

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 11/01/2024.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DO RECEPTOR 2 DO
FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO HUMANO (HER2)
E DO ANTÍGENO NUCLEAR KI67 NO CARCINOMA DE
SACO ANAL CANINO**

Felipe Noleto de Paiva
Médico Veterinário

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DO RECEPTOR 2 DO
FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO HUMANO (HER2)
E DO ANTÍGENO NUCLEAR KI67 NO CARCINOMA DE
SACO ANAL CANINO**

Discente: Felipe Noletto de Paiva

Orientador: Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi

Coorientador: Prof. Dr. Paulo César Jark

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

2022

P149a	Paiva, Felipe Noleto de Avaliação da imunoexpressão do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e do antígeno nuclear Ki67 no carcinoma de saco anal canino / Felipe Noleto de Paiva. -- Jaboticabal, 2022 60 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Andrigo Barboza De Nardi Coorientador: Paulo César Jark 1. Medicina veterinária. 2. Imuno-histoquímica. 3. Câncer. 4. Cão. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

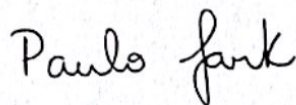
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DO RECEPTOR 2 DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO HUMANO (HER2) E DO ANTÍGENO NUCLEAR KI67 NO CARCINOMA DE SACO ANAL CANINO

AUTOR: FELIPE NOLETO DE PAIVA

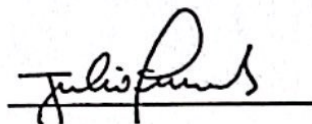
ORIENTADOR: ANDRIGO BARBOZA DE NARDI

COORDENADOR: PAULO CÉSAR JARK

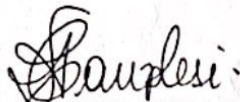
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Clínica Médica Veterinária pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. PAULO CÉSAR JARK (Participação Virtual)
Universidade Brasil / Descalvado/SP



Prof. Dr. JULIO ISRAEL FERNANDES (Participação Virtual)
Dpto. de Clínica Médica Veterinária / Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária



Profa. Dra. ANNELISE CARLA CAMPLESI DOS SANTOS (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 11 de julho de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Felipe Noleto de Paiva, nasceu no município de Goiânia, estado de Goiás, Brasil, no dia 19 de fevereiro de 1994. Ingressou no curso de medicina veterinária na Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (EVZ/UFG) no ano de 2012 e concluiu o curso no ano de 2017. Durante a graduação idealizou e fundou o grupo de estudos GEONCO/ONCOVET – UFG, foi coordenador discente do projeto de extensão Epidemiologia do Câncer em Caninos Domésticos no Hospital Veterinário da mesma instituição, e realizou estágios no serviço de oncologia do hospital veterinário da FCAV - Universidade Estadual Paulista (UNESP), campos de Jaboticabal, e da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Entre os anos de 2019 e 2021 realizou residência na área de Oncologia de Animais de Companhia pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), atuando ainda como representante dos residentes junto ao Núcleo Gestor do programa de residência. Iniciou em março de 2021, como aluno regular no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FACV/UNESP), campos de Jaboticabal, nível de Mestrado, sob orientação do Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi e coorientação do Prof. Dr. Paulo César Jark, onde se encontra no presente momento.

EPÍGRAFE

“Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”.

- Isaac Newton, 1675.

DEDICATÓRIA

Dedico mais essa conquista a minha avó Walda Cleres Marinho Noletto. A senhora foi exemplo de luta, determinação, resiliência e amor incondicional. Todas as minhas vitórias sempre serão suas.

AGRADECIMENTOS

Em meu terceiro texto de agradecimentos, em um período de 5 anos, me sinto feliz em afirmar que, em sua maioria, as mesmas pessoas continuam sendo nomeadas. E mesmo aqueles cujo caminho se distanciou do meu, saibam que eu guardo apenas as boas lembranças.

Agradeço primeiramente a Deus pela minha vida, à mãe Iemanjá e a todos os orixás, por guiarem e protegerem o meu caminho.

À minha mãe Gisele Marinho Noleto de Paiva, ao meu pai Carlson Queiroz Barbosa de Paiva e ao meu irmão Thiago Noleto de Paiva, por serem meu porto seguro em todos os momentos.

Aos meus avós José, Walda, Advo e Ceicinha, e a todos os meus familiares, tios e primos, por darem significado à palavra 'família'.

Ao meu parceiro Gabriel, por seu apoio incondicional e por tornar minha caminhada mais leve.

A Capitu, por ser a minha companhia mais fiel, nos meus melhores e piores dias.

Aos amigos que permaneceram por perto, mesmo que sempre tão longe, Ricardo Vilela, André Coelho, Bruno Ferrari, Amanda Coelho, Thais Fontes Braga, Guilherme Elias, Lucas (Thor) Freitas, João Pedro Dantas, Antônio Fernandes, Susana Veiga.

Aos meus companheiros de SOV, Adilson Cabral, Gabriel (Chevette) Montanhim, Michele Rocha, Beatriz Paz, Noelia Talavera e Milena Magrin. Em especial ao Gabriel Carra, por dividir comigo as terças feiras, com muitos conselhos e café, e por toda a ajuda na elaboração desse trabalho; a Lais Menescal, que me acolheu desde o meu primeiro dia e será minha eterna 'duplinha'; e a Stella Habib que tanto me ensinou em tão pouco tempo, e cuja amizade cresceu tão rápido que só pode ser explicada por conexões de outras vidas.

Aos meus orientadores Andrigo Barboza de Nardi e Paulo César Jark, por terem aceitado meu convite para a orientação e por todos os ensinamentos. Vocês moldaram a minha trajetória profissional de uma forma que não consigo expressar em palavras, desde a minha primeira passagem pela UNESP, durante um estágio em 2014, até o presente momento. O profissional que me tornei, muito se deve a vocês. Espero um dia poder inspirar pessoas como vocês me inspiram.

Aos professores Mirela Tinucci Costa, Nazilton de Paula Reis Filho, Marília Gabriele Prado Albuquerque Ferreira e Annelise Carla Camplesi dos Santos, pelas contribuições dadas a esse trabalho, em diferentes momentos.

Ao professor Julio Israel Fernandes, por sempre me incentivar e me apoiar em todos os projetos e empreitadas, e pela amizade que construímos e mantivemos.

A toda a equipe de professores, residentes e funcionários do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel e da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP.

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

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

A todos os meus pacientes.

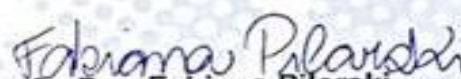
Muito obrigado.

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****C E R T I F I C A D O**

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação da Expressão do Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (HER2) nos Carcinomas de saco Anal Caninos"** protocolo nº 1678/21, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 19 de agosto de 2021.

Vigência do Projeto	01/08/2021 a 01/08/2022
Espécie / Linhagem	Canina
Nº de animais	Não especificado
Peso / Idade	Não especificado
Sexo	Não especificado
Origem	Amstras de blocos histopatológicos já coletadas, de exames previamente realizados por laboratório parceiro (VetPat – Campinas, SP)

Jaboticabal, 19 de agosto de 2021.


Profa. Dra. Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

AVALIAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DO RECEPTOR 2 DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO HUMANO (HER2) E DO ANTÍGENO NUCLEAR KI67 NO CARCINOMA DE SACO ANAL CANINO

RESUMO – O carcinoma de saco anal é uma neoplasia marcada por comportamento agressivo, com diversas formas de terapia relatadas. A cirurgia permanece como tratamento de eleição, sendo, no entanto, controversa em casos avançados e com metástase instalada. Os fatores prognósticos conhecidos, são igualmente controversos, e dessa forma, novos estudos têm sido realizados buscando novos marcadores prognósticos e preditivos. O HER2 é uma proteína de membrana relacionada ao processo de tumorigênese, comprovadamente expressa em diferentes tipos tumorais, na medicina humana e veterinária. O Ki67, por sua vez, é uma proteína nuclear, com função relacionada à proliferação celular que atua, como importante marcador prognóstico no câncer. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a imunoexpressão dos marcadores HER2 e Ki67 em casos de carcinoma de saco anal canino. Inicialmente foi realizado um estudo retrospectivo, acerca do carcinoma de saco anal em caninos, com um N de 260 casos. Posteriormente, foram obtidas amostras de carcinoma de saco anal, incluídas em parafina, junto ao laboratório parceiro, divididas em quatro grupos: maior diâmetro tumoral menor que 2,5cm, maior diâmetro tumoral maior que 2,5cm, linfonodos metastáticos e grupo controle. Cada grupo foi representado por um N de 10 amostras, sendo então realizada imunomarcagem para os marcadores HER2 e Ki67. Foi encontrado um maior acometimento em animais adultos a idosos, do sexo feminino e sem raça definida. Em relação ao tamanho tumoral, observou-se que os tumores frequentemente são diagnosticados já com dimensões elevadas. Quanto a avaliação imunoistoquímica, a marcação de HER2 foi positiva em 45% dos casos de tumor primário, com marcação 100% negativa no grupo controle, composto por amostras de saco anal íntegro. A imunoexpressão do Ki67 teve mediana de 25% em todos os grupos avaliados, com exceção do grupo controle, com mediana de 8% de imunoexpressão. Não houve associação entre a imunoexpressão do HER2 ou do Ki67 nos diferentes tamanhos tumorais, nem na comparação de tumores primários e metastáticos. O estudo demonstrou que a imunoexpressão do HER2 e do Ki67 está presente em carcinomas de saco anal, representando um potencial alvo terapêutico, diferindo dos sacos anais não neoplásicos.

Palavras-chave: adenocarcinoma apócrino do saco anal, imunoistoquímica, neoplasia.

IMMUNOEXPRESSION EVALUATION OF HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR 2 (HER2) AND NUCLEAR ANTIGEN KI67 IN CANINE ANAL SAC CARCINOMA

ABSTRACT – Anal sac carcinoma is a neoplasm marked by aggressive behavior, with several forms of therapy reported. Surgery remains the treatment of choice, although it is controversial in advanced cases with established metastasis. The known prognostic factors are equally controversial, and thus, new studies have been carried out looking for new prognostic and predictive markers. HER2 is a membrane protein related to the tumorigenesis process, proven to be expressed in different tumor types in Human and Veterinary Medicine. Ki67 is a nuclear protein, with function related to cell proliferation that acts as an important prognostic marker in cancer. The aim of the present study was to evaluate the immunoexpression of HER2 and Ki67 markers in cases of canine anal sac carcinoma. Initially, a retrospective study was carried out on anal sac carcinoma in canines, with an N of 260 cases. Subsequently, samples of anal sac carcinoma, embedded in paraffin, were obtained from the partner laboratory, divided into four groups: largest tumor diameter less than 2.5 cm, largest tumor diameter greater than 2.5 cm, metastatic lymph nodes and control group. Each group was represented by an N of 10 samples, and immunostaining for markers HER2 and Ki67 was then performed. A greater involvement was found in adult to elderly animals, female and mixed breed. Regarding the tumor size, it was observed that tumors are often diagnosed with high dimensions. As for the immunohistochemical evaluation, HER2 staining was positive in 45% of the primary tumor cases, with 100% negative staining in the control group, composed of intact anal sac samples. Ki67 immunoexpression had a median of 25% in all groups evaluated, with the exception of the control group, with a median of 8% immunoexpression. There was no association between HER2 or Ki67 immunoexpression in different tumor sizes, nor in the comparison of primary and metastatic tumors. The study demonstrated that HER2 and Ki67 immunoexpression is present in anal sac carcinomas, representing a potential therapeutic target, differing from non-neoplastic anal sacs.

Key words: apocrine adenocarcinoma of the anal sac, immunohistochemistry, neoplasm.

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

Os tumores de saco anal, principalmente na variante maligna, são comuns na medicina veterinária, e estão relacionados à um potencial agressivo, com importantes taxas de infiltração local e principalmente metástase à distância. O prognóstico varia de reservado a desfavorável devido ao diagnóstico frequentemente tardio e a baixa eficácia das modalidades terapêuticas atualmente disponíveis (Barnes e Demetriou, 2017; Chambers et al., 2020; Withrow et al., 2020).

O receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico também denominado HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor - Type 2) representa uma proteína relacionada ao desenvolvimento neoplásico, sendo a sua expressão bem estabelecida na medicina humana em diversos tipos tumorais (Hynes e Stern, 1994; Gutierrez e Schiff, 2011; Hsu e Hung, 2016). Na medicina veterinária pesquisas têm sido desenvolvidas na tentativa de avaliar a expressão do HER2 em tumores que já possuem a sua expressão observada na medicina humana, como no caso dos carcinomas mamários, de tireoide, de células transicionais vesicais, gástricos e pulmonares (Tsuboi et al., 2019; Lorch et al., 2019; Yoshimoto et al., 2019b; Yoshimoto et al., 2020; Brunetti et al., 2021).

O antígeno nuclear Ki67, por sua vez, é uma proteína nuclear expressa em células em divisão celular e ausente em células em repouso. Sua forma de expressão, somada a meia-vida curta, tornam a proteína um importante marcador prognóstico, reconhecido na medicina humana e veterinária (Meuten, 2017; Gil e Vagnarelli, 2018; Miller et al., 2018).

O presente trabalho, tem o propósito de aprofundar a investigação acerca dos marcadores HER2 e Ki67 nos carcinomas de saco anal canino. Ao avaliar a expressão desses marcadores, objetiva-se definir, potencialmente novas ferramentas prognósticas, preditivas e terapêuticas, permitindo diferenciar as neoplasias de comportamento mais agressivo, daquelas menos agressivas, antecipando o comportamento tumoral, e fornecendo um alvo molecular para novas terapias medicamentosas em desenvolvimento.

5. Conclusão

A imunoexpressão do HER2 se mostrou presente nos carcinomas de saco anal, mesmo naqueles de dimensões mínimas, menores que 2,5 cm em seu maior diâmetro, bem como em linfonodos regionais com metástase instalada. A marcação observada, em 45% dos casos, é inferior ao demonstrado em outros estudos, entretanto, quando comparada a marcação em sacos anais íntegros, de 0% dos casos, evidencia a sua importância no processo neoplásico. Conclui-se ainda que os carcinomas de saco anal, comprovadamente expressam a proteína Ki67, entretanto não foi possível sugerir um valor de corte, nem determinar o seu valor prognóstico. Ambos os marcadores apresentam imunoexpressão clara e representam potenciais alvos terapêuticos para novas drogas em desenvolvimento, porém, novos estudos são necessários para validar o seu valor prognóstico.

6. Referências

Barnes DC, Demetriou JL (2017) Surgical management of primary, metastatic and recurrent anal sac adenocarcinoma in the dog: 52 cases. **Journal of Small Animal Practice** 58(5): 263-268.

- Bennett PF, DeNicola DB, Patty Bonney P, Glickman NW, Knapp DW (2002) Canine anal sac adenocarcinomas: clinical presentation and response to therapy. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 16(1): 100-104.
- Brunetti B, Bacci B, Sarli G, Pancioni E, Muscatello LV (2021) Immunohistochemical Screening of HER2 in Canine Carcinomas: A Preliminary Study. **Animals** 11(4): 1006.
- Chambers AR, Skinner OT, Mickelson MA, Schlag AN, Butler JR, Wallace ML, Moyer AL, Vinayak A, Samuel N, Kennedy KC, Oakes KE, Scharf VF, Parker LA, Wustefeld-Janssens BG (2020) Adherence to follow-up recommendations for dogs with apocrine gland anal sac adenocarcinoma: A multicentre retrospective study. **Veterinary and Comparative Oncology** 18(4): 683-688.
- Flint AF, U'ren, L, Legare ME, Withrow SJ, Dernell W, Hanneman WH (2004) Overexpression of the erbB-2 proto-oncogene in canine osteosarcoma cell lines and tumors. **Veterinary Pathology** 41(3): 291-296.
- García JMC, Murillo CEG, Jaramillo MR (2020). EGFR and HER2 small molecules inhibitors as potential therapeutics in veterinary oncology. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas** 49(2): 452-471.
- Gil RS, Vagnarelli P (2018) Ki-67: More Hidden behind a 'Classic Proliferation Marker'. **Trends in Biochemical Sciences** 43(10): 747-748.
- Heaton CM, Fernandes AF, Jark PC, Pan X (2020). Evaluation of toceranib for treatment of apocrine gland anal sac adenocarcinoma in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 34(2): 873-881.
- Hsu JL, Hung MC (2016) The role of HER2, EGFR, and other receptor tyrosine kinases in breast cancer. **Cancer and Metastasis Reviews** 35(4): 575-588.
- Krishnamurti U, Silverman JF (2014) HER2 in breast cancer: a review and update. **Advances in Anatomic Pathology** 21(2): 100-107.
- Lorch G, Sivaprakasam K, Zismann V, Perdignes N, Contente-Cuomo T, Nazareno A, Facista S, Wong S, Drenner K, Liang WS, Amann JM, Sinicropi-Yao SL, Koenig MJ, La Perle K, Whitsett TG, Murtaza M, Trent JM, Carbone DP, Hendricks WPD (2019)

Identification of recurrent activating HER2 mutations in primary canine pulmonary adenocarcinoma. **Clinical Cancer Research** 25(19): 5866-5877.

Maeda S, Sakai K, Kaji K, Iio A, Nakazawa M, Motegi T, Yonezawa T, Momoi Y (2022) Lapatinib as first-line treatment for muscle-invasive urothelial carcinoma in dogs. **Scientific Reports** 12(1):1-10.

Majumder A, Sandhu M, Banerji D, Steri V, Olshen A, Moasser MM (2021) The role of HER2 and HER3 in HER2-amplified cancers beyond breast cancers. **Scientific Reports** 11(1): 1-11.

Meuten DJ (5^a ed.) (2017) Tumors in domestic animals. Ames: John Wiley & Sons Inc, 989p.

Miller, I Min M, Yang C, Tian C, Gookin S, Carter D, Spencer SL (2018) Ki67 is a graded rather than a binary marker of proliferation versus quiescence. **Cell Reports** 24(5): 1105-1112.

Morello EM, Cino M, Giacobino D, Nicoletti A, Iussich S, Buracco P, Martano M (2021) Prognostic Value of Ki67 and Other Clinical and Histopathological Factors in Canine Apocrine Gland Anal Sac Adenocarcinoma. **Animals** 11(6): 1649.

Pereira RS, Schweigert A, Melo GD, Fernandes FV, Sueiro FAR, Machado GF (2013) Ki-67 labeling in canine perianal glands neoplasms: a novel approach for immunohistological diagnostic and prognostic. **BMC Veterinary Research** 9(1): 1-7.

Perez EA, Cortés J, Gonzalez-Ângulo AM, Bartlett JMS (2014) HER2 testing: Current status and future directions. **Cancer Treatment Reviews** 40(2014): 276-284.

Polton GA, Brearley MJ (2007) Clinical stage, therapy, and prognosis in canine anal sac gland carcinoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 21(2): 274-280.

Potanas CP, Padgett S, Gamblin RM (2015) Surgical excision of anal sac apocrine gland adenocarcinomas with and without adjunctive chemotherapy in dogs: 42 cases (2005–2011). **Journal of the American Veterinary Medical Association** 246(8): 877-884.

Pradel J, Berlato D, Dobromylskyj M, Rasotto R (2018) Prognostic significance of histopathology in canine anal sac gland adenocarcinomas: preliminary results in a retrospective study of 39 cases. **Veterinary and Comparative Oncology** 16(4): 518-528.

Ressel L, Puleio R, Loria GR, Vannozzi I, Millanta F, Caracappa S, Poli A (2013) HER-2 expression in canine morphologically normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissues and its correlation with the clinical outcome. **Research in Veterinary Science** 94(2): 299-305.

Sakai K, Maeda S, Saeki K, Nakagawa T, Murakami M, Endo Y, Yonezawa T, Kadosawa T, Mori T, Nishimura R, Matsuki N (2018) Anti-tumour effect of lapatinib in canine transitional cell carcinoma cell lines. **Veterinary and Comparative Oncology** 16(4): 642-649.

Sakai K, Shinohara Y, Kaji K, Yonezawa T, MoMoi Y, Maeda S (2021) Human epidermal growth factor receptor 2 is overexpressed in canine prostate carcinoma. **Translational and Regulatory Sciences** 3(1):1-8.

Schlag AN, Johnson T, Vinayak A, Kuvaldina A, Skinner OT, Wustefeld-Janssens BG (2020) Comparison of methods to determine primary tumour size in canine apocrine gland anal sac adenocarcinoma. **Journal of Small Animal Practice** 61(3): 185-189.

Skorupski KA, Alarcón CN, Lorimier, LP, LaDouceur EEB, Rodriguez CO, Rebhun RB (2018) Outcome and clinical, pathological, and immunohistochemical factors associated with prognosis for dogs with early-stage anal sac adenocarcinoma treated with surgery alone: 34 cases (2002–2013). **Journal of the American Veterinary Medical Association** 253(1): 84-91.

Sun X, Kaufman PD (2018) Ki-67: more than a proliferation marker. **Chromosoma** 127(2): 175-186.

Suzuki K, Morita R, Hojo Y, Nomura K, Shibutani M, Mitsumori K (2013) Immunohistochemical characterization of neuroendocrine differentiation of canine anal sac glandular tumours. **Journal of Comparative Pathology** 149(2-3): 199-207.

Tanaka Y, Watanabe M, Saeki K, Ong, SM, Yoshitake R, Imamura S, Nishimura R, Sugano S, Nakagawa T (2020) Evaluation of the proper dosage of lapatinib and its safety in dogs. **Translational and Regulatory Sciences** 2(3): 68-71.

Tao Li L, Jiang G, Chen Q, Zheng, JN (2015) Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer. **Molecular Medicine Reports** 11(3), 1566-1572.

Terragni R, Casadei Gardini AC, Sabattini S, Bettini G, Amadori D, Talamonti C, Vignoli M, Capelli L, Saunders JH, Ricci M, Ulivi P (2014) EGFR, HER-2 and KRAS in canine gastric epithelial tumors: a potential human model. **PLOS one** 9(1): e85388.

Tsuboi M, Sakai K, Maeda S, Chambers JK, Yonezawa T, Matsuki N, Uchida K, Nakayama H (2019) Assessment of HER2 expression in canine urothelial carcinoma of the urinary bladder. **Veterinary Pathology** 56(3): 369-376.

Williams LE, Gliatto JM, Dodge RK, Johnson JL, Gamblin RM, Thamm DH, Lana SE, Szymkowski M, Moore AS (2003) Carcinoma of the apocrine glands of the anal sac in dogs: 113 cases (1985–1995). **Journal of the American Veterinary Medical Association** 223(6): 825-831.

Withrow SJ, Vail DM, Page RL (6^a ed.) (2020) Small Animal Clinical Oncology. St. Louis: Elsevier, 842p.

Wolff AC, Hammond MEH, et al. (2014) Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine** 138(2):241-256.

Wong H, Byrne S, Rasotto R, Drees R, Taylor A, Priestnall SL, Leo C (2021) A Retrospective Study of Clinical and Histopathological Features of 81 Cases of Canine Apocrine Gland Adenocarcinoma of the Anal Sac: Independent Clinical and Histopathological Risk Factors Associated with Outcome. **Animals** 11(11): 3327.

Wouda RM, Borrego J, Keuler NS, Stein T (2016) Evaluation of adjuvant carboplatin chemotherapy in the management of surgically excised anal sac apocrine gland adenocarcinoma in dogs. **Veterinary and Comparative Oncology** 14(1): 67-80.

Yan M, Schwaederle M, Arguello D, Millis SZ, Gatalica Z, Kurzrock R (2015) HER2 expression status in diverse cancers: review of results from 37,992 patients. **Cancer and Metastasis Reviews** 34(1): 157-164.

Yarden Y (2001) Biology of HER2 and its importance in breast cancer. **Oncology** 61(2): 1-13.

Yoshimoto S, Kato D, Kamoto S, Yamamoto K, Tsuboi M, Shinada M, Ikeda N, Tanaka Y, Yoshitake R, Eto S, Saeki K, Chambers JK, Kinoshita R, Uchida K, Nishimura R, Nakagawa T (2019a) Detection of human epidermal growth factor receptor 2 overexpression in canine anal sac gland carcinoma. **Journal of Veterinary Medical Science** 81(7): 1034-1039.

Yoshimoto S, Kato D, Kamoto S, Yamamoto K, Tsuboi M, Shinada M, Ikeda N, Tanaka Y, Yoshitake R, Eto S, Saeki K, Chambers JK, Kinoshita R, Uchida K, Nishimura R, Nakagawa T (2019b) Immunohistochemical evaluation of HER2 expression in canine thyroid carcinoma. **Heliyon** 5(7): e02004.

Yoshimoto S, Kato D, Kamoto S, Yamamoto K, Tsuboi M, Shinada M, Ikeda N, Tanaka Y, Yoshitake R, Eto S, Saeki K, Chambers JK, Hashimoto Y, Uchida K, Nishimura R, Nakagawa T (2020) Overexpression of human epidermal growth factor receptor 2 in canine primary lung cancer. **Journal of Veterinary Medical Science** 82(6): 804-808.