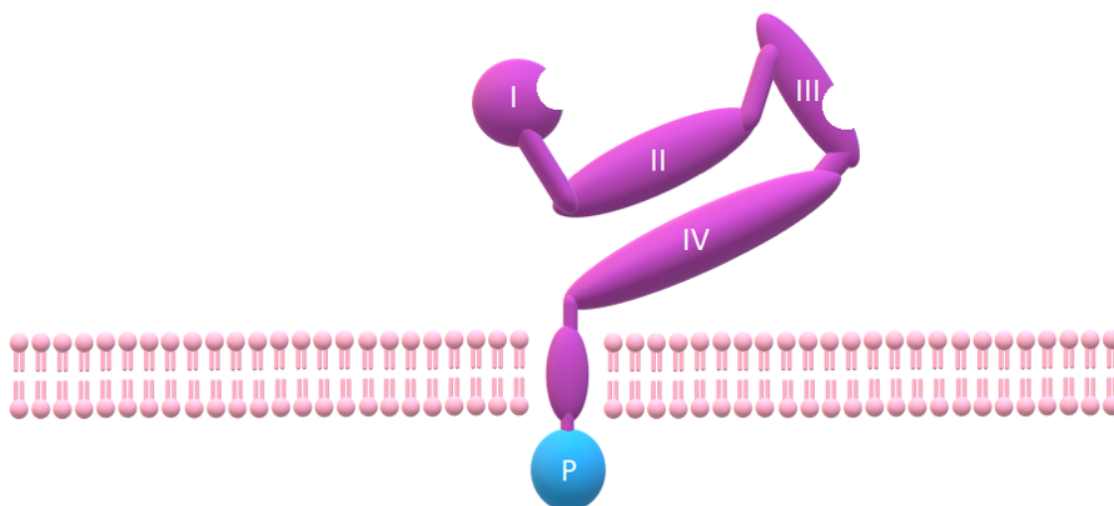
Esta família de receptores está envolvida na comunicação entre células e estroma, principalmente pela transdução de sinal, na qual fatores de crescimento externos afetam a transcrição de vários genes, por fosforilação ou desfosforilação de proteínas transmembranas, e intermediários de sinalização intracelular, muitos dos quais possuem atividade enzimática. O sinal é

transmitido ao longo da via por ativação da atividade enzimática de uma proteína, que ativa a próxima proteína, formando uma espécie de reação em cadeia (HUDIS, 2007; ARKHIPOV et al., 2013).

Os receptores da família do EGFR apresentam 4 domínios externos (Figura 1), sendo que a ligação com ligantes externos é realizada nos sítios I e III ao mesmo tempo. Diferentemente dos outros receptores de sua família, o HER2 não possui um local para ligação de uma molécula externa. Na ausência de um ligante, o EGFR, HER3 e HER4 assumem uma conformação "amarrada", ou seja, o domínio extracelular II é oculto por interações intramoleculares entre os domínios II e IV (Figura 2) (POHLMANN et al., 2009; ROSKOSKI et al., 2019).



**Figura 1.** Modelo estrutural dos receptores membros da família do EGFR. Esses receptores apresentam 4 sítios extracelulares (I, II, III e IV) e um grupo fosfato (P) intracelular (Adaptado de: POHLMANN et al., 2009).



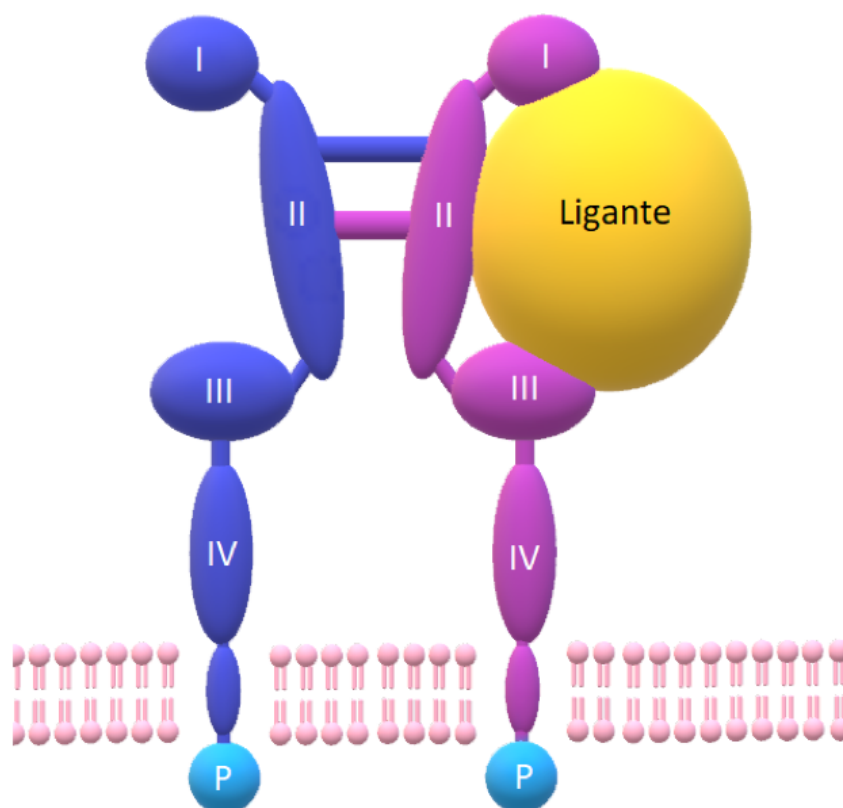
**Figura 2.** Modelo estrutural do EGFR, HER3 e HER4 na ausência de um ligante externo. O domínio extracelular II fica oculto devido às ligações entre ele e o domínio IV (Adaptado de: POHLMANN et al., 2009).

Quando estimulados por um ligante externo, o EGFR, HER3 e HER4 se dimerizam (Figura 3) com outros receptores da família formando homo ou heterodímeros, para que o grupo fosfato intracelular seja fosforilado e ocorra a ativação de uma via intracelular (POHLMANN et al., 2009).

Existem evidências que apontam para o HER2 como o receptor que mais frequentemente forma heterodímeros com os outros receptores HER. Portanto, provavelmente ele tem a função de ser um grande potencializador da sinalização de toda esta família de receptores (HOLBRO et al., 2003; ARKHIPOV et al., 2013).

A sinalização intracelular em que o HER2 participa é complexa, pois dependendo do heterodímero formado por ele, uma via é preferencialmente estimulada. Caso o HER2 esteja associado ao EGFR, ele irá estimular preferencialmente a via do MAPK e caso esteja associado ao HER3, o estímulo será preferencialmente a via do PI3K/AKT, porém independente de qual dímero será formado pelo HER2 a vias do MAPK e PI3K/AKT serão estimuladas, sendo que a ativação destas vias leva ao aumento da sobrevivência, proliferação celular e progressão do ciclo celular. Além disso, cada combinação de heterodímero que o HER2 participa irá ser responsiva a um ligante externo diferente, portanto o

HER2 está associado a diferentes estímulos extracelulares e vias intracelulares (HOLBRO et al., 2003; ROSKOSKI et al., 2019).



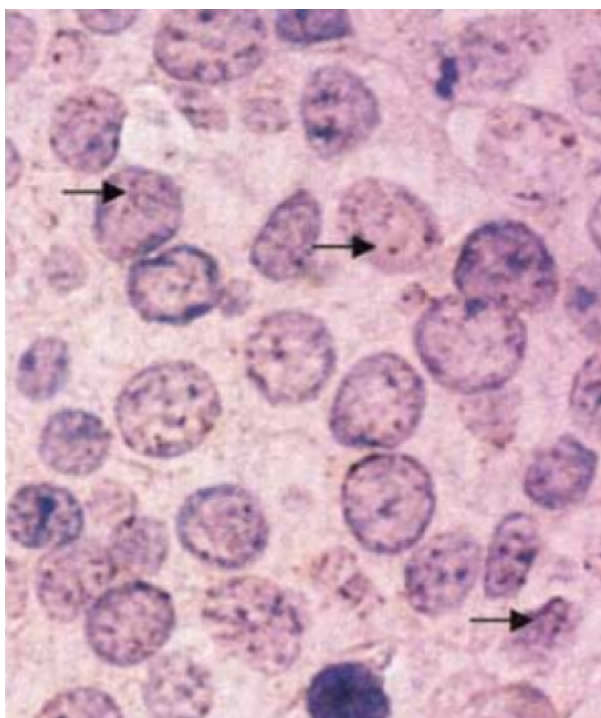
**Figura 3.** Formação de dímero entre os membros da família do EGFR. Quando estimulados por um ligante externo, esses receptores se dimerizam com outros membros da família por meio de ligações entre o domínio II dos dois receptores, para que o grupo fosfato interno seja fosforilado e ocorra a ativação de uma via intracelular (Adaptado de: POHLMANN et al., 2009).

Durante a oncogênese, além da perda de função de genes supressores tumorais, o processo de ganho de função de oncogenes e o acúmulo destas mutações têm um papel fundamental na transformação de uma célula normal em uma célula cancerígena. Esse processo, ao longo do tempo, pode fazer com que as células ganhem características como a capacidade de crescimento autossuficiente, resistência à apoptose, capacidade de estimular a angiogênese, potencial de replicação ilimitado, falta de resposta à inibição da multiplicação celular, desregulação do balanço energético celular, capacidade de evitar a destruição pelo sistema imunológico, instabilidade genética, capacidade de

promover inflamação, invasão tecidual e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O proto-oncogene *HER2* apresenta-se superexpresso em 15-20% das neoplasias mamárias em mulheres e em torno de 21% em cães (WOLFF et al., 2013; GAMA et al., 2008). Além disso, o aumento da expressão do *HER2* está diretamente ligado comportamento tumoral mais agressivo com menor tempo de sobrevida livre de doença (ROSS et al., 2009).

Em humanos, o *HER2* se apresentou amplificado em 85-90% dos pacientes com superexpressão de *HER2* em neoplasias mamárias. Nos demais pacientes, a superexpressão ocorreu sem o aumento do número de cópias (JOHNSON et al., 2000; JI et al., 2015). Em estudo realizado por De Las Mulas et al. (2003), por meio da hibridização *in situ* cromogênica (CISH), foi observado que em cães, a superexpressão de *HER2* ocorre sem o aumento do número de cópias do gene (Figura 4). Portanto, as neoplasias mamárias que superexpressam *HER2* em cães provavelmente são mais semelhantes às 10-15% das neoplasias mamárias de humanos que apresentam aumento da quantidade da proteína *HER2*, porém sem amplificação do gene (DE LAS MULAS et al., 2003).



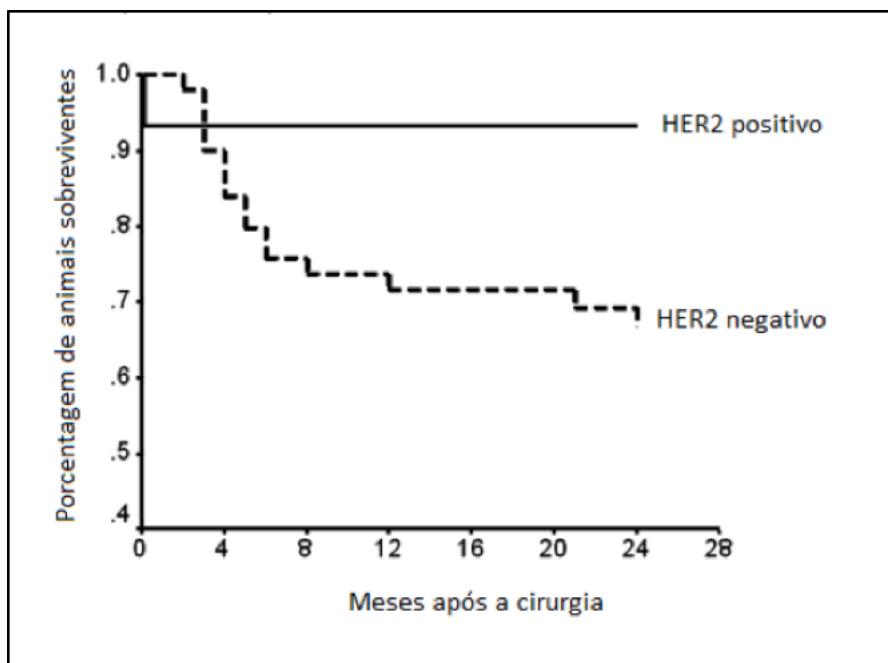
**Figura 4.** Neoplasia mamária de cadela. Técnica de CISH para *HER2*. Um a quatro pontos marrons por núcleo em células de carcinoma mamário de cadela, CISH, 40× (DE LAS MULAS et al., 2003).

### *2.6 Características clínicas associadas com a expressão de HER2*

Pacientes humanos que apresentem neoplasias HER2+ estão mais susceptíveis à metástases em linfonodos, menor tempo de sobrevida livre de doença e diminuição da expressão de ER e PR. Portanto, também têm menor taxa de sucesso frente a terapias endócrinas (ROSS et al., 2009). Ademais, neoplasias HER2+ costumam apresentar aumento da proliferação e migração celular, da invasividade tumoral, da frequência de metástases, angiogênese e diminuição da apoptose (ROSS et al., 2009).

Em um estudo realizado em 2009 em cães, concluiu-se que a expressão da proteína HER2 não se correlaciona com peso corporal, estadio, tamanho da neoplasia, localização da glândula afetada, número de nódulos, classificação histológica, metástase linfonodal ou metástase distante. No entanto, a superexpressão do HER2 foi correlacionada com a realização ou não de ovariectomia nesses animais. Cães submetidos a castração, antes ou durante o procedimento cirúrgico para a remoção da neoplasia, apresentaram maior probabilidade de apresentar superexpressão da proteína HER2 do que aqueles animais que não haviam sido castrados (HSU et al., 2009).

Ainda no mesmo estudo, diferente do que é observado em humanos, a taxa geral de sobrevida em dois anos mostrou que os cães com neoplasias malignas que superexpressavam HER2 tiveram tempos de sobrevida global mais longos do que os cães com neoplasias negativas para HER2, como pode ser observado na Figura 5 (HSU et al., 2009).



**Figura 5.** Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, mostrando a relação entre Expressão de HER-2 e sobrevivência de 2 anos em 66 cães com neoplasias mamárias malignas após a remoção cirúrgica (HSU et. al, 2009).

Na medicina veterinária o papel do HER2 nas neoplasias mamárias ainda não é claro. Estudos reportam taxas muito variadas de superexpressão de HER2 pela imunohistoquímica, desde 4,9% (NGUYEN, et al., 2018) até 28% (RESSEL et al., 2013). Em alguns casos a aplicabilidade desta técnica com os anticorpos utilizados atualmente é até questionada, são relatadas marcações citoplasmáticas inespecíficas e resultados de imunohistoquímica incompatíveis com a RT-qPCR (Burrai et al., 2015).

Por outro lado, ARAÚJO et al. (2016) comparou a expressão por imunohistoquímica de HER2 entre neoplasias primárias de mama em cadelas e suas metástases em linfonodos e observou um aumento da expressão do HER2 nas metástases. Segundo o autor, isso provavelmente aponta para a importância do HER2 no processo de implantação de células neoplásicas em seus nichos metastáticos.

Há muito tempo se sabe da importância de se averiguar a expressão de HER2 nos pacientes humanos com câncer de mama. Já é definido que sem terapias específicas esses pacientes apresentam um pior prognóstico com menor tempo de sobrevida e uma progressão mais veloz e agressiva da doença,

possivelmente pela super ativação de vias que levam a um estímulo da proliferação das células neoplásicas (SWAIN et al., 2015; TOKUNAGA et al., 2006).

Na veterinária ainda se discute muito a importância do HER2 nas neoplasias mamárias. Não havendo um consenso sobre o seu papel na progressão e agressividade da doença e nem se ele pode ser utilizado como um alvo terapêutico com bons resultados para animais que o apresentem superexpresso (Burrai, et al., 2015). No entanto, estudos apontam para uma importância grande do HER2 nas neoplasias mamárias em cães, tendo relacionado o aumento da expressão de HER2 com pleomorfismo celular e número de figuras de mitose em neoplasias mamárias, sendo que esta relação já foi observada em humanos (DUTRA et al., 2004; YANG et al., 2001; ASIF et al., 2016).

### *2.7 Tratamento das neoplasias HER2+*

Com foco na medicina personalizada, o trastuzumab, um anticorpo monoclonal, foi o primeiro fármaco aprovado no tratamento de neoplasias mamárias HER2+ em humanos (CARTER et al., 1992). Ao se ligar no domínio IV extracelular do HER2, o trastuzumab impede a fosforilação do domínio tirosina-quinase interno do receptor. Além desse efeito, esse anticorpo monoclonal pode agir prevenindo a dimerização do HER2 e causando endocitose do receptor (KÜMLER et al., 2014).

Em pacientes com a doença em estágio inicial, a associação do trastuzumab com a quimioterapia convencional apresentou benefícios quanto à sobrevida livre de doença, sobrevida média, recidiva local e distante da doença nos pacientes em comparação com a quimioterapia. Contudo, houve aumento da incidência de recidivas no sistema nervoso central e algumas neoplasias HER2+ são resistentes a terapias com trastuzumab. Estudos têm demonstrado que esse fármaco pode induzir a produção de anticorpos anti-trastuzumab, em vista do tamanho da sua molécula, o que leva a ineficiência da terapia em longo prazo (YIN et al., 2011).

Além do trastuzumab outro anticorpo monoclonal do HER2 é o pertuzumab. Esse anticorpo se liga no domínio extracelular II, impedindo a formação de dímeros em que o HER2 participe. Em estudo realizado por SWAIN

(2015) utilizando a associação de trastuzumab e docetaxel, o pertuzumab foi responsável pelo aumento da sobrevida média de mulheres com câncer de mama metastático HER2+, sendo que o grupo tratado com esses três fármacos teve uma sobrevida média de 56,5 meses e o grupo tratado com trastuzumab, docetaxel e placebo teve uma sobrevida média de 40,8 meses.

Por serem anticorpos monoclonais desenvolvidos para o uso em humanos, para que o trastuzumab e o pertuzumab possam ser empregados na medicina veterinária eles teriam que ser modificados, de modo a evitar que o sistema imunológico do paciente destrua os anticorpos e também para garantir que esses anticorpos irão realmente se ligar ao seu sítio correspondente na proteína alvo (FAZEKAS et. al, 2016). Ademais, esse processo de modificação de um anticorpo monoclonal é custoso e complexo, tendo sido realizado poucas vezes (FAZEKAS et. al, 2016; SINGER et. al, 2014). Nesse sentido, busca-se por alternativas para o tratamento de neoplasias HER2+.

Outra classe de fármacos que pode auxiliar no tratamento de neoplasias HER2+, além dos anticorpos monoclonais, são os inibidores de tirosina-quinase. Dentre esses inibidores, o lapatinibe é considerado uma alternativa terapêutica frente a neoplasias HER2+, atuando como um bloqueador reversível da fosforilação dos receptores HER1 e HER2 (ARTEAGA et al., 2012; ROSKOSKI et al., 2019).

Ao impedir a fosforilação, o lapatinibe impede um mecanismo de ativação da via PI3K/AKT e MAPK, resultando no aumento da taxa de apoptose e diminuição no crescimento e proliferação celular. Além disso, o lapatinibe pode ser administrado por via oral e não apresenta efeitos colaterais intensos em humanos (MEDINA; GOODIN, 2008; ROSKOSKI et al., 2019).

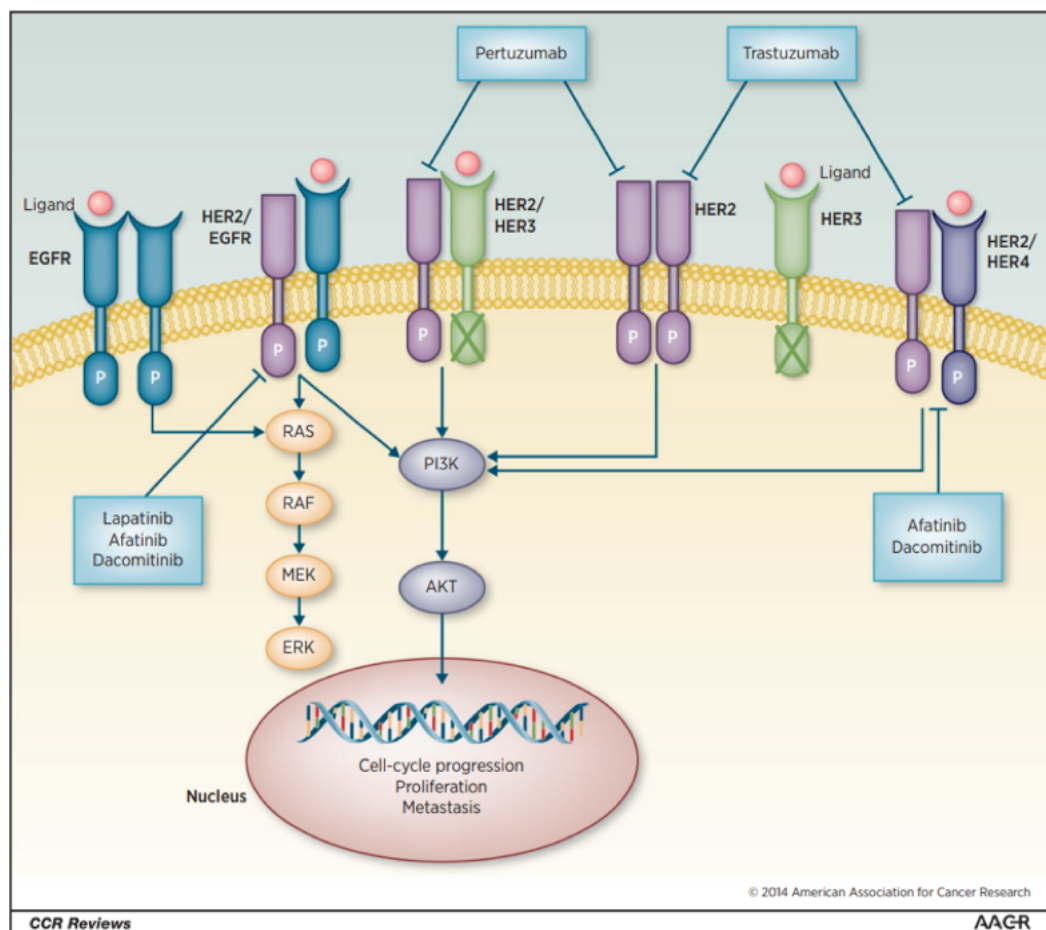
Em um estudo realizado com pacientes humanas com carcinoma de mama HER2+ sem metástases, a não ser em linfonodo axilar, o tratamento experimental com lapatinibe associado ao trastuzumab e paclitaxel foi superior ao tratamento com pertuzumab associado com trastuzumab e paclitaxel. Nesse estudo, no grupo do lapatinib, 100% dos pacientes apresentaram doença residual mínima ou nenhuma doença residual presente na mama ou axila após o tratamento farmacológico associado à cirurgia. No grupo do pertuzumab, apenas 62,5% dos pacientes apresentaram doença residual mínima ou ausente após a associação da terapia farmacológica e cirúrgica (PATEL, 2019).

A associação de lapatinibe e capecitabina apresentou resultados promissores em relação à progressão da doença quando comparada ao tratamento com apenas capecitabina em mulheres com câncer de mama avançado HER2+ não responsivo ao tratamento com antraciclinas, taxanos e trastuzumab (GEYER et al., 2007).

De maneira geral o lapatinibe é uma droga bastante utilizada na medicina humana em associação com outros fármacos quimioterápicos e inibidores de HER2, apresentando bons resultados mesmo quando outras terapias já foram instituídas sem sucesso (PATEL, 2019; GEYER et al., 2007). Além disso, o lapatinibe, ao contrário do trastuzumab, por ser uma molécula pequena, tem a capacidade de penetrar no sistema nervoso central, apresentando maior potencial no controle de metástases neoplásicas nessa região (ARTEAGA et al., 2012; PETRELI et al., 2017).

Outras opções dentro dos inibidores da tirosina-quinase são: o afatinib e dacomitinib, porém essas duas moléculas bloqueiam os receptores de maneira irreversível, sendo que o afatinib tem maior afinidade pelos receptores HER1, HER2 e HER4, já o dacomitinib é um inibidor pan-HER (POLLOCK; GRANDIS, 2015; ROSKOSKI et al., 2019).

De maneira resumida, os locais de ação e vias inibidas de cada medicamento desenvolvido para o uso em neoplasias HER2+ podem ser vistos na figura 6.



**Figura 6.** Receptores do fator de crescimento epidérmico humano (HER). HER1, HER2, HER3 e HER4, são receptores que desempenham um papel no crescimento celular, sobrevivência e diferenciação. Cada receptor é composto por um domínio de ligação extracelular, domínio transmembranar e um domínio tirosina-quinase. Após a ligação do ligante, os receptores formam homo ou heterodímeros e são ativados por fosforilação. Não há ligantes conhecidos para o HER2, que é o parceiro preferencial de dimerização entre todos os membros da família. A dimerização e subsequente fosforilação levam à ativação de alvos que participam das vias PI3K/AKT e MAPK. A ativação dessas vias aumenta a sobrevivência e proliferação celular e estimula a progressão do ciclo celular (POLLOCK; GRANDIS, 2015).

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ainda que estudos abordem a importância e demonstrem que a terapia alvo em mulheres com neoplasias mamárias HER2+ seja fundamental para uma melhor resposta frente ao tratamento, na veterinária os escassos trabalhos sobre esse assunto ainda impossibilitam a criação de um protocolo terapêutico

individualizado para o tratamento de cães com neoplasias mamárias que leve em consideração a expressão de HER2 (ANDERSON; AHMAD, 2002; ARTEAGA et al., 2012; CHACÓN; COSTANZO, 2010; GAMA et al., 2008). Além disso, a falta da padronização de fatores como a seleção de anticorpos, diluição, critérios de pontuação e ausência de controles apropriados para a técnica de imuno-histoquímica para o HER2 na medicina veterinária dificulta a comparação dos resultados de diferentes estudos (ABADIE et al., 2018).

Conforme mostrado ao longo desta revisão, existem muitas similaridades entre as neoplasias mamárias em humanos e cães, portanto é muito provável que o HER2 também desempenhe um papel de grande relevância no prognóstico, tempo de sobrevida e tratamento.

Mais estudos que abordem esse tema e auxiliem no entendimento do funcionamento do HER2 no cão poderão trazer grandes benefícios a medicina veterinária, possibilitando a associação de terapias específicas com a quimioterapia convencional, uma vez que mesmo com diferentes protocolos, pelo menos 75% dos pacientes em estágio IV e V têm um tempo de sobrevida menor do que 2 anos após o diagnóstico (DE CAMPOS et al., 2018).

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

ABADIE, J. et al. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 2: Immunophenotypes and prognostic significance. **Breast cancer research and treatment**, v. 167, n. 2, p. 459-468, 2018.

ABDELMEGEED, S. M.; MOHAMMED, S. Canine mammary tumors as a model for human disease. **Oncology letters**, v. 15, n. 6, p. 8195-8205, 2018.

ANDERSON, N. G. et al. ErbB receptor tyrosine kinase inhibitors as therapeutic agents. **Front Biosci**, v. 7, p. d1926-d1940, 2002.

ARAÚJO, M. R. et al. HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 expression in lymph node metastasis of canine mammary carcinomas: association with clinical-pathological parameters and overall survival. **Research in veterinary science**, v. 106, p. 121-130, 2016.

ARKHIPOV, A. et al. Her2 activation mechanism reflects evolutionary preservation of asymmetric ectodomain dimers in the human EGFR family. **Elife**, v. 2, p. e00708, 2013.

ARTEAGA, C. L. et al. Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 9, n. 1, p. 16, 2012.

BENTUBO, H. D. L. et al. Expectativa de vida e causas de morte em cães na área metropolitana de São Paulo (Brasil). **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1021-1026, 2007.

BERTUCCI, F., BIRNBAUM, D. Reasons for breast cancer heterogeneity. **Journal of Biology**, v. 7, n. 2, p. 6, 2008.

---

<sup>1</sup> Referências organizadas de acordo com ABNT (Associação Nacional de Normas Técnicas) – NBR 6023, Agosto /2002.

BONNETT, B. N. et al. Mortality in insured Swedish dogs: rates and causes of death in various breeds. **Veterinary Record**, v. 141, n. 2, p. 40-44, 1997.

BORG, Å. et al. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. **Cancer research**, v. 50, n. 14, p. 4332-4337, 1990.

BRONSON, R. T. Variation in age at death of dogs of different sexes and breeds. **American journal of veterinary research**, v. 43, n. 11, p. 2057-2059, 1982.

BURRAI, G. P. et al. Investigation of HER2 expression in canine mammary tumors by antibody-based, transcriptomic and mass spectrometry analysis: is the dog a suitable animal model for human breast cancer?. **Tumor Biology**, v. 36, n. 11, p. 9083-9091, 2015.

CARTER, P. et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 10, p. 4285-4289, 1992.

CASSALI, G. D. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian journal of veterinary pathology**, v. 4, n. 2, p. 153-180, 2011.

CASSALI, G. D. et al. Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors: benign mixed tumors, carcinomas in mixed tumors and carcinosarcomas. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 10, n. 3, p. 87-99, 2017.

CHACÓN, R. D.; COSTANZO, M. V. Triple-negative breast cancer. **Breast cancer research**, v. 12, n. 2, p. S3, 2010.

CHILDRESS, M. O. Hematologic abnormalities in the small animal cancer patient. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 42, n. 1, p. 123-155, 2012.

DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B. **Oncologia em cães e gatos**. Grupo Gen-Editora Roca Ltda., 2016.

DANIELS, B. et al. Trastuzumab use in older patients with HER2-positive metastatic breast cancer: outcomes and treatment patterns in a whole-of-population Australian cohort (2003–2015). **BMC cancer**, v. 19, n. 1, p. 909, 2019.

DE CAMPOS, C. B. et al. Adjuvant thalidomide and metronomic chemotherapy for the treatment of canine malignant mammary gland neoplasms. **in vivo**, v. 32, n. 6, p. 1659-1666, 2018.

DE LAS MULAS, J. M. et al. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas. **Breast cancer research and treatment**, v. 80, n. 3, p. 363-367, 2003.

DE NARDI, A. B. et al. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, v. 7, n. 2, 2002.

DOBSON, J. M. et al. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. **Journal of small animal practice**, v. 43, n. 6, p. 240-246, 2002.

DUTRA, A. P. et al. c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 11, p. 1673-1681, 2004.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. CW Elston & IO Ellis. *Histopathology* 1991; 19; 403–410: AUTHOR COMMENTARY. **Histopathology**, v. 41, n. 3a, p. 151-151, 2002.

ESCOBAR, H. M. et al. The canine ERBB2 gene maps to a chromosome region frequently affected by aberrations in tumors of the dog (*Canis familiaris*). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 94, n. 3-4, p. 194-195, 2001.

FAZEKAS, J. et al. Why man's best friend, the dog, could also benefit from an anti-HER-2 vaccine. **Oncology letters**, v. 12, n. 4, p. 2271-2276, 2016.

FERLAY, J. GLOBOCAN 2008, cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 10. [http://globocan. iarc. fr](http://globocan.iarc.fr), 2010.

FONSECA, C. S.; DALECK, C. R. Canine mammary tumors: hormonal influence and effects of ovariohysterectomy as an adjuvant therapy. **Ciência Rural**, v. 30, n. 4, p. 731-735, 2000.

GAMA, A.; ALVES, A.; SCHMITT, F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. **Virchows Archiv**, v. 453, n. 2, p. 123-132, 2008.

GEYER, C. E. et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 26, p. 2733-2743, 2006.

GOLDSCHMIDT, M. et al. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary pathology**, v. 48, n. 1, p. 117-131, 2011.

GRÜNTZIG, K. et al. Swiss canine cancer registry 1955–2008: Occurrence of the most common tumour diagnoses and influence of age, breed, body size, sex and neutering status on tumour development. **Journal of comparative pathology**, v. 155, n. 2-3, p. 156-170, 2016.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. *cell*, 100. **Transpl. Immunol**, v. 5, p. 179-183, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HOLBRO, T.; CIVENNI, G.; HYNES, N. E. The ErbB receptors and their role in cancer progression. In: **The EGF Receptor Family**. Academic Press, 2003. p. 103-114.

HSU, W. et al. Increased survival in dogs with malignant mammary tumours overexpressing HER-2 protein and detection of a silent single nucleotide polymorphism in the canine HER-2 gene. **The Veterinary Journal**, v. 180, n. 1, p. 116-123, 2009.

HUDIS, C. A. Trastuzumab—mechanism of action and use in clinical practice. **New England journal of medicine**, v. 357, n. 1, p. 39-51, 2007.

IARC. **International Agency for Research on Cancer**. Disponível em: <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf> Acesso em: 10 de dezembro 2019.

INCA. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em 18 de Setembro 2019.

JAUREGUI, H. O. et al. Trypan blue dye uptake and lactate dehydrogenase in adult rat hepatocytes—freshly isolated cells, cell suspensions, and primary monolayer cultures. **In vitro**, v. 17, n. 12, p. 1100-1110, 1981.

Jl, H. et al. The clinicopathologic and prognostic value of altered chromosome 17 centromere copy number in HER2 fish equivocal breast carcinomas. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0132824, 2015.

JOHNSON, R. C. et al. p185HER2 overexpression in human breast cancer using molecular and immunohistochemical methods. **Cancer investigation**, v. 18, n. 4, p. 336-342, 2000.

KHAND, F. M. et al. Microsatellite Instability and MMR Genes Abnormalities in Canine Mammary Gland Tumors. **Diagnostics**, v. 10, n. 2, p. 104, 2020.

KISSELBACH, L. et al. CD90 Expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures. **Cytotechnology**, v. 59, n. 1, p. 31-44, 2009.

KRISTIANSEN, V. M. et al. Effect of ovariohysterectomy at the time of tumor removal in dogs with mammary carcinomas: a randomized controlled trial. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 30, n. 1, p. 230-241, 2016.

KÜMLER, I.; TUXEN, M. K.; NIELSEN, D. L. A systematic review of dual targeting in HER2-positive breast cancer. **Cancer treatment reviews**, v. 40, n. 2, p. 259-270, 2014.

KUPPUSAMY, Krithiga et al. Cytological Grading of Breast Tumours-The Human and Canine Perspective. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, p. 283, 2019.

KWON, S. et al. Mammary gland tumors in a male Cocker Spaniel. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 59, n. 1, p. 1-6, 2017.

LAVALLE, G. E. et al. Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. **Veterinary pathology**, v. 46, n. 6, p. 1275-1280, 2009.

LAZIC, S. E.; CLARKE-WILLIAMS, C. J.; MUNAFÒ, M. R. What exactly is 'N' in cell culture and animal experiments?. **PLoS biology**, v. 16, n. 4, p. e2005282, 2018.

MEDINA, P. J.; GOODIN, S. Lapatinib: a dual inhibitor of human epidermal growth factor receptor tyrosine kinases. **Clinical therapeutics**, v. 30, n. 8, p. 1426-1447, 2008.

MOULTON, J. E. et al. Canine mammary tumors. **Pathologia veterinaria**, v. 7, n. 4, p. 289-320, 1970.

MUÑOZ, J. J. et al. A comprehensive characterization of cell cultures and xenografts derived from a human verrucous penile carcinoma. **Tumor Biology**, v. 37, n. 8, p. 11375-11384, 2016.

NAM, A. R. et al. Alternative methylation of intron motifs is associated with cancer-related gene expression in both canine mammary tumor and human breast cancer. **Clinical Epigenetics**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2020.

NGUYEN, F. et al. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 1: natural history and prognostic factors. **Breast cancer research and treatment**, v. 167, n. 3, p. 635-648, 2018.

NOVOSAD, C. A. Principles of treatment for mammary gland tumors. **Clinical techniques in small animal practice**, v. 18, n. 2, p. 107-109, 2003.

OLIVEIRA, L. O. et al. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. **Acta scientiae veterinariae. Porto Alegre, RS. Vol. 31, n. 2 (2003), p. 105-110**, 2003.

OLIVEIRA FILHO, J. C. et al. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 177-185, 2010.

OMS. **Organização Mundial da Saúde**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> Acesso em: 10 de dezembro 2019.

OWEN, L. N. et al. **TNM Classification of Tumours in Domestic Animals/edited by LN Owen**. Geneva: World Health Organization, 1980.

PAGE, D. L.; JENSEN, R. A.; SIMPSON, J. F. Routinely available indicators of prognosis in breast cancer. In: **Prognostic variables in node-negative and node-positive breast cancer**. Springer, Boston, MA, 1998. p. 3-16.

PATEL, T. A. et al. A randomized, controlled phase II trial of neoadjuvant adotrastuzumab emtansine, lapatinib, and nab-paclitaxel versus trastuzumab, pertuzumab, and paclitaxel in HER2-positive breast cancer (TEAL study). **Breast Cancer Research**, v. 21, n. 1, p. 1-9, 2019.

PEÑA, L. et al. Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. **Veterinary pathology**, v. 51, n. 1, p. 127-145, 2014.

PETRELLI, F. et al. The efficacy of lapatinib and capecitabine in HER-2 positive breast cancer with brain metastases: a systematic review and pooled analysis. **European Journal of Cancer**, v. 84, p. 141-148, 2017.

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

POHLMANN, P. R.; MAYER, I. A.; MERNAUGH, R. Resistance to trastuzumab in breast cancer. **Clinical cancer research**, v. 15, n. 24, p. 7479-7491, 2009.

POLLOCK, N. I.; GRANDIS, J. R. HER2 as a therapeutic target in head and neck squamous cell carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 3, p. 526-533, 2015.

QUEIROGA, F. L. et al. Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 94, n. 1-3, p. 181-187, 2005.

QUEIROGA, F. L. et al. Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: most recent findings. **in vivo**, v. 25, n. 3, p. 455-465, 2011.

RESSEL, L. et al. HER-2 expression in canine morphologically normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissues and its correlation with the clinical outcome. **Research in veterinary science**, v. 94, n. 2, p. 299-305, 2013.

RODRIGUEZ, L. G.; WU, X.; GUAN, J. L. Wound-healing assay. In: **Cell Migration**. Humana Press, 2005. p. 23-29.

ROSKOSKI JR, Robert. Small molecule inhibitors targeting the EGFR/ErbB family of protein-tyrosine kinases in human cancers. **Pharmacological Research**, v. 139, p. 395-411, 2019.

ROSKOSKI JR, R. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 319, n. 1, p. 1-11, 2004.

ROSS, J. S. et al. Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 3, n. 4, p. 379-398, 2004.

ROSS, J. S. et al. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. **The oncologist**, v. 14, n. 4, p. 320-368, 2009.

ROWELL, J. L.; MCCARTHY, D. O.; ALVAREZ, C. E. Dog models of naturally occurring cancer. **Trends in molecular medicine**, v. 17, n. 7, p. 380-388, 2011.

SABA, C. F. et al. Mammary gland tumors in male dogs. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 21, n. 5, p. 1056-1059, 2007.

SIDRANSKY, D. Emerging molecular markers of cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 3, p. 210, 2002.

SCHECHTER, A. L. et al. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. **Nature**, v. 312, n. 5994, p. 513, 1984.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature methods**, v. 9, n. 7, p. 671, 2012.

STRANDBERG, J. D.; GOODMAN, D. G. Animal model of human disease: canine mammary neoplasia. **The American journal of pathology**, v. 75, n. 1, p. 225, 1974.

SIMEONOV, R.; STOIKOV, D. Study on the correlation between the cytological and histological tests in the diagnostics of canine spontaneous mammary neoplasms. **Bulg J Vet Med**, v. 9, n. 3, p. 211-219, 2006.

SINGER, J. et al. Comparative oncology: ErbB-1 and ErbB-2 homologues in canine cancer are susceptible to cetuximab and trastuzumab targeting. **Molecular immunology**, v. 50, n. 4, p. 200-209, 2012.

SINGER, J. et al. Generation of a canine anti-EGFR (ErbB-1) antibody for passive immunotherapy in dog cancer patients. **Molecular cancer therapeutics**, v. 13, n. 7, p. 1777-1790, 2014.

SLAMON, D. J. et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. **science**, v. 235, n. 4785, p. 177-182, 1987.

SLAMON, De. J. et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. **Science**, v. 244, n. 4905, p. 707-712, 1989.

SLEECKX, N. et al. Canine mammary tumours, an overview. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 6, p. 1112-1131, 2011.

SORENMO, K. U.; SHOFER, F. S.; GOLDSCHMIDT, M. H. Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 14, n. 3, p. 266-270, 2000.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 33, n. 3, p. 573-596, 2003.

SORENMO, K. U. et al. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. **Veterinary pathology**, v. 48, n. 1, p. 85-97, 2011.

SWAIN, S. M. et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 8, p. 724-734, 2015.

TRAPP, S. M. et al. Causas de óbito e razões para eutanásia em uma população hospitalar de cães e gatos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n. 5, p. 395-402, 2010.

TOKUNAGA, E. et al. Akt is frequently activated in HER2/neu-positive breast cancers and associated with poor prognosis among hormone-treated patients. **International journal of cancer**, v. 118, n. 2, p. 284-289, 2006.

WAKS, Adrienne G.; WINER, Eric P. Breast cancer treatment: a review. **Jama**, v. 321, n. 3, p. 288-300, 2019.

WOLFF, A. C. et al. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline focused update. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 142, n. 11, p. 1364-1382, 2018.

VAN'T VEER, L. J. et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature**, v. 415, n. 6871, p. 530-536, 2002.

YANG, Q. et al. Correlation between nuclear grade and biological prognostic variables in invasive breast cancer. **Breast Cancer**, v. 8, n. 2, p. 105-110, 2001.

YIN, W. et al. Trastuzumab in the adjuvant treatment of HER2-positive early breast cancer patients: a meta-analysis of published randomized controlled trials. **PloS one**, v. 6, n. 6, p. e21030, 2011.

ASIF, H. M. et al. HER-2 positive breast cancer-a mini-review. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, n. 4, p. 1609-1615, 2016.

YOSHIMOTO, S. et al. Overexpression of human epidermal growth factor receptor 2 in canine primary lung cancer. **Journal of Veterinary Medical Science**, p. 20-0026, 2020.

YU, R. M. C.; CHEAH, Y. K. The roles of miRNAs in human breast cancer and canine mammary tumor. **Applied Cancer Research**, v. 37, n. 1, p. 37, 2017.

## HIPÓTESE

Considerando-se que:

As neoplasias mamárias de cadela podem apresentar alteração no número de cópias de *HER-2* e expressão aumentada, o uso de inibidores tirosina quinase podem ser uma opção para o tratamento de cadelas com carcinoma mamário inoperáveis, animais com metástase e como complementação à quimioterapia convencional;

A evolução da terapia de precisão, individualizada, na medicina humana, e os benefícios de menor gastos e efeitos colaterais com os quimioterápicos;

Este estudo visa avaliar o potencial terapêutico do lapatinibe em células tumorais *in vitro* de carcinoma mamário primário e metastático.

Também, o desenvolvimento de capacidade técnica para futuros testes de terapia individualizada para pacientes oncológicos veterinários.

## OBJETIVOS

### Gerais

Avaliar os efeitos do lapatinibe sobre as células de carcinoma mamário primário e metastático de cadelas cultivadas *in vitro*.

### Específicos

- Avaliar expressão do gene *HER2* nas amostras de neoplasia em parafina e em suas respectivas culturas *in vitro*.
- Avaliar os efeitos do lapatinibe sobre a viabilidade das células de carcinoma mamário primário e metastático de cadelas cultivadas *in vitro*.
- Avaliar o efeito do lapatinibe na migração celular das células de carcinoma mamário primário e metastático de cadelas cultivadas *in vitro*.
- Relacionar a expressão de *HER2* com a sensibilidade das culturas celulares ao lapatinibe.

## **CAPÍTULO 2**

Artigo redigido para ser enviado para a Revista Ciência Rural, <http://coral.ufsm.br/ccr/cienciarural/>, ISSN 1678-4596, fator de impacto 0,610; ranqueada como B1 pelo QUALIS-CAPES do quadriênio de 2013-2016.

## ARTIGO I

### **Lapatinib effects on HER2+ and HER2- canine mammary carcinoma cells cultured “*in vitro*”**

A. F. Leis-Filho<sup>1</sup>, P. F. Lainetti<sup>2</sup>, P. E. Kobayashi<sup>1</sup>, C. E. Fonseca-Alves<sup>2,3</sup>, R. Laufer-Amorim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Veterinary Clinic, Sao Paulo State University – UNESP, Botucatu, Brazil

<sup>2</sup>Department of Veterinary Surgery and Anesthesiology, São Paulo State University – UNESP, Botucatu, Brazil

<sup>3</sup>Institute of Health Sciences, Paulista University, Bauru, Brazil

#### **Correspondence**

Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Rua Prof. Doutor Walter Mauricio Correa, s/n, Bairro: Unesp Campus de Botucatu, CEP 18618-681, Botucatu, SP.

Email: renee.laufer-amorim@unesp.br

Both Dr Fonseca-Alves and DR Laufer-Amorim had the same role in the supervision of Dr Leis, as well as in the development of the research project

#### **RESUMO**

O HER2 é um marcador prognóstico e preditivo amplamente utilizado em câncer de mama de mulheres, porém, este marcador ainda é pouco utilizado na medicina veterinária. O lapatinibe é um inibidor tirosina-quinase que age bloqueando a fosforilação dos receptores HER2+. O seu uso está relacionado

com melhores resultados no tratamento em mulheres com tumores HER2+. Esse estudo, teve como objetivo verificar os efeitos do lapatinibe em culturas celulares de cães, sendo que quatro eram provenientes de carcinoma mamário primário e duas provenientes de carcinoma mamário metastático. As culturas foram tratadas com lapatinibe nas concentrações de 0.1, 0.5, 1 e 3 $\mu$ M, por 24h, e tiveram a sua concentração inibitória de 50% das células (IC<sub>50</sub>) determinado. Além disso, verificamos a expressão de *HER2* por RT-qPCR tanto das culturas celulares quanto nos blocos de parafina que continham as amostras utilizadas para a cultura. A IC<sub>50</sub> das células variou de 0.01 até 0.58 $\mu$ M. Houve uma correlação negativa entre a expressão de *HER2* nos blocos de parafina e nas culturas celulares ( $p=0.002$ ). Além disso, a variação na expressão de *HER2* entre as amostras em cultura foi menor do que a expressão das amostras em parafina. Ademais, o lapatinibe foi capaz de inibir a viabilidade de todas as culturas celulares tratadas, sendo que quanto maior a expressão de HER2 de uma cultura, mais sensível ela foi ao tratamento. Esta relação pode ser um indício de que a expressão de *HER2* pode ser um fator preditivo de terapias que utilizem o lapatinibe em cães. Além disso, a capacidade do lapatinibe em inibir a viabilidade de todas as culturas celulares utilizadas abre uma nova perspectiva para o tratamento de animais com neoplasias mamárias tanto primárias quanto metastáticas.

**Palavras-chave:** cão, câncer, oncologia comparada, alvos moleculares

## 1. INTRODUÇÃO

Com o avanço das técnicas diagnósticas e terapêuticas utilizadas na medicina veterinária, cada vez mais a expectativa de vida dos animais de companhia aumenta. Com isso, diferentes doenças têm tido mais destaque na rotina clínica, principalmente as associadas aos animais idosos (GRÜNTZIG et al., 2016). Dentre estas enfermidades, as neoplasias apresentam grande relevância, sendo mais frequentes as de pele, mama e testículo (BENTUBO et al., 2007; TRAPP et al., 2010).

Nas fêmeas caninas, as neoplasias mamárias representam metade dos diagnósticos de neoplasias nos países que rotineiramente não castram os animais, sendo que 50% delas são malignas (SLEECKX et al., 2011; PEÑA et

al., 2014). A sobrevida média de animais diagnosticados com carcinoma mamário invasivo, que são submetidos a mastectomia é pouco maior do que um ano e meio, sendo que 41,5% dos animais morre em até 1 ano após o diagnóstico (NGUYEN et al., 2018).

Tendo em vista a alta prevalência e a morbidade desta afecção, a identificação de marcadores diagnósticos, prognósticos e terapêuticos é de grande importância para que se possa realizar um diagnóstico precoce e preciso e instituir o tratamento adequado para cada caso (SLEECKX et al., 2011; PEÑA et al., 2014).

As neoplasias mamárias apresentam diversas semelhanças entre mulheres e cadelas, como sua alta incidência, surgimento espontâneo, fatores de risco ambientais em comum, expressão de receptores hormonais e marcadores de crescimento neoplásico. Portanto, pesquisas relacionadas a uma espécie podem apresentar pontos a ser estudados na outra (YU; CHEAH, 2017; SAHABI et al., 2017).

Os marcadores mais utilizados na medicina humana são os receptores de estrógeno (ER), progesterona (PR) e o fator de crescimento epidérmico 2 (HER-2), sendo que em humanos a superexpressão de HER-2 está relacionado a um menor tempo de livre de doença, menor sobrevida, diminuição da expressão de ER e PR, maior proliferação e migração celular, invasividade tumoral, frequência de metástases, angiogênese e diminuição da apoptose (ROSS et al., 2009).

Em cães ainda não existe um consenso quanto a relevância do HER-2 nas neoplasias de mama, entretanto, há evidências que indicam que a superexpressão desse receptor está ligado a características semelhantes às observadas em mulheres. O aumento da expressão de HER-2 em cães já foi relacionado com pleomorfismo celular e maior número de figuras de mitose, sendo que a mesma relação é observada em mulheres (DUTRA et al., 2004; YANG et al., 2001).

O HER-2 é um receptor do tipo tirosina-quinase, membro da família dos receptores de fator de crescimento epidérmico (EGFR), composta pelos EGFR ou HER-1, HER-2, HER-3 e HER-4 (ANDERSON; AHMAD, 2002). Os receptores desta família estão localizados na membrana celular e ao se ligarem a um receptor externo, com exceção do HER-2 que não apresenta esse sítio de ligação, formam dímeros com outros membros da família para que o domínio

fosfato interno seja fosforilado, desencadeando uma resposta intracelular (ROSKOSKI, 2004). Além disso, existem evidências de que o HER-2 seja o receptor que com maior frequência forma dímeros com os outros membros de sua família (ARKHIPOV et al., 2013). A ativação desses receptores está ligada com o aumento da sobrevivência, proliferação e progressão do ciclo celular (HOLBRO et al., 2003).

O lapatinibe é um inibidor da enzima tirosina-quinase, considerado uma alternativa terapêutica frente às neoplasias HER2+, atuando como um bloqueador reversível da fosforilação dos receptores HER2+. O uso do lapatinibe está relacionado com a progressão mais lenta da doença e menor taxa de metástase em linfonodos axilares em mulheres. Ademais, por ser uma molécula pequena, o lapatinibe consegue penetrar na barreira hematoencefálica, se apresentando como uma alternativa em casos de metástase cerebral (ARTEAGA et al., 2012; PATEL, 2019).

Não há estudos que avaliem o efeito do lapatinibe em tumores de mama de cadelas, uma vez que a terapia padrão é a mastectomia radical, não existindo protocolos quimioterápicos de eficácia para o tratamento de animais com doença metastática (CASSALI et al., 2011). Esse estudo teve o objetivo de avaliar o efeito antitumoral do lapatinibe nas células de carcinoma mamário primário e metastático de cadelas cultivadas *in vitro*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Reagentes

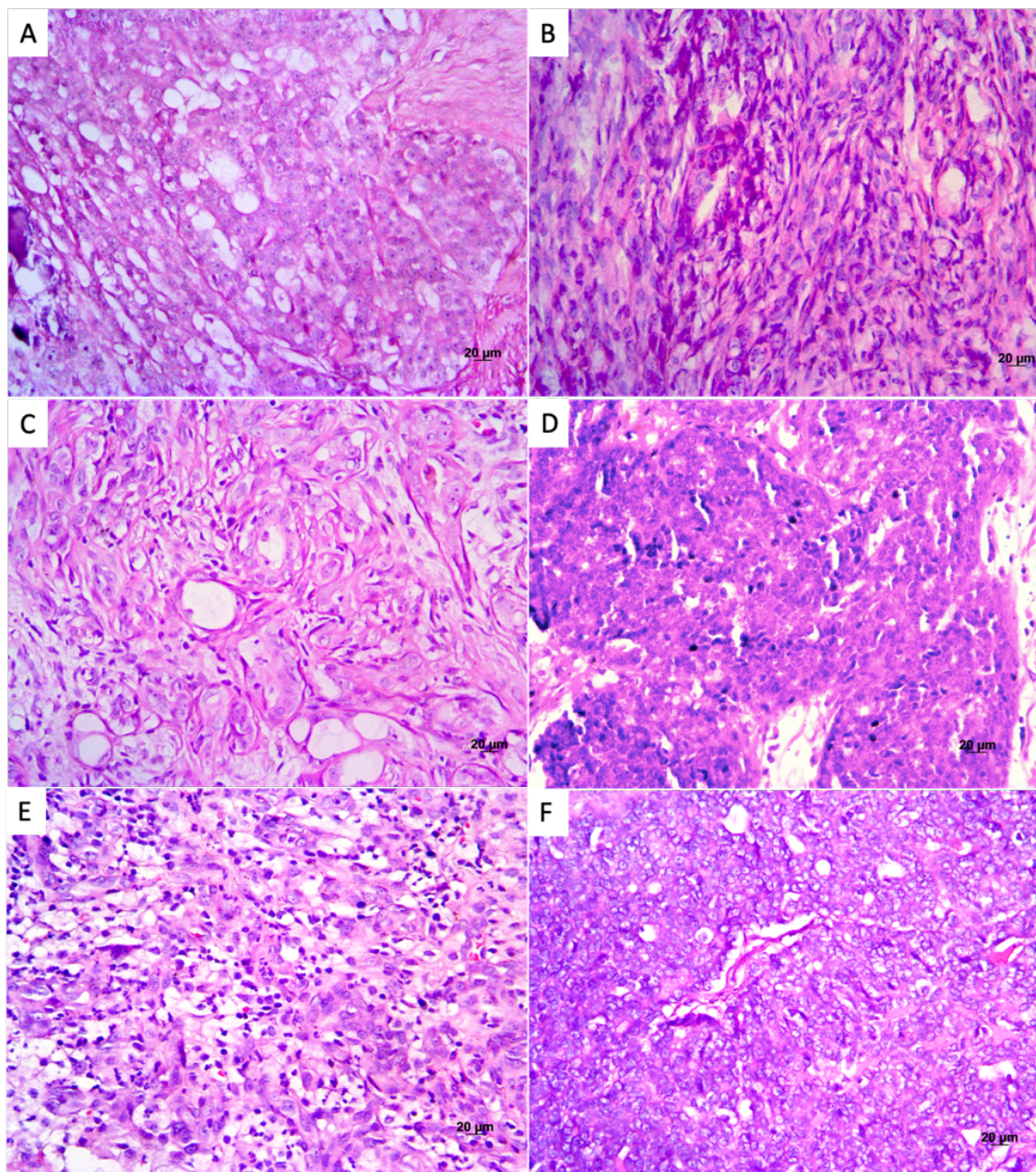
Todos os reagentes utilizados eram de alta pureza e adquiridos das empresas GE Healthcare (Uppsala, Suécia), Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil), Merck SA (São Paulo, Brasil), caso contrário, foram citados. Além disso, foi utilizado meio para cultivo celular *Mammary Epithelial Cell Growth Medium* (MEGM™, Lonza Inc., Allendale, NJ, USA), meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Lonza Inc., Allendale, NJ, USA), soro fetal bovino (SFB, LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e solução antibiótica/antimicótica (TermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA).

## 2.2 Critérios de inclusão

Foram incluídas na presente pesquisa amostras que satisfizeram todos os seguintes critérios: culturas celulares de tumores primários que tivessem material fixado em formalina e incluído em parafina e classificados de acordo com Goldschmidt et al. (2011), culturas celulares caracterizadas quanto ao fenótipo celular e tumorigenicidade *in vitro*, culturas celulares com alíquotas suficientes para todos os experimentos em triplicata e livres de contaminação bacteriana e/ou fúngica.

Seis tumores primários de mama e três metástases (uma metástase em úmero e duas em linfonodos) de carcinoma mamário de cadela foram coletados (informações sobre os animais na tabela suplementar 1), logo após a cirurgia, para diagnóstico histopatológico (fixados em formol a 10% e incluídos em parafina) e cultura celular primária. O diagnóstico histopatológico foi estabelecido de acordo com Goldschmidt et al. (2011) (Figura 1), e realizamos as técnicas de imuno-histoquímica para avaliação da expressão de HER2 nas mesmas amostras utilizadas para o diagnóstico.

Após as expansões iniciais, três culturas (duas primárias e uma metástase) foram excluídas do estudo devido à falta de expansão *in vitro* em passagens subsequentes. No total, seis amostras foram avaliadas, sendo quatro culturas de células de carcinoma mamário primário (CM1, CM5, CM9 e CM60) e duas metástases de carcinoma mamário (MM1 e MM4).



**Figura 1.** Coloração Hematoxilina-Eosina das amostras em blocos de parafina no aumento de 20X. A: Carcinoma sólido (CM1). B: Carcinoma sólido (CM5). C: Carcinoma sólido (CM9). D: Carcinoma adenoescamoso (CM60). E: Metástase em úmero de carcinoma sólido (MM1). F: Metástase em linfonodo inguinal de carcinoma adenoescamoso (MM4).

### 2.3 Grupos experimentais

Quatro amostras de carcinoma mamário primário e duas de metástase foram selecionadas e divididas em dois grupos de três amostras cada, um grupo contendo as amostras HER2+ (CM1, CM9 e CM60) e outro as HER2- (MM1,

MM4 e CM5). A determinação do número de amostras no estudo se baseou no descrito por Lazic et al. (2018). Os dois grupos (células HER2+ e HER2-) foram tratados com lapatinibe. Nas amostras celulares a ação do lapatinibe foi avaliada entre a 16<sup>a</sup> e 35<sup>a</sup> passagem.

## 2.4 Imunorreatividade de HER2

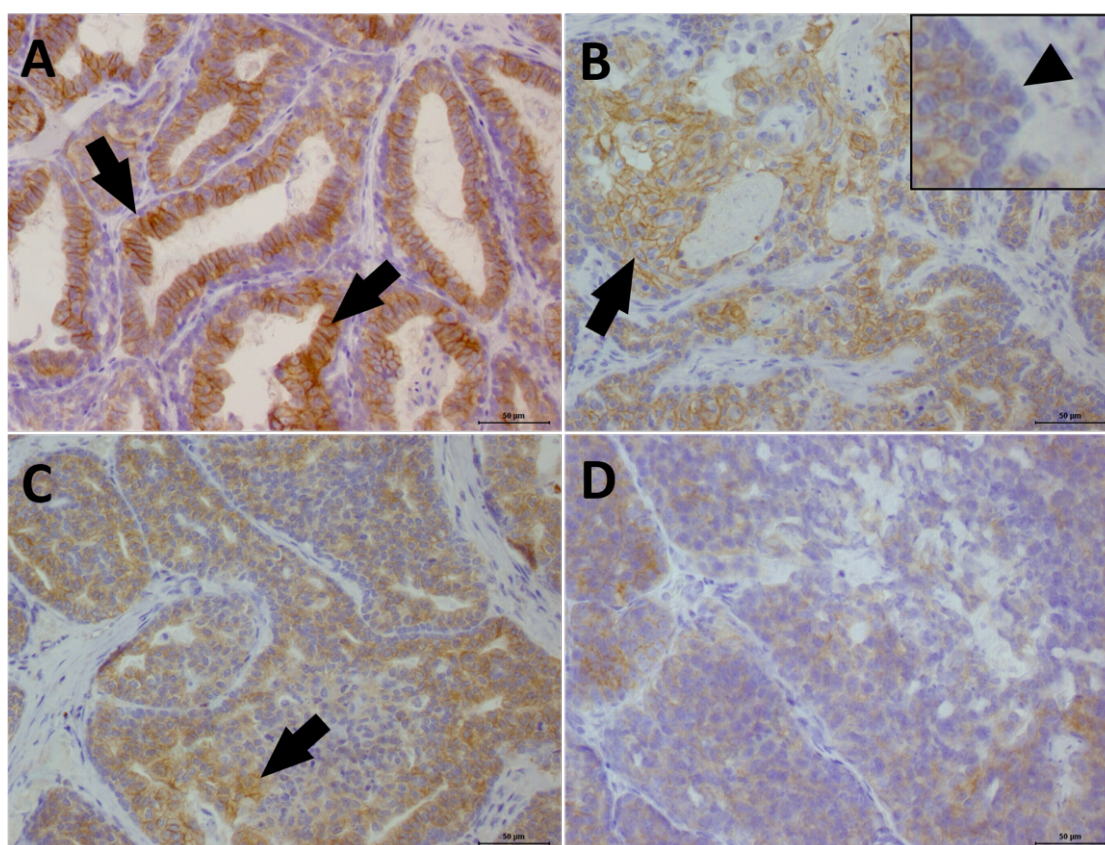
As amostras incluídas em parafina foram cortadas em micrótomo (3 µm), transferidas para lâminas com carga positiva (StarFrost, Braunschweig, Alemanha) e desparafinizadas. As lâminas foram submetidas à recuperação antigênica com tampão citrato (pH 6,0) em panela de pressão (Pascal, Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com 8% de peróxido de hidrogênio em metanol, durante 20 min e o bloqueio das ligações não específicas foi realizado com 8% leite desnatado durante 60 min, ambos em temperatura ambiente. A detecção do anticorpo foi realizada utilizando-se sistema de polímero (EnVision Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). O 3,3'-diaminobenzidina (EnVision FLEX, High pH, Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) foi utilizado como cromógeno e a contra-coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris. Como controle negativo da reação, omitiu-se o anticorpo primário testado durante o procedimento, o qual foi substituído por solução tampão TRIS. O controle positivo utilizado foi fornecido pelo fabricante do kit. Para considerar as amostras caninas como HER-2 positivas, os critérios descritos no kit comercial aprovado pelo *US Food and Drug Administration* (FDA) Herceptest™ (Dako, Carpinteria, CA, EUA) foram seguidos.

Das seis amostras submetidas à imuno-histoquímica, três foram classificadas como negativas para HER2 (duas com escore 1+ e uma com escore -) e três foram consideradas HER2 positivas (uma com escore 2+ e duas com escore 3+) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Classificação das amostras utilizadas no estudo quanto a expressão do HER2. As amostras receberam escores de acordo com o recomendado pelo kit utilizado na reação.

Tipo celular	MM1	MM4	CM1	CM5	CM9	CM60
Expressão de HER2	-	1+	3+	1+	3+	2+

Assim como descrito no kit Herceptest™, nas amostras positivas foi observada uma marcação completa em toda a membrana (Figura 2).



**Figura 2.** Análise imuno-histoquímica do HER-2 em amostras de neoplasias mamárias primárias de cadelas. As figuras A e B representam duas amostras positivas e as figuras C e D representam duas amostras negativas. A: marcação em membrana citoplasmática (setas) em mais de 10% das células epiteliais neoplásicas. B: marcação em membrana citoplasmática (setas) em mais de 10% das células neoplásicas. É possível ainda observar uma população de células negativas para a proteína HER-2 (cabeça de seta). C: marcação citoplasmática da proteína HER-2 em um carcinoma mamário. A presente marcação foi

considerada negativa, de acordo com a recomendação do FDA, pela ausência de marcação em membrana citoplasmática em mais de 10% das células neoplásicas. D: amostras de carcinoma mamário negativa para a proteína HER2 apresentando marcação citoplasmática inespecífica.

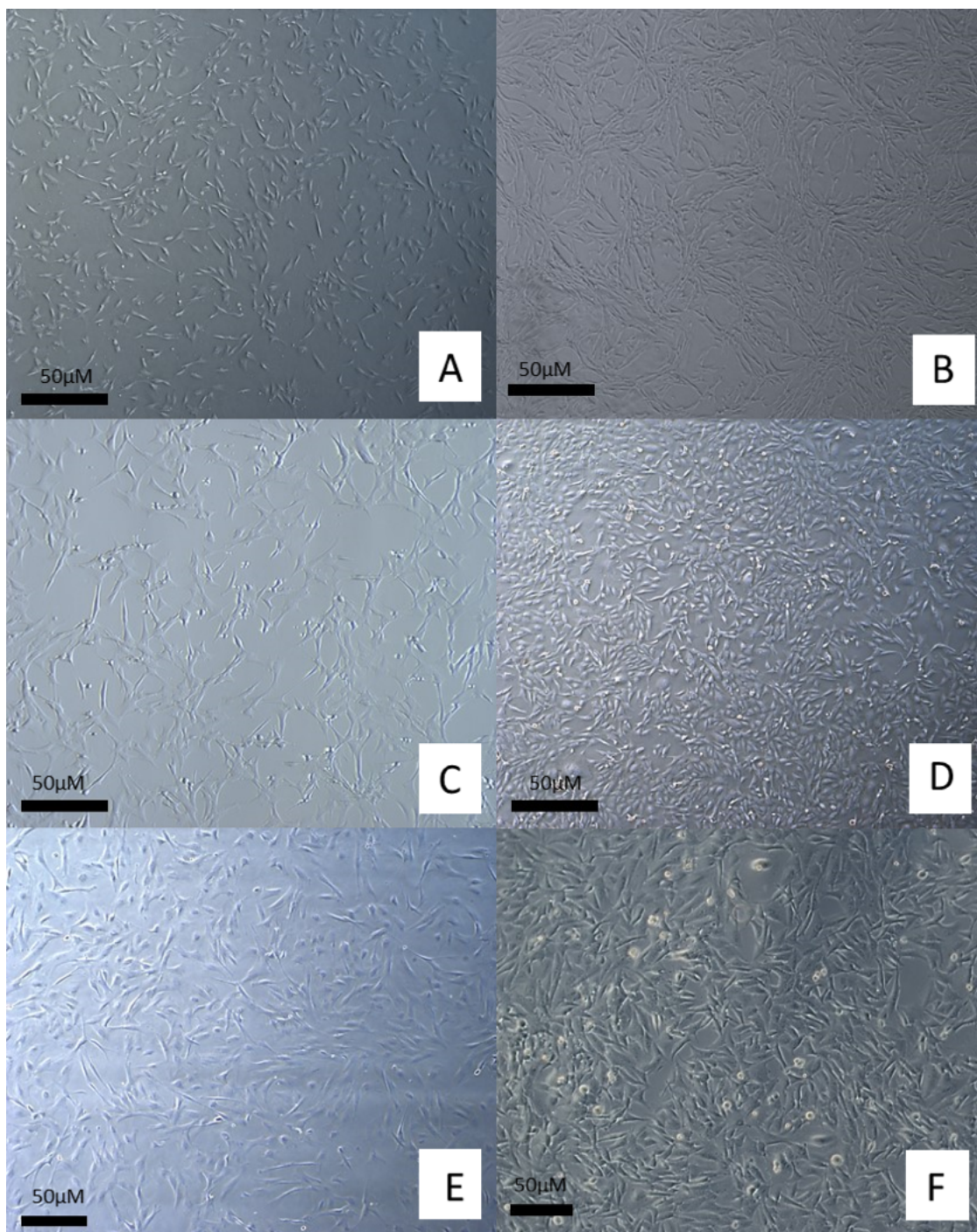
## 2.5 Cultivo celular

O cultivo celular primário e a caracterização celular foram realizados em estudo prévio do grupo por LAINETTI et al. (2019). De maneira resumida, fragmentos tumorais foram dissociados com enzima colagenase do tipo IV (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), após esse processo, a viabilidade das células foi determinada utilizando a coloração de azul de Tripán (Trypan blue solution, cód. T8154, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Após a verificação da viabilidade, as células foram colocadas em meio *Mammary Epithelial Cell Growth Medium* (MEGM™, Lonza Inc., Allendale, NJ, USA) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) e 1% de solução antibiótica/antimicótica (TermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA), o plaqueamento foi realizado em garrafas para cultivo com filtro de 25 cm<sup>2</sup> de volume total (SPL Life Sciences, Daejeon, Coréia do Sul). As garrafas foram mantidas em estufa úmida a 5% de CO<sub>2</sub> e 37° C, em uma concentração de 10<sup>4</sup> células/mL.

Após a expansão inicial das células, permanecendo na garrafa por no mínimo 72 h, parte das amostras foi criopreservada em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Lonza Inc., Allendale, NJ, USA), acrescido de 11,8% DMSO (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e 47% SFB.

Para a realização do estudo, utilizamos os dois grupos anteriormente descritos (três culturas HER2+ e três HER2-, que incluíam 4 carcinomas de mama e duas metástases). As amostras cultivadas foram expandidas até pelo menos a décima sexta passagem. Para isso elas foram colocadas em garrafas para cultivo com filtro de volume total de 25 cm<sup>2</sup> (SPL Life Sciences, Daejeon, Coréia do Sul) e mantidas em meio MEGM™, acrescido de 10 % de SFB e de 1% de solução antibiótica/antimicótica em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C (Figura 3).



**Figura 3.** Cultivo *in vitro* das células de carcinoma mamário no aumento de 50x. As imagens correspondem as seguintes células: CM1 (A), MM1 (B), CM5 (C), CM9 (D), CM60 (E) e MM4 (F).

A confluência foi checada e o meio de cultura trocado a cada 48 horas. No momento em que as células atingiram confluência maior que 70%, foi realizado o procedimento de passagem com uso de Tripsina-EDTA 0.025% (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) e incubadas em atmosfera úmida

contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 5 minutos, para que as células se soltassem do fundo da garrafa. Após esse período, a tripsina foi inativada com MEGM™ acrescido de SFB e solução antibiótica/antimicótica e as células foram divididas em duas novas garrafas para continuidade do processo de expansão.

## 2.6 Tratamento com lapatinibe e avaliação da atividade metabólica celular

Para avaliar a capacidade e efeito antitumoral (concentração inibitória de 50% das células, IC<sub>50</sub>) *in vitro* do lapatinibe foi realizado o ensaio MTT das culturas de células. O fármaco foi diluído em DMSO na concentração de 2 mg/mL e foi realizado controle da maior diluição com DMSO (na mesma concentração da maior diluição do lapatinibe).

Foram testadas as concentrações do lapatinibe 0.1, 0.5, 1, 3 µg/mL (NAHTA et al., 2007) por 24 horas para determinar a IC 50. As células tumorais foram depositadas em placas de 96 poços na concentração de 10.000 células/poço e cultivadas durante 24 horas, a 37° C, em meio DMEN contendo 5% de SFB. Posteriormente, o lapatinibe foi adicionado a um novo meio sem SFB e o cultivo mantido por 24 horas adicionais em estufa em atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub>.

Após as 24 horas de cultivo, 10 µL da solução trabalho do MTT (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) na concentração de 0,5 mg/mL diluído em DPBS foram adicionados a cada poço e a placa incubada a 37° C durante 4 horas. Após incubação com o MTT, o azul de formazan resultante da clivagem do MTT foi solubilizado com DMSO, após 10 minutos a absorvância foi determinada, em leitor de microplaca (BiochromÒ Asys Expert Plus Microplate Reader, Biochrom Ltd, Harvard Bioscience, Holliston, MA, USA), na absorvância de 550 nm. Baseado nos resultados do teste, a IC<sub>50</sub> da proliferação celular (NEGRI et al., 2009) foi determinada usando a fórmula: % atividade antioxidante = 100 - (absorbância da amostra tratada – absorvância do *blank*) x 100/absorvância das células controle; considerando que o *blank* foi DPBS e as células do grupo controle não continham lapatinibe.

## 2.7 Extração de RNA e RT-qPCR dos blocos de parafina e das amostras de cultura celular

A expressão gênica de *HER-2*, foi feita nos tumores primários fixados em formol e incluídos em parafina e nas culturas de células, correspondentes.

Para extração de RNAm dos blocos de parafina, as amostras foram cortadas em micrótomo e três cortes de 10 micrometros foram colocados em tubos de 1,5 mL. O protocolo de extração do kit RecoverAll™ total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foi seguido. Ao final do protocolo as amostras foram tratadas com DNase para purificação do RNA e sua concentração e pureza mensuradas na A280 A260/A280 em espectrofotômetro (NanoDrop™, ND-8000, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

A extração de RNAm das seis células em cultura foi realizada em triplicata, para isso as células criopreservadas foram descongeladas em banho úmido a 37° C, centrifugadas (450g, 5 min) e ressuspensas em DMEM acrescido de 1% de solução antibiótica/antimicótica e 10% de SFB. As células foram transferidas para placas de 6 poços e cultivadas. Então, foram lavadas 3 vezes com DPBS em banho de gelo.

A extração do RNAm seguiu o protocolo recomendado pelo fabricante (mini Kit RNeasy, Qiagen, Hilden, Germany). A concentração e a pureza do RNAm foram avaliadas na A280 A260/A280 em espectrofotômetro (NanoDrop™, ND-8000, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico, o RNA total extraído foi tratado com 1U de *Dnase I Amplification Grade* (Life Technologies) em 10X *Dnase I Reaction Buffer* e 25mM de EDTA pH 8.0.

Tanto para o mRNA extraído dos blocos de parafina quanto para o mRNA extraído das células em cultura, a transcrição reversa do RNA para cDNA foi realizada com 1 µg de RNA total e com a enzima Super-script III™ Reverse Transcriptase (Invitrogen). Para esse protocolo foi utilizado 1µL de OligodT (500 µg/mL), 1 µL de *random primers* (100 µg/mL), 1µL de dNTP e RNase free water. A mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos e a seguir, foram adicionados 4 µL de tampão de transcrição 5x *First-Strand Buffer* (250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>), 1 µL de DTT 0,1 M e, por último, 1 µL da enzima Super-script III (200U/ µL), sendo o volume final do mix 19 µL, a incubação foi de 25°C durante 5 minutos, 50°C por 1 hora e meia, seguido de 70°C por 15

minutos, as reações foram realizadas no termociclador PTC-100 (Peltier - EffectCycling - MJ Research). Ao final da transcrição, o cDNA foi mantido a 20°C negativos.

As amplificações da RT-qPCR foram avaliadas em um termociclador automático (QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System, 4471087, Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) e processadas pelo sistema de detecção após um número variável de ciclos em fase exponencial.

Os valores obtidos para expressão de todas as amostras foram normalizados pela razão obtida entre o gene de interesse (*HER2*) e o gene de referência. Os genes de referência utilizados foram *HPRT*, *RPS5* e *RPS19* (selecionados em estudos prévios do grupo) e estão descritos na tabela 2.

**Tabela 2.** Sequência de oligonucleotídeos dos genes utilizados para a RT-qPCR.

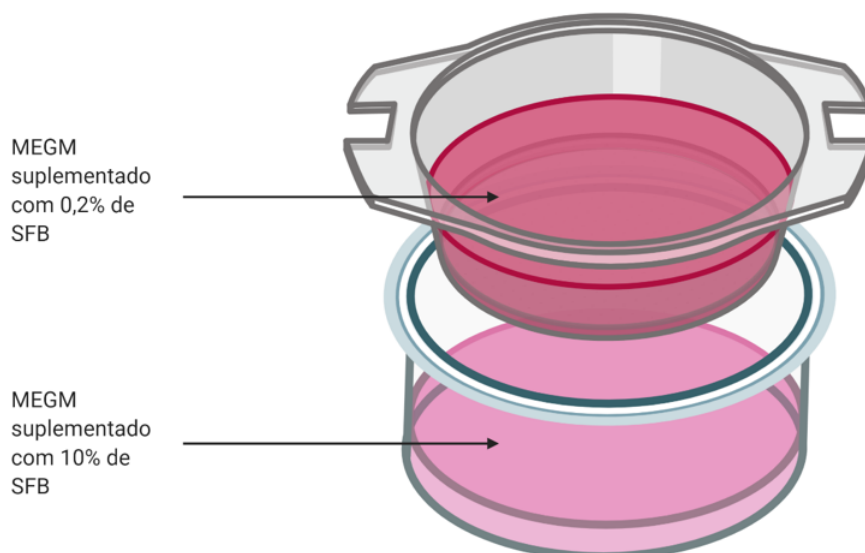
Access gene symbol*	Oligonucleotides sequence (5'>3')
<i>HPRT</i>	<i>Forward primer (5'3')</i> AGCTTGCTGGTGAAAAGGAC
	<i>Reverse primer (3'5')</i> TTATAGTCAAGGGCATATCC
<i>RPS19</i>	<i>Forward primer (5'3')</i> CCTTCCTCAAAAAGTCTGGG
	<i>Reverse primer (3'5')</i> GAACGAGGGATGCTACTCTTG
<i>RPS5</i>	<i>Forward primer (5'3')</i> TCACTGGTGAGAACCCCCT
	<i>Reverse primer (3'5')</i> TCACTGGTGAGAACCCCCT
<i>HER2</i>	<i>Forward primer (5'3')</i> GCTCTGGAGGGAGTCACAGGTTA
	<i>Reverse primer (3'5')</i> ACTGAGGTTAGGCAGGCTGTCT

\*GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))

A expressão dos transcritos foi analisada pela quantificação relativa (QR) do RNA nas amostras através da fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). O QR de cada amostra de parafina foi determinado pela comparação com amostras de tecido normal em parafina. Nas amostras de cultura o QR foi determinado de duas maneiras diferentes para duas análises diferentes. Para a análise de correlação da expressão entre as amostras de cultura e as amostras de parafina o QR de cada amostra de cultura foi determinado em comparação com a sua respectiva amostra em parafina. Para avaliar a correlação entre a expressão de *HER2* das amostras em cultura celular e a sensibilidade delas ao lapatinibe os QRs foram calculados com base na amostra de tecido normal em parafina, a mesma utilizada para calcular os QRs das amostras em parafina.

## 2.8 Ensaio de migração celular

Para a avaliação dos efeitos do tratamento com lapatinibe quanto a capacidade de migração das células, o ensaio *transwell* foi utilizado. Todas as culturas celulares avaliadas nesse ensaio passaram por um período de “restrição de fator de crescimento” de 24h em meio contendo 0,2% de SFB, após esse período foram tratadas com tripsina e incubadas em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 5 minutos, para que as células se soltassem do fundo da garrafa. Depois, a tripsina foi inativada com MEGM™ acrescido de 5% de SFB. As amostras foram centrifugadas (450 g, 5 min) para remover o meio com alta concentração de soro fetal e então ressuspensas em MEGM™ acrescido de 0,2% de SFB. 200µl da solução contendo cada cultura celular foram colocados em *inserts* (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria) com membrana porosa de 8µM na concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL sendo que cada *insert* foi colocado em um poço de uma placa de 24 poços contendo MEGM™ acrescido de 10% de SFB (Figura 4).



**Figura 4.** Montagem do ensaio *transwell*. *Insert* com MEGM™ suplementado com SFB em menor quantidade do que o poço. Imagem gerada pelo BioRender (<https://biorender.com>)

Cada cultura celular foi colocada em 6 *inserts* diferentes sendo 3 utilizados para controle e 3 para o tratamento. Nas amostras tratadas o lapatinibe foi adicionado no *insert* na IC<sub>50</sub> de cada cultura. Após 24 horas os *inserts* foram removidos da placa e colocados em uma nova placa de 24 poços contendo tripsina pré aquecida, as amostras foram incubadas na tripsina por 10 minutos em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após esse período a tripsina contendo as células que se soltaram do fundo dos *inserts* foi colocada em uma câmara de Neubauer e as células foram contadas.

## 2.9 Análise estatística

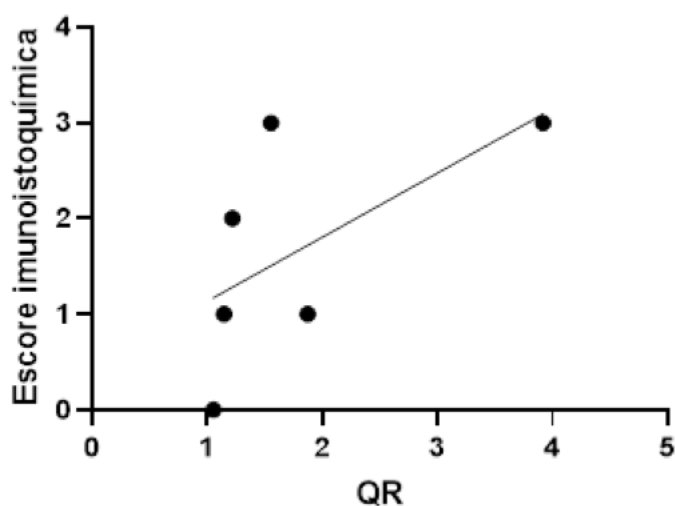
Os QRs obtidos na RT-qPCR foram avaliados quanto a sua correlação para comparar a expressão de HER2 nos blocos de parafina e nas amostras de cultura pela análise de correlação de Spearman. Além disso, o teste Mann-Whitney foi utilizado para avaliar a diferença na expressão de HER2 nos blocos de parafina e nas amostras em cultura celular. Os dados obtidos no ensaio de migração foram analisados estatisticamente pelo teste Mann-Whitney. Os resultados do MTT foram analisados no programa GraphPad Prism. Os

resultados do MTT e da RT-qPCR foram avaliados quanto a sua correlação pelo teste de Spearman. Diferenças estatísticas foram consideradas quando  $P < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS

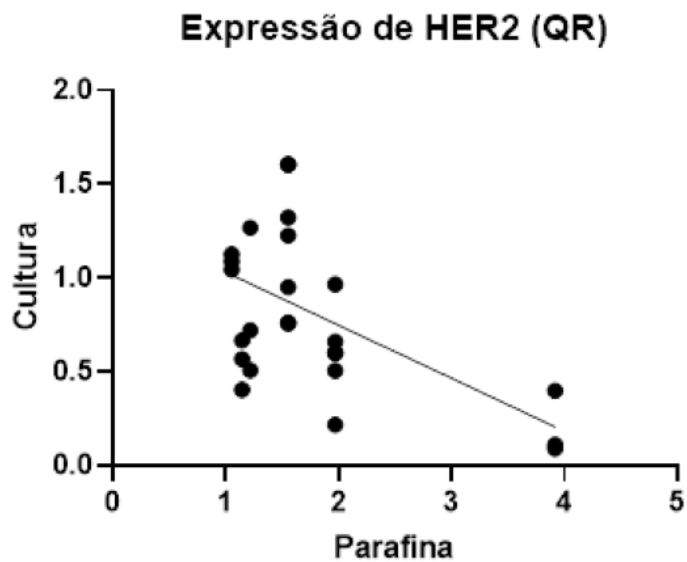
#### 3.1 RT-qPCR

Não houve correlação estatística quanto a expressão de HER2 nas amostras de parafina e o seu escore na imunohistoquímica, porém a curva de regressão linear mostra uma tendência de QRs maiores em amostras com escores maiores na imunohistoquímica, e vice-versa (Figura 5).



**Figura 5.** Correlação entre o escore de expressão de HER2 (imunohistoquímica) e o QR das amostras em parafina.

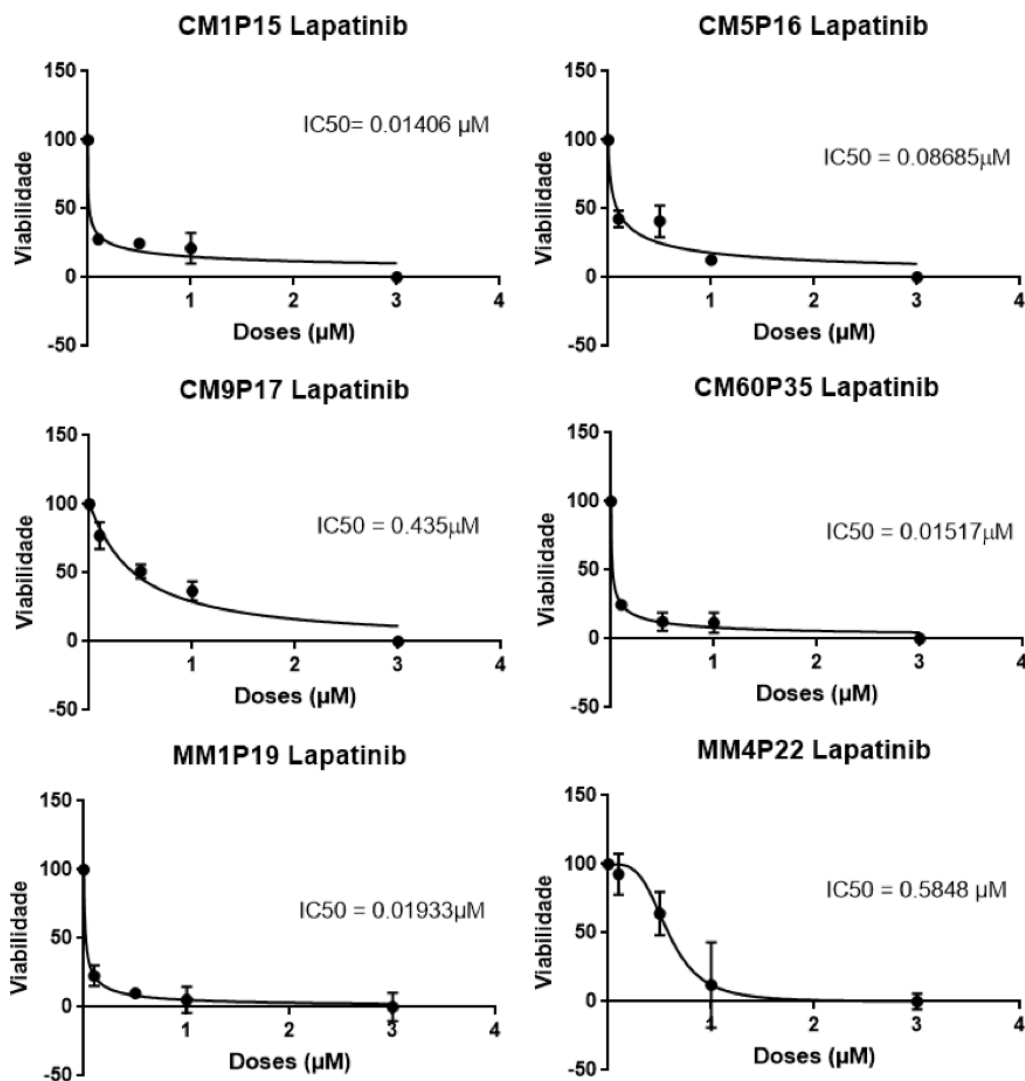
Houve uma correlação negativa ( $p=0,002$ ) entre as expressões de *HER2* das culturas celulares neoplásicas e a expressão de *HER2* das amostras correspondentes dos blocos de parafina (Figura 6) Ou seja, quanto maior a expressão de *HER2* nos blocos de parafina mais a expressão desta amostra em cultura diminuiu.



**Figura 6.** Resultados da RT-qPCR quanto a correlação da expressão do gene *HER2* nas amostras de cultura celular versus amostras de parafina. Houve uma correlação negativa ( $p=0,002$ ).

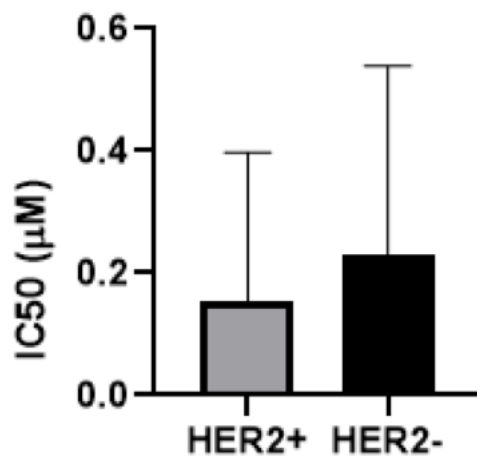
### 3.2 MTT

No ensaio de MTT realizado, todas as culturas primárias apresentaram diminuição da atividade metabólica celular em todas as concentrações de exposição ao fármaco testados. A  $IC_{50}$  das seis culturas celulares ficou entre  $0,58\mu\text{M}$  -  $0,01\mu\text{M}$  (Figura 7).



**Figura 7.** Porcentagem da viabilidade celular, no ensaio MTT nas culturas primárias de carcinoma de mama de cadela (CM1, CM5, CM9 CM60) e metástases (MM1 e MM4) e tratadas com Lapatinibe a 0.1, 0.5, 1 e 3  $\mu\text{M}$ , durante 24 h.

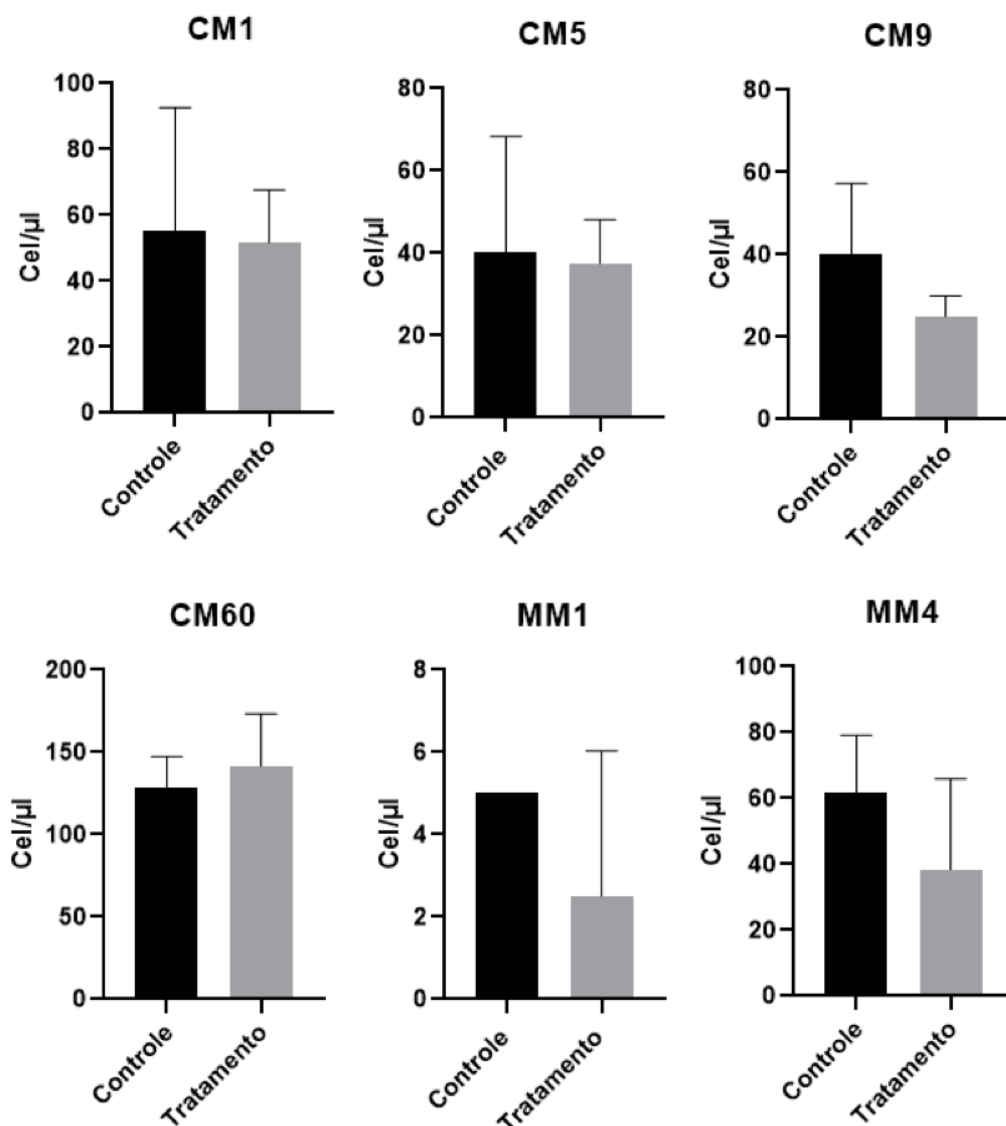
Não houve diferença estatística entre as IC<sub>50</sub> do grupo HER2+ e do grupo HER2 (Figura 8).



**Figura 8.** Comparação entre as IC<sub>50</sub> do grupo HER2+ e HER2- (P=0,4).

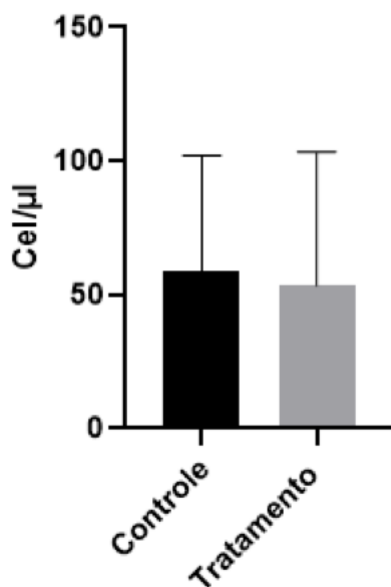
### 3.3 Ensaio de migração

Não houve diferença estatística entre o grupo tratado com lapatinibe e o grupo controle em nenhuma cultura celular no ensaio de migração (Figura 9).



**Figura 9.** Concentração (células/μl) de células nos poços de cada tipo celular após o protocolo do ensaio de migração.

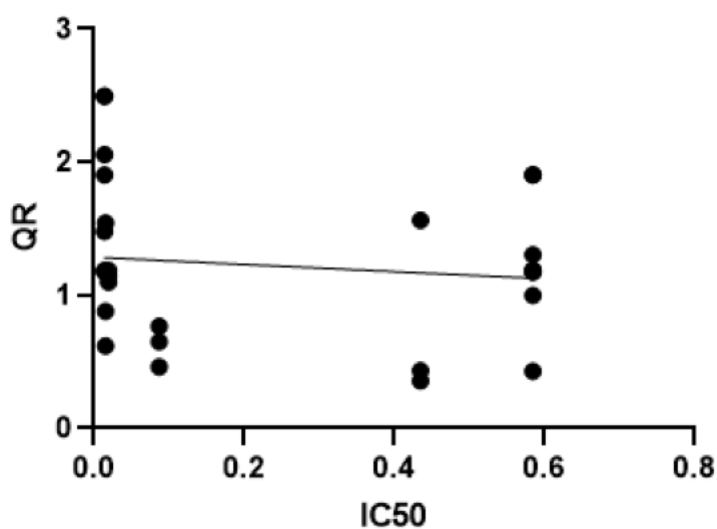
Também não houve diferença estatística entre o grupo tratado com lapatinibe e o grupo controle quando todas amostras foram comparadas juntas (Figura 10).



**Figura 10.** Concentração (células/μl) de células nos poços de todas amostras do grupo controle e tratamento após o protocolo do ensaio de migração.

### 3.4 Correlação entre a expressão de HER2 e o IC<sub>50</sub>

A análise de correlação de Spearman revelou uma correlação negativa ( $p=0.042$ ) entre o QR das amostras em cultura celular e o IC<sub>50</sub> (Figura 11), ou seja, quanto maior a expressão de HER2 das amostras menor a dose de lapatinibe necessária para atingir o IC<sub>50</sub> daquela cultura.



**Figura 11.** Correlação entre o QR e o IC<sub>50</sub> das culturas celulares.

#### 4. DISCUSSÃO

O lapatinibe se mostrou eficiente na inibição da proliferação de culturas celulares de carcinoma de mama de cadela HER2+ e HER2- *in vitro*, sendo que quanto maior a dose, mais acentuada a resposta exibida pelas células. Porém, assim como em células de neoplasia mamária de mulheres que superexpressam HER2, em nosso estudo o lapatinibe sozinho não foi capaz de inibir a migração das células, independentemente da sensibilidade das mesmas ao fármaco (KACZYŃSKA; HERMAN-ANTOSIEWICZ, 2017)

O inibidor tirosina quinase utilizado, mostrou-se eficaz como uma terapia anti-tumoral, mesmo em amostras com baixa imunorreatividade de HER2. Ademais, o lapatinibe se mostrou capaz de inibir a viabilidade celular tanto de células de carcinoma mamário primário quanto de metástases, apresentando-se como uma possível alternativa a ser estudada para o tratamento de animais com doença metastática, outro importante fator a ser levado em conta na utilização do lapatinibe no tratamento de metástases é a sua boa capacidade de penetração nos diferentes tecidos corporais por conta do tamanho pequeno de sua molécula (ARTEAGA et al., 2012).

Apesar do lapatinibe ter inibido a proliferação celular em todas as culturas celulares, mesmo em três delas, consideradas negativas para HER2, ressaltamos que cinco dos seis tumores apresentaram receptores HER2, mesmo que em baixa concentração. Sendo assim, o fármaco pode ter agido nos receptores HER2 presentes e no caso da MM1 em receptores EGFR (ARTEAGA et al., 2012; BROEKMAN et al., 2011).

No teste de correlação de Spearman entre os QRs das amostras de parafina e o seu escore na imunoistoquímica com o kit Herceptest™ (Figura 5), há uma tendência demonstrada na curva de regressão linear de QRs maiores em amostras com escores de expressão de HER2 maiores, apesar de não haver correlação estatística. Esta tendência é um indicativo de que a imunoistoquímica utilizando o kit Herceptest™ pode ser um método eficaz de quantificação de HER2 em cães, porém, um estudo com mais amostras ainda é necessário para confirmar esta possibilidade.

A correlação negativa entre o QR das amostras de parafina e o QR das amostras de cultura celular (Figura 6) pode ser explicada por três hipóteses. A primeira hipótese é de que quando as amostras são colocadas em cultura celular

não é possível selecionar qual clone será expandido, ou seja, apesar da alta expressão de HER2 por parte da população celular, por conta da heterogeneidade encontrada nas neoplasias, outras células daquela neoplasia podem ter uma menor expressão de HER2. Além disso, não há como garantir que as células que irão ser expandidas na cultura farão parte de um grupo específico, portanto, nem sempre as amostras de cultura celular terão uma expressão semelhante à da neoplasia *in vivo* (DEXTER et al., 1978; POLIAK et al., 2011; TURASHVILI; BROGI, 2017).

A segunda explicação para esta correlação negativa é de que ao longo da expansão das amostras em cultura a expressão gênica vai se alterando, portanto, a expressão de uma mesma cultura em duas passagens diferentes pode ser divergente, além disso, quanto maior a passagem de uma célula em cultura, de maneira geral, mais diferente ela será do material que originou aquela cultura (YANG et al., 2018; REEVES et al., 2018 ).

A terceira explicação para esse resultado é de que a expressão de HER2 nas amostras de cultura celular foi mais homogênea do que nas amostras de parafina, que provavelmente se deve a um ambiente mais homogêneo entre as amostras em cultura celular quando comparado com o microambiente tumoral de cada uma das neoplasias *in vivo*. Desse modo, diferenças em fatores extracelulares que podem modular a expressão gênica foram eliminadas. Além disso, na RT-qPCR das amostras em blocos de parafina, vasos sanguíneos e tecido conjuntivo acabam sendo processados juntamente com o tecido tumoral, aumentando a variabilidade dos resultados (REEVES et al., 2018; MA et al., 2009).

Apesar do HER2 estar envolvido na via do AKT-mTOR, que atua na regulação da migração das células neoplásicas, ele não é o único mecanismo de ativação dessa via. Portanto, o bloqueio de apenas um desses mecanismos, nesse caso, não foi o suficiente para promover uma diferença significativa na migração das células. Porém, quando associado com isotiocianatos, compostos presentes em abundância em vegetais crucíferos capazes de suprimir a ativação da via do AKT-mTOR, o lapatinibe foi capaz de inibir a migração em células de carcinoma mamário de mulheres (KACZYŃSKA; HERMAN-ANTOSIEWICZ, 2017; WU et al., 2009).

A correlação negativa entre a expressão de HER2 nas células e as IC<sub>50</sub>, ou seja, quanto maior a expressão de HER2 de uma cultura celular, menor a quantidade de lapatinibe necessária para alcançar a IC<sub>50</sub> daquela amostra, é um indicativo de que, assim como em humanos, o lapatinibe atua nos receptores HER2 das células de cães, reduzindo a viabilidade das células neoplásicas (KONECNY et al., 2006; NAHTA et al., 2007). Além disso, a correlação entre a expressão de HER2 das células em cultura e a sensibilidade ao lapatinibe é um forte indicativo de que o nível de expressão desse receptor pode ser um fator preditivo de terapias que utilizem o lapatinibe, o que abre uma porta para estudos *in vivo* com cães.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O lapatinibe foi capaz de reduzir a viabilidade das células de carcinoma mamário canino primário e metastático, cultivadas *in vitro*, sendo que sua eficácia está diretamente ligada com a expressão de HER2, o que abre uma perspectiva para o tratamento de animais com neoplasias mamárias tanto primárias quanto metastáticas, mas especialmente as que superexpressam HER2.

## FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e FAPESP (processo: 2018/14041-4).

## REFERÊNCIAS

ANDERSON, N. G. et al. ErbB receptor tyrosine kinase inhibitors as therapeutic agents. **Front Biosci**, v. 7, p. d1926-d1940, 2002.

ARKHIPOV, A. et al. Her2 activation mechanism reflects evolutionary preservation of asymmetric ectodomain dimers in the human EGFR family. **Elife**, v. 2, p. e00708, 2013.

ARTEAGA, C. L. et al. Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 9, n. 1, p. 16, 2012.

BENTUBO, H. D. L. et al. Expectativa de vida e causas de morte em cães na área metropolitana de São Paulo (Brasil). **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1021-1026, 2007.

BROCK, E. J. et al. In vitro models for studying invasive transitions of ductal carcinoma in situ. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 24, n. 1, p. 1-15, 2019.

BROEKMAN, F.; GIOVANNETTI, E.; PETERS, G. J. Tyrosine kinase inhibitors: Multi-targeted or single-targeted?. **World journal of clinical oncology**, v. 2, n. 2, p. 80, 2011.

BURRAI, G. P. et al. Investigation of HER2 expression in canine mammary tumors by antibody-based, transcriptomic and mass spectrometry analysis: is the dog a suitable animal model for human breast cancer?. **Tumor Biology**, v. 36, n. 11, p. 9083-9091, 2015.

DEXTER, D. L. et al. Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. **Cancer research**, v. 38, n. 10, p. 3174-3181, 1978.

DUTRA, A. P. et al. c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 11, p. 1673-1681, 2004.

GOLDSCHMIDT, M. et al. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary pathology**, v. 48, n. 1, p. 117-131, 2011.

GRÜNTZIG, K. et al. Swiss canine cancer registry 1955–2008: Occurrence of the most common tumour diagnoses and influence of age, breed, body size, sex and

neutering status on tumour development. **Journal of comparative pathology**, v. 155, n. 2-3, p. 156-170, 2016.

HOLBRO, T.; CIVENNI, G.; HYNES, N. E. The ErbB receptors and their role in cancer progression. In: **The EGF Receptor Family**. Academic Press, 2003. p. 103-114.

KACZYŃSKA, A.; HERMAN-ANTOSIEWICZ, A. Combination of lapatinib with isothiocyanates overcomes drug resistance and inhibits migration of HER2 positive breast cancer cells. **Breast Cancer**, v. 24, n. 2, p. 271-280, 2017.

KONECNY, G. E. et al. Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells. **Cancer research**, v. 66, n. 3, p. 1630-1639, 2006.

LAINETTI, P. F. et al. Establishment and Characterization of Canine Mammary Gland Carcinoma Cell Lines with Vasculogenic Mimicry Ability in vitro and in vivo  
**Preprint, Available from:**  
<https://www.preprints.org/manuscript/201912.0162/v1>. 2019.

LAZIC, S. E.; CLARKE-WILLIAMS, C. J.; MUNAFÒ, M. R. What exactly is 'N' in cell culture and animal experiments?. **PLoS biology**, v. 16, n. 4, p. e2005282, 2018.

LI, J.; KIM, S. G.; BLENIS, J. Rapamycin: one drug, many effects. **Cell metabolism**, v. 19, n. 3, p. 373-379, 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

MA, X. J. et al. Gene expression profiling of the tumor microenvironment during breast cancer progression. **Breast cancer research**, v. 11, n. 1, p. R7, 2009.

MEDINA, P. J.; GOODIN, S. Lapatinib: a dual inhibitor of human epidermal growth factor receptor tyrosine kinases. **Clinical therapeutics**, v. 30, n. 8, p. 1426-1447, 2008.

MITTAL, S.; BROWN, N. J.; HOLEN, I. The breast tumor microenvironment: role in cancer development, progression and response to therapy. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 18, n. 3, p. 227-243, 2018.

NAHTA, R. et al. Lapatinib induces apoptosis in trastuzumab-resistant breast cancer cells: effects on insulin-like growth factor I signaling. **Molecular cancer therapeutics**, v. 6, n. 2, p. 667-674, 2007.

NGUYEN, F. et al. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 1: natural history and prognostic factors. **Breast cancer research and treatment**, v. 167, n. 3, p. 635-648, 2018.

OWEN, L. N. et al. **TNM Classification of Tumours in Domestic Animals/edited by LN Owen**. Geneva: World Health Organization, 1980.

PATEL, T. A. et al. A randomized, controlled phase II trial of neoadjuvant ado-trastuzumab emtansine, lapatinib, and nab-paclitaxel versus trastuzumab, pertuzumab, and paclitaxel in HER2-positive breast cancer (TEAL study). **Breast Cancer Research**, v. 21, n. 1, p. 1-9, 2019.

PEÑA, L. et al. Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. **Veterinary pathology**, v. 51, n. 1, p. 127-145, 2014.

POLYAK, K. et al. Heterogeneity in breast cancer. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 10, p. 3786-3788, 2011.

REEVES, S. R. et al. Stability of gene expression by primary bronchial epithelial cells over increasing passage number. **BMC pulmonary medicine**, v. 18, n. 1, p. 91, 2018.

ROSKOSKI JR, R. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 319, n. 1, p. 1-11, 2004.

ROSS, J. S. et al. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. **The oncologist**, v. 14, n. 4, p. 320-368, 2009.

ROTH, V. Doubling time computing. **Available from: <http://www.doubling-time.com/compute.php>**, 2006.

SAHABI, K. et al. Comparative aspects of microRNA expression in canine and human cancers. **Journal of veterinary science**, v. 19, n. 2, p. 162-171, 2018.

SLEECKX, N. et al. Canine mammary tumours, an overview. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 6, p. 1112-1131, 2011.

SWAIN, S. M. et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 8, p. 724-734, 2015.

TOKUNAGA, E. et al. Akt is frequently activated in HER2/neu-positive breast cancers and associated with poor prognosis among hormone-treated patients. **International journal of cancer**, v. 118, n. 2, p. 284-289, 2006.

TRAPP, S. M. et al. Causas de óbito e razões para eutanásia em uma população hospitalar de cães e gatos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n. 5, p. 395-402, 2010.

TURASHVILI, G.; BROGI, E. Tumor heterogeneity in breast cancer. **Frontiers in medicine**, v. 4, p. 227, 2017.

VAN STAVEREN, W. C. G. et al. 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.

WOLFF, A. C. et al. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline focused update. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 142, n. 11, p. 1364-1382, 2018.

WU, X.; ZHOU, Q.; XU, K. Are isothiocyanates potential anti-cancer drugs?. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 30, n. 5, p. 501-512, 2009.

YANG, Qifeng et al. Correlation between nuclear grade and biological prognostic variables in invasive breast cancer. **Breast Cancer**, v. 8, n. 2, p. 105-110, 2001.

YANG, Y. H. K. et al. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. **Stem cell research & therapy**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2018.

YU, R. M. Chuan; CHEAH, Y. K. The roles of miRNAs in human breast cancer and canine mammary tumor. **Applied Cancer Research**, v. 37, n. 1, p. 37, 2017.

**Tabela suplementar 1.** Dados clínicos dos animais com carcinoma de mama utilizados para a cultura celular primária.

	Mama acometida	TNM <sup>1</sup>	Raça	Idade	Diagnóstico histopatológico <sup>2</sup>
CM1	Abdominal cranial esquerda	T3N1M1	Poodle	12 Anos	Carcinoma sólido
CM5	Torácica cranial direita e esquerda e abdominal cranial e caudal direita	T1N0M0	Teckel	10 Anos	Carcinoma sólido
CM9	Abdominal caudal esquerda	T2N0M0	Sem raça definida	12 Anos	Carcinoma sólido
CM60	Abdominal caudal e inguinal direita, torácica caudal e abdominal cranial esquerda	T3N1M0	Teckel	14 Anos	Carcinoma adeno-escamoso
MM1	Metástase CM1 (úmero)	T3N1M1	Poodle	12 Anos	Carcinoma sólido
MM4	Metástase CM60 (linfonodo inguinal)	T3N1M0	Teckel	14 Anos	Carcinoma adeno-escamoso

<sup>1</sup>Classificação de acordo com Owen et al., 1980

<sup>2</sup>Classificação de acordo com Goldschmidt et al., 2011