

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

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

MAYARA SIMÃO FRANZONI

Botucatu –
SP Julho
2022

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

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

MAYARA SIMÃO FRANZONI

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

Orientador: Dr. Carlos Eduardo
Fonseca Alves

Coorientador: Dra. Renee Laufer Amorim

Botucatu –
SP Julho
2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Franzoni, Mayara Simão.

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

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

Orientador: Carlos Eduardo Fonseca Alvez

Coorientador: Renee Laufer Amorim

Capes: 50501003

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

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

Nome do autor (a): Mayara Simão Franzoni

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca

Presidente e Orientador

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

Prof. Dr. Denner Santos dos Anjos

Membro

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

Profa. Dra. Marxa Leão Figueiredo

Membro

Department of Basic Medical Sciences - Purdue University

Data da Defesa: 29 de julho de 2022.

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

Ana Claudia Quintana Arantes

SUMÁRIO

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

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

Keywords: osteosarcoma, HER-2, lapatinibe.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

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

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

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

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

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

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

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Osteossarcoma

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

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

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

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

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

2.2 Sinais clínicos e diagnósticos

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



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

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

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

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

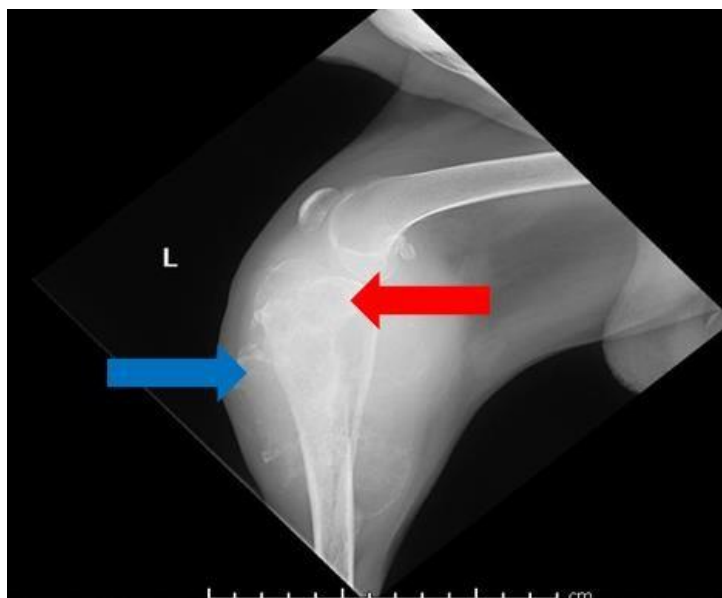


Figura 02. Osteossarcoma em membro pélvico esquerdo em um cão da raça Golden Retriever utilizado para execução do projeto. Pode-se notar lise óssea (seta vermelha) e reações periosteais (seta azul). Fonte: Elaboração dos autores.

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

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

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

2.3 Classificação histopatológica do osteossarcoma

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

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

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

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

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

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

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

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

2.4 Fatores prognósticos

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

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

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

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

2.5 Tratamento e prognóstico

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

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

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

2.6 HER-2

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

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

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

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

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

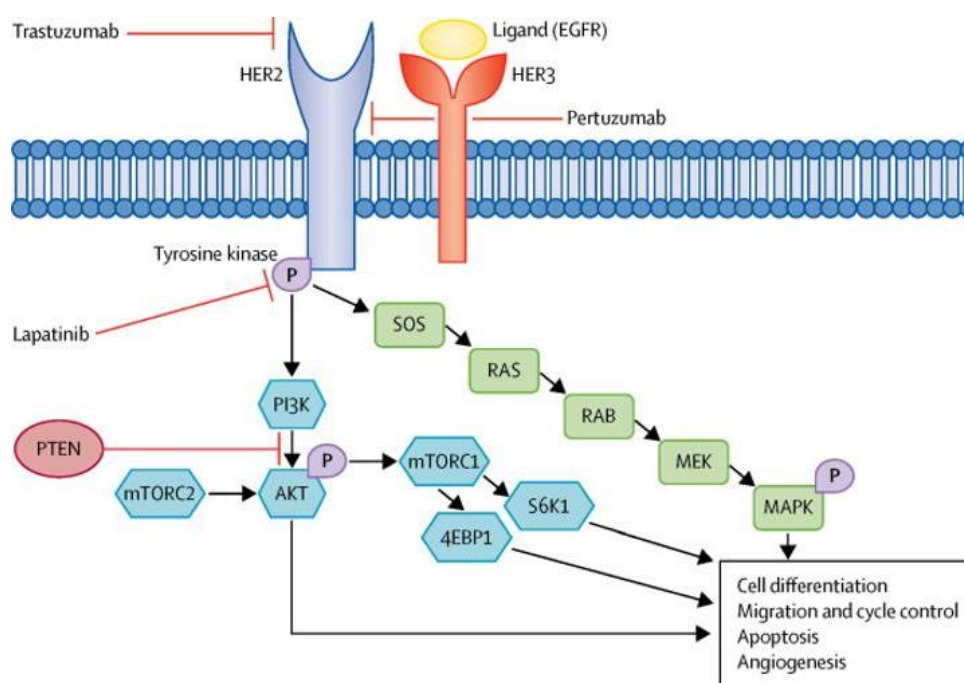


Figura 03. Esquematização da ativação da proteína HER-2, pela dimerização com a proteína HER-3. A dimerização pode ocorrer com outras proteínas da família EGFR (Incluindo EGFR-1), e ativa sinais de migração e diferenciação celular, apoptose e angiogênese. Portanto, o bloqueio com fármacos anti-HER-2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

2.7 Lapatinibe

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

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

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

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

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

2.8 Imunohistoquímica

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

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

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

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

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

2.9. Cultura celular

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

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

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

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

No entanto, algumas desvantagens em relação à cultura primária devem

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

HIPÓTESE

O Lapatinibe pode ser utilizado como agente antineoplásico em osteossarcoma *in vitro*, e relaciona com a expressão de HER-2 em amostras de osteossarcomas caninos de esqueleto apendicular.

OBJETIVOS

Gerais

Avaliar a expressão e a heterogeneidade de HER-2 em amostras de osteossarcomas caninos e avaliar o efeito antitumoral do Lapatinibe em culturas de osteossarcoma caninos, além de compará-lo ao uso da doxorrubicina.

Específicos

- Avaliar a heterogeneidade da expressão inter- e intra-tumoral de HER-2 em amostras de osteossarcomas caninos
- Estabelecer e caracterizar culturas celulares de osteossarcomas caninos
- Avaliar a expressão de HER-2 nas diferentes culturas de osteossarcomas caninos
- Avaliar o efeito antitumoral do Lapatinibe em culturas de células de osteossarcomas caninos. Avaliar a expressão de HER-2 nas diferentes culturas de osteossarcomas caninos
- Comparar os resultados encontrados com o uso do Lapatinibe com os achados do uso da doxorrubicina nas culturas celulares avaliadas, para avaliar a diferença entre ambos.

ARTIGO I*

Artigo a ser enviado para o periódico *Cells* (IF: 7.666)

As normas podem ser verificadas em:

<https://www.mdpi.com/journal/cancers/instructions>

**Evaluation of intra and intertumoral heterogeneity, including HER-2
expression in canine appendicular osteossarcoma**

M.S. Franzoni¹, P. F. Lainetti¹, A. F. Leis-Filho¹, R. Laufer-Amorim², A. Battazza,
T. O. Silva, C. E. Fonseca-Alves²

¹Department of Veterinary Suregry and Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University – UNESP, Botucatu-SP, Brazil.

²Department of Veterinary Clinic, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University – UNESP, Botucatu-SP, Brazil.

³Institute of Health Sciences, Paulista University – UNIP, Bauru-SP, Brazil.

*Correspondece: Carlos E.Fonseca-Alves, e-mail: carlos.e.alves@unesp.br

Abstract

Osteosarcoma is a malignant bone cancer in dogs and the incidence varies according to the breed, which can be from 0.2 to 8%, and has a very poor prognosis. Currently, the human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) has been implied in osteosarcoma development and is considered a drug target. Unfortunately, few histopathological and immunohistochemical biomarkers have been used in clinical practice, due to lack of association of these markers with cancer prognosis. Therefore, we believe this lack of association could be associated with tumor heterogeneity. Thus, this research aimed to evaluate intra and intertumoral heterogeneity and HER-2 expression in canine appendicular osteosarcoma. According to the results obtained, it can be concluded that the expression of HER-2, whether in intensity or labeling scores, was correlated with patients who had a worse prognosis during the course of the clinical course, in addition to being associated with unfavorable characteristics in the histopathological, mainly the presence of necrosis in the sample, and clinical aspects, such as location, body score and age of involvement.

KEYWORDS: human epidermal growth factor receptor, osteosarcoma, prognosis.

1. INTRODUÇÃO

O osteossarcoma é a principal neoplasia óssea da espécie canina, sendo responsável por 90% dos diagnósticos (DERNELL et al., 2001, EGENVALL et al., 2007). O local de maior prevalência desse tipo de neoplasia é o esqueleto apendicular, principalmente em ossos longos (BERG et al., 1992) e regiões metafisárias (STRAW et al., 1990), e membros torácicos são mais acometidos do que os membros pélvicos (MAULDIN et al., 1988).

Trata-se de uma neoplasia mais comum em cães, sem predisposição sexual, de porte grande a gigante (RU et al., 1998), e há algumas raças como Pastor Alemão, Golden Retriever, Boxer (BRODEY, 1965), Rottweiler e São Bernardo (SHAPIRO et al., 1988) que apresentam predisposição genética para o desenvolvimento do osteossarcoma. A faixa etária de maior acometimento são cães de em média sete anos (BRODEY & RISER, 1969), porém pode ocorrer em cães mais jovens devido à característica bimodal dessa neoplasia (PHILLIPS et al., 1986).

De acordo com o tipo de matriz presente na amostra, ele pode ser subdividido em tipos histopatológicos, o osteoblástico é o mais comum e apresenta matriz óssea na amostra (MUFF et al., 2012), o condroblástico com matriz cartilaginosa associada à matriz hialina, subtipos fibroblástico presença de células fusiformes (CHUN & LORIMIER, 2003), além do telangiectásico que apresenta capilares desorganizados por toda sua extensão (CHUN & LORIMIER, 2003).

O osteossarcoma também pode ser dividido em graus histopatológicos de acordo com alguns critérios, como pleomorfismo, cariomegalia, índice mitótico, binucleação, quantidade de matriz e necrose (MOORE et al., 2007). Há alguns fatores prognósticos muito importantes e consolidados na literatura sobre o osteossarcoma, animais mais jovens (SPODNICK et al., 1992), pesados (BERGMAN et al., 1992), subtipo histopatológico telangiectásico, costela (HAMMER et al., 1995) e úmero (BERGMAN et al., 1992), tendem a ter um pior prognóstico.

O osteossarcoma apresenta um prognóstico muito ruim, pois a maioria dos cães possui metástase no momento do diagnóstico (SELMIC et al., 2014), além de a sobrevida ser baixa, mesmo associando procedimento cirúrgico, normalmente a amputação do membro, com protocolo quimioterápico, independente de qual fármaco for usado ou associações entre a carboplatina e a doxorrubicina (SELMIC et al., 2014). Portanto o desenvolvimento de novas opções terapêuticas se faz necessário para esse tipo neoplasia.

Pesquisas recentes demonstraram que o HER-2, um receptor de tirosina quinase, é expresso no osteossarcoma (MASON et al., 2016, STROUD et al., 2016), e a expressão pode estar associada à baixa sobrevida e resistência quimioterápica (ZHOU et al., 2003, RAINUSSO et al., 2012), além de estimular outras vias de diferenciação celular, migração, apoptose e angiogênese. Assim, o bloqueio desta via pode impedir toda a cascata de sinalização e as consequências dela (LOIBL & GIANNI, 2017). Porém, é necessário que a avaliação do HER-2 seja realizada de forma a considerar a heterogeneidade do osteossarcoma, pois uma pequena porção avaliada com superexpressão de HER-2 pode não ser significativa diante toda a massa neoplásica (ZHANG et al., 2016).

O objetivo desse estudo foi avaliar a heterogeneidade intra e inter-tumoral de amostras de osteossarcoma de esqueleto apendicular em cães e associar os resultados aos demais parâmetros histopatológicos e clínicos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Design do estudo

Trata-se de um estudo não randomizado, incluindo cães com osteossarcoma apendicular canino, com diagnóstico prévio de osteossarcoma (por citologia ou biópsia óssea) apendicular, submetidos à cirurgia de amputação de membro. A realização desse estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética de Utilização de Animais — UNESP Botucatu (Protocolo CEUA 0035/2020).

Foi realizada avaliação histopatológica de 20 amostras de osteossarcomas com quatro fragmentos de regiões distintas do tumor. Para essa análise, o tumor

foi dividido em quadrantes, e uma amostra representativa de 1x1x1 centímetros foi retirada de cada quadrante (Figura 1). Para obtenção das amostras, foi realizada a secção da pele da peça cirúrgica, áreas de necrose e hemorragia foram evitadas. Foram coletadas quatro amostras de 20 pacientes, totalizando 80 fragmentos histopatológicos.

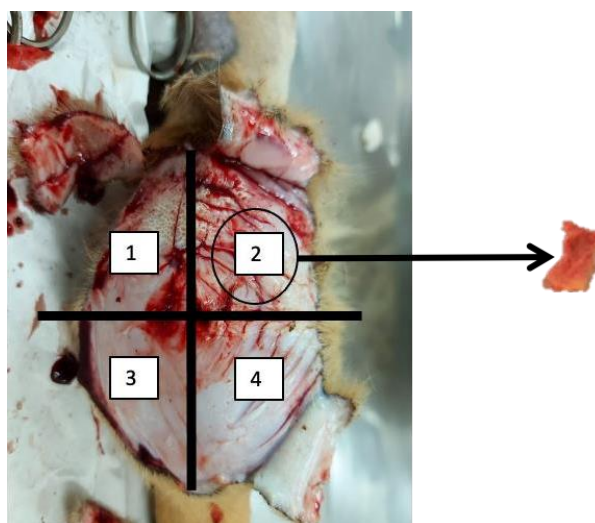


Figura 01. Os Algarismos no tumor representam os quatro quadrantes da amostra. Nessa figura há a ilustração da coleta do quadrante número dois, que posteriormente obteve-se a porção para o exame histopatológico. A coleta de todas as amostras dos quatro quadrantes ocorreu da forma descrita anteriormente.

2.2 Exame histopatológico

As amostras coletadas de cada quadrante foram fixadas em formalina tamponada a 10% durante 48 horas, e em seguida, passadas para o álcool 70% até processamento. Não houve necessidade de utilizar descalcificador, pois todos os tecidos ósseos coletados apresentavam consistência macia, provavelmente devido ao infiltrado neoplásico e lise óssea que o osteossarcoma causa. Posteriormente, essas amostras foram processadas e incluídas em parafina.

Em seguida, todas as amostras foram cortadas na espessura de 4 µm em micrótomo automático (Leica biosystems), distendidas em lâminas próprias para

microscopia, coradas por hematoxilina e eosina e montadas com resina, para visualização em microscópio óptico.

A avaliação histopatológica foi realizada para confirmação do diagnóstico e definição do subtipo do osteossarcoma, além de avaliação das características histopatológicas de cada um dos quatro fragmentos de uma amostra. Na avaliação histopatológica os quatro fragmentos de cada amostra foram avaliados da mesma forma, de modo que, além da determinação do subtipo do osteossarcoma, também foram consideradas as seguintes características: quantidade de matriz, quantidade de necrose, pleomorfismo nuclear, tamanho nuclear, número de núcleos e número de mitose em cada fragmento (MOORE et al., 2007).

2.3 Imunohistoquímica

Para realização da imunohistoquímica, os 20 blocos de parafina foram cortados em micrótomo com espessura de 3 μ m e distendidos em lâminas próprias para imunohistoquímica (StarFrost, Knittel, Braunschweig, Alemanha). As lâminas foram transferidas para estufa com temperatura entre 55°C por 24 horas, e em seguida, para cubas de vidro vertical para realização da desparafinização. A recuperação antigênica foi realizada em panela de pressão (Pascal, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA) com solução de citrato pH 6.0, e o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado a partir de uma solução a 8% de peróxido de hidrogênio a 30 volumes (Dinâmica) em metanol absoluto (Dinâmica), durante 20 minutos. Após esta etapa, procedeu-se com o bloqueio de reação inespecífica com solução de leite em pó desnatado a 8% durante uma hora, em estufa com temperatura de 27°C. A incubação do anticorpo primário, foi feita com o mouse monoclonal anti-HER-2 (Dako cytomation, Carpinteria, CA, USA), na diluição de 1:100.

A identificação do anticorpo foi obtida pelo sistema de polímero (Horseradish Peroxidase — HRP) e o 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) como cromógeno (NUOVO et al., 2016), e os cortes foram contra corados com Hematoxilina de Harris, posteriormente, desidratados, montados com resina e observados em microscópio óptico. Para o controle positivo considerou-se a

marcação do próprio osteossarcoma, uma vez que a expressão existe nessa neoplasia, e para o controle negativo, foi substituído o anticorpo primário por solução tampão TRIS (pH: 7,4).

A avaliação da expressão do HER-2 foi realizada para cada fragmento das amostras e foi baseada no escore de marcação de membrana plasmática de células neoplásicas, que podia variar entre 1 (<10% de células marcadas), 2 (10 a 50% de marcação) e 3 (acima de 50% de marcação), concomitante ao escore de intensidade de marcação (1: fraca, 2: moderada, 3: forte). A pontuação final de marcação HER-2 foi obtida a partir da multiplicação do escore de marcação com o escore de intensidade (MASON et al, 2016). Além disso, foi preconizado visualização de 10 campos diferentes no corte histopatológico.

2.4 Análise estatística

Devido à variação histopatológica e imuno-histoquímica ser notável entre uma mesma amostra neoplásica, a intensidade e coloração do HER-2 foram avaliadas de forma separada para associação dos achados microscópicos. Para identificar interdependências entre o grau de marcação e intensidade de HER-2 com os achados histopatológicos qualitativos (grau de pleomorfismo, cariomegalia, necrose, binucleação e o grau histopatológico) e perfil histórico do paciente (fragmentos, localização anatômica, subtipo, idade, peso e dias de sobrevivência após diagnóstico), foi conduzida uma análise de correspondência múltipla.

A priori, as variáveis quantitativas: idade, peso, e dias de sobrevivência após o diagnóstico foram convertidos em variáveis qualitativas contendo quatro classes de acordo com o valor mínimo, primeiro, segundo e terceiro quartil e valor máximo. A posteriori, a matriz formada pelas variáveis qualitativas de grau de marcação e intensidade de HER-2, achados histopatológicos e perfil histórico do paciente, foi convertida em uma tabela de Burt e submetida à análise de correspondência múltipla.

Os resultados da análise de correspondência múltipla foram ilustrados em um mapa perceptual bidimensional com as duas primeiras dimensões. Para explorar os achados de HER-2, histopatológicos e perfil histórico do paciente no âmbito dos três níveis de gravidade do escore histopatológico, os escores

individuais de cada paciente das duas primeiras dimensões da análise de correspondência múltipla, foram submetidos a uma análise de agrupamento hierárquica para três agrupamentos.

O escore individual é um coeficiente que representa a interdependência múltipla entre as variáveis para cada dimensão. Com intuito de confirmar a separação entre os agrupamentos, as variações dos escores individuais em função dos três agrupamentos foram investigadas por uma regressão linear simples estimada por mínimos quadrados.

Comparações múltiplas foram pré-formadas no pós-teste com a correção do procedimento de Bonferroni. No mapa perceptual bidimensional da análise de correspondência múltipla foram adicionadas elipses confidentes com base nos três graus histopatológicos e em outro mapa perceptual foram incluídas elipses convexas baseadas na análise de agrupamento dos escores individuais da análise de correspondência múltipla.

Para investigar a significância das interdependências entre os agrupamentos, achados de HER-2, histopatológicos e perfil histórico do paciente, os três agrupamentos pelos escores individuais da análise de correspondência múltipla foram incluídos na tabela de Burt que foi submetida ao teste de qui-quadrado para investigar a existência de relação não aleatória entre as linhas e colunas da matriz. Ademais, foram extraídos os resíduos que foram ajustados e padronizados pela escala z-normal.

Quando a ocorrência de uma das classes de variáveis diferentes foi elevada concomitantemente, entendeu-se como sendo uma interdependência significativa entre as variáveis qualitativas. Para tanto, os resíduos padronizados pela escala z-normal (Z) $> 1,65$ e $> 1,96$ determinaram existência de interdependências com significância de respectivamente 10 e 5% entre as classes das variáveis qualitativas, sendo que quanto maior a distância do ponto de corte estabelecido pelo Z , maior foi a magnitude de interdependência (Agresti, 2007).

Nesta análise as significâncias de 10% foram interpretadas como tendências. As interdependências foram usadas para estabelecer padrões de resposta entre os grupos, as classes e os achados qualitativos da histopatologia.

3. RESULTADOS

3.1 Características clínicas

Pode-se observar que apesar de haver uma grande variação entre idade mínima e a idade máxima dos pacientes, a faixa etária média foi de sete anos. As raças mais frequentes foram sem raça definida, Rottweiler e Labrador, respectivamente. Os dados clínicos completos dos pacientes podem ser verificados na Tabela 1. Não se obteve diferença entre o sexo, sendo que 11 pacientes são fêmeas e nove são machos. Além disso, a maior parte dos pacientes era de porte grande, sendo apenas três animais com peso menor de 20 kg. A localização anatômica mais frequente foi úmero (7/20), seguido de rádio e ulna (6/20), fêmur (4/20), tíbia e fíbula (2/20) e metatarso (2/20).

Tabela 01. Características clínicas dos pacientes usados para avaliação histopatológica e imuno-histoquímica. Dados de sobrevida em negrito são referentes a pacientes que realizaram protocolo quimioterápico.

Amostr a	Idade (anos)	Raça	Sexo	Peso (kg)	Localização anatômica	Sobrevid a (dias)
1	12	SRD	Fême a	29	Rádio e ulna	15
2	10	SRD	Fême a	17	Rádio e ulna	45
3	11	Labrador	Macho	43	Umero	25
4	4	Rottweiler	Macho	50	Umero	300
5	6	P. Alemão	Fême a	29	Umero	60
6	7	SRD	Fême a	22	Metatarso	180
7	10	SRD	Fême a	21	Umero	200
8	9	Rottweiler	Fême a	32	Rádio e ulna	60
9	5	Labrador	Macho	27	Fêmur	15
10	8	Rottweiler	Fême a	48	Umero	90
11	2	Labrador	Macho	31	Fêmur	100
12	7	SRD	Macho	14	Metatarso	300
13	5	Boxer	Macho	36	Tíbia e fíbula	80
14	9	Rottweiler	Fême a	36	Rádio e ulna	90
15	6	Rottweiler	Fême a	25	Fêmur	80
16	1	SRD	Macho	21	Rádio e ulna	400

17	9	S.Bernard o	Macho	65	Fêmur	90
18	3	G.Retrieve r	Macho	27	Tíbia e fíbula	200
19	10	SRD	Fême a	16	Umero	120
20	8	SRD	Fême a	19	Umero	40

SRD: Sem raça definida; **P.Alemão:** Pastor Alemão; **S.Bernardo.:** São Bernardo, **G.Retriever.:** Golden Retriever.

Por meio da avaliação dos dados de sobrevida, identificamos média de sobrevida global de 124 ± 106 dias para os pacientes. Ao segregar a média de sobrevida dos pacientes de acordo com o tratamento aplicado, a média de sobrevida dos pacientes que não receberam tratamento quimioterápico foi de 88 ± 72 dias, enquanto o grupo que fez uso de quimioterapia adjuvante a sobrevida média foi de $270 \text{ dias} \pm 101$ dias.

3.2 Avaliações histopatológicas

Como resultado histopatológico obteve-se 14 amostras de osteossarcoma subtipos osteoblástico, cinco do subtipo condroblástico e um subtipo telangiectásico (Figura 2 e Tabela 2).

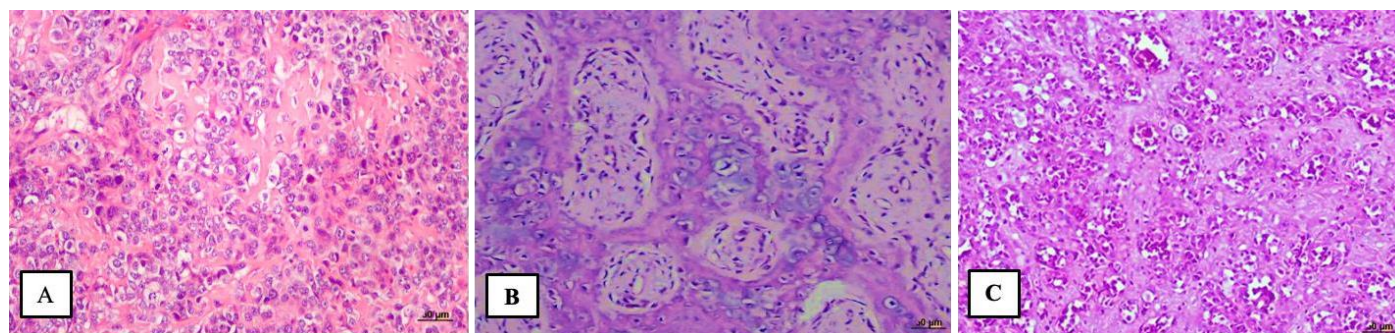


Figura 02. Osteossarcomas confirmados no exame histopatológico. **A.** Osteossarcoma osteoblástico **B.** Osteossarcoma condroblástico **C.** Osteossarcoma telangiectásico. Aumento 200x.

Tabela 02. Identificação dos os osteossarcomas de acordo com o subtipo histológico de cada amostra.

Amostra	Subtipo histopatológico
1	Osteoblástico
2	Osteoblástico
3	Osteoblástico
4	Condroblástico
5	Osteoblástico
6	Condroblástico
7	Osteoblástico
8	Osteoblástico
9	Osteoblástico
10	Osteoblástico
11	Condroblástico
12	Osteoblástico
13	Osteoblástico
14	Condroblástico
15	Osteoblástico
16	Osteoblástico
17	Osteoblástico
18	Osteoblástico
19	Condroblástico
20	Telangiectásico

Pode-se observar que existe diferença nítida entre os critérios de avaliação com os fragmentos da mesma amostra, ou seja, mesmo paciente. Inclusive esses achados indicam que a depender do fragmento analisado, a própria graduação histopatológica do osteossarcoma difere-se de acordo com a região coletada e processada (Tabela 3).

Tabela 03. Característica histopatológica de cada fragmento de cada amostra.

Amostra	Fragmen to	Matri z	Pleomorfis mo	Cariomega lia	Binucleaç ão	Necros e	Mitose (10 CGA)	Grau histopatológi co
1	1	2	2	1	1	3	1	3
	2	2	2	1	1	3	1	3
	3	2	2	2	1	3	2	3
	4	1	1	1	0	3	1	2
2	1	2	3	0	1	0	0	1
	2	2	2	0	0	0	0	1
	3	1	2	0	1	0	0	1
	4	1	3	0	1	0	0	1
3	1	2	3	0	1	3	3	3
	2	2	3	2	1	3	1	3
	3	1	3	2	1	3	1	3
	4	1	3	2	1	3	1	3
4	1	1	2	1	0	0	1	1
	2	1	2	1	1	0	1	1
	3	2	2	1	1	1	1	2
	4	2	2	1	0	1	1	2
5	1	2	3	2	1	3	1	3
	2	2	3	2	1	1	1	3
	3	2	3	2	1	1	1	3
	4	2	3	2	1	3	0	3
6	1	3	3	1	0	3	0	3
	2	2	3	1	0	3	0	2
	3	2	3	1	0	3	0	2
	4	2	3	2	0	3	0	3
7	1	2	3	2	1	0	0	2
	2	2	3	2	1	0	0	2
	3	3	3	2	0	0	0	2
	4	2	2	1	0	0	1	1

8	1	2	2	2	1	2	0	2
	2	2	3	2	1	2	2	3
	3	2	3	2	1	2	1	3
	4	2	3	2	1	2	0	3
9	1	2	2	2	1	3	0	3
	2	1	2	1	1	3	0	2
	3	1	2	1	1	2	0	2
	4	1	2	1	1	1	0	2
$\frac{1}{0}$	1	1	3	1	1	0	0	1
	2	1	3	1	1	0	0	1
	3	2	3	1	1	1	0	2
	4	1	3	1	1	0	0	1
$\frac{1}{1}$	1	1	1	0	1	1	0	1
	2	1	0	0	1	1	0	1
	3	2	2	1	0	0	0	1
	4	2	1	0	1	0	0	1
$\frac{1}{2}$	1	1	3	2	1	0	0	2
	2	1	3	2	1	1	0	2
	3	1	3	2	1	0	0	2
	4	2	3	2	1	0	0	2
$\frac{1}{3}$	1	2	3	1	1	2	0	2
	2	1	3	1	0	2	0	2
	3	2	3	1	1	2	0	2
	4	1	3	1	0	1	0	1
$\frac{1}{4}$	1	1	3	1	1	2	0	2
	2	1	2	1	1	2	0	2
	3	2	2	1	1	1	1	2
	4	1	2	1	1	1	0	1

1 5	1	1	1	1	0	3	2	2
	2	1	2	1	1	2	2	2
	3	1	2	1	1	1	2	2
	4	2	3	2	1	3	2	3
1 6	1	2	2	1	1	0	0	1
	2	2	2	1	1	0	0	1
	3	1	2	1	1	3	1	2
	4	1	2	1	1	3	1	2
1 7	1	1	2	1	1	0	1	1
	2	2	2	1	1	2	1	2
	3	1	3	1	1	3	0	2
	4	1	3	2	1	1	0	2
1 8	1	1	3	1	1	0	1	2
	2	2	3	1	1	1	1	2
	3	2	3	1	1	0	0	2
	4	1	3	1	1	0	0	1
1 9	1	1	2	2	1	2	1	2
	2	1	2	2	1	0	0	1
	3	1	2	1	1	3	0	2
	4	1	2	1	1	0	0	1
2 0	1	0	3	2	1	0	0	1
	2	0	3	2	1	0	0	1
	3	0	3	2	1	3	0	2
	4	0	3	3	1	3	0	3

3.3 Imunohistoquímica

Foram encontradas marcações negativas, além de diferentes escore de marcação e intensidade, em que foi possível visualizar entre as diferenças amostras, bem como diferença da própria amostra tumoral. As diferentes

marcações estão ilustradas na Figura 3.

Os resultados quantitativos da imunohistoquímica encontram-se na Tabela 4, em que o escore final pode ser visualizado concomitante ao escore de

marcação e intensidade.

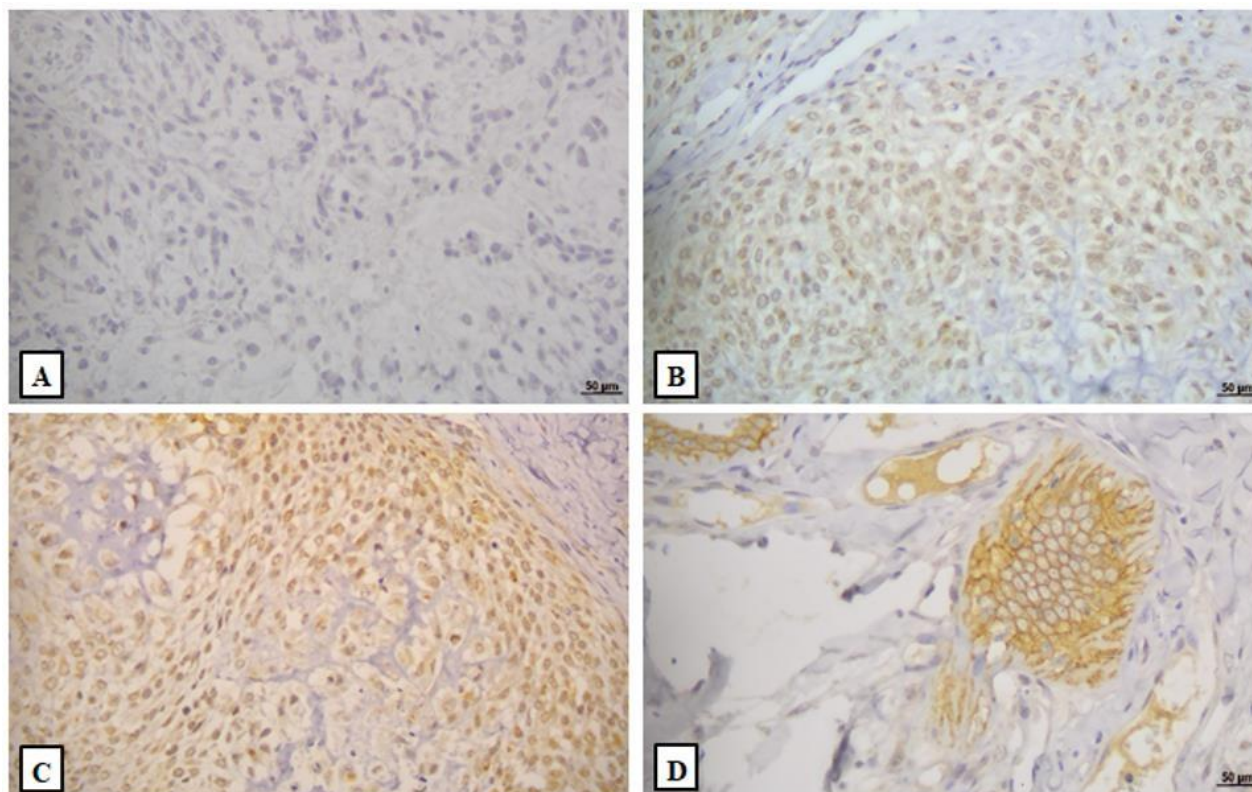


Figura 03. Diferentes escores de coloração do HER-2 em um osteossarcoma osteoblástico. **A.** Controle negativo. **B.** Marcação 1 de coloração. **C.** Marcação 2 de coloração. **D.** Marcação 3 de coloração. Aumento 200x.

Tabela 04. Característica imunohistoquímica de cada fragmento.

Amostra	Fragmento	Marcação HER-2	Intensidade HER-2	Escore HER-2
1	1	1	3	3
	2	1	3	3
	3	1	3	3
	4	1	3	3
2	1	0	0	0
	2	1	3	3
	3	3	3	9

	4	2	3	6
3	1	1	3	3
	2	2	3	6
	3	1	3	3
	4	2	3	6
4	1	1	3	3
	2	1	3	3
	3	1	3	3
	4	1	3	3
5	1	2	3	6
	2	1	3	3
	3	2	3	6
	4	3	3	9
6	1	1	3	3
	2	2	3	6
	3	2	3	6
	4	1	3	3
7	1	2	3	6
	2	1	3	3
	3	2	3	6
	4	1	3	3
8	1	2	3	6
	2	2	3	6
	3	2	3	6
	4	2	3	6
9	1	1	3	3
	2	1	3	3
	3	1	3	3
	4	1	3	3
10	1	1	3	3
	2	1	3	3
	3	1	3	3

	4	0	0	0
11	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	1	1	1
	4	1	1	1
12	1	2	3	6
	2	1	3	3
	3	2	2	4
	4	1	3	3
13	1	2	2	4
	2	1	2	2
	3	1	2	2
	4	1	2	2
14	1	2	3	6
	2	3	3	9
	3	3	3	9
	4	3	3	9
15	1	2	3	6
	2	2	3	6
	3	1	3	3
	4	2	3	6
16	1	1	3	3
	2	1	3	3
	3	1	3	3
	4	2	3	6
17	1	2	1	2
	2	2	2	4
	3	1	1	1
	4	1	1	1
18	1	1	1	1
	2	1	1	1
	3	1	1	1

	4	2	1	2
19	1	1	3	3
	2	1	3	3
	3	1	3	3
	4	1	3	3
20	1	2	3	6
	2	2	3	6
	3	3	3	9
	4	2	3	6

Os resultados referentes à marcação do HER-2 foram heterogêneos entre os diferentes fragmentos. Em algumas amostras, pode-se observar fragmentos de escore 0 (negativo), concomitante aos demais fragmentos com escore 3, .

3.4 Análise multivariada dos dados histopatológicos e da expressão de HER-2

As elipses no mapa perceptual apresentam uma separação dos dados na qual amostras classificadas em grau um de histopatologia localizaram-se no quadrante superior esquerdo, enquanto no quadrante inferior esquerdo e direito mostram-se aquelas classificadas com grau dois e três (Figura 4A). Pelas elipses construídas com os escores individuais, observou-se uma separação análoga na anterior, sendo que os três agrupamentos mostraram escores individuais diferentes entre si (Figura 4B).

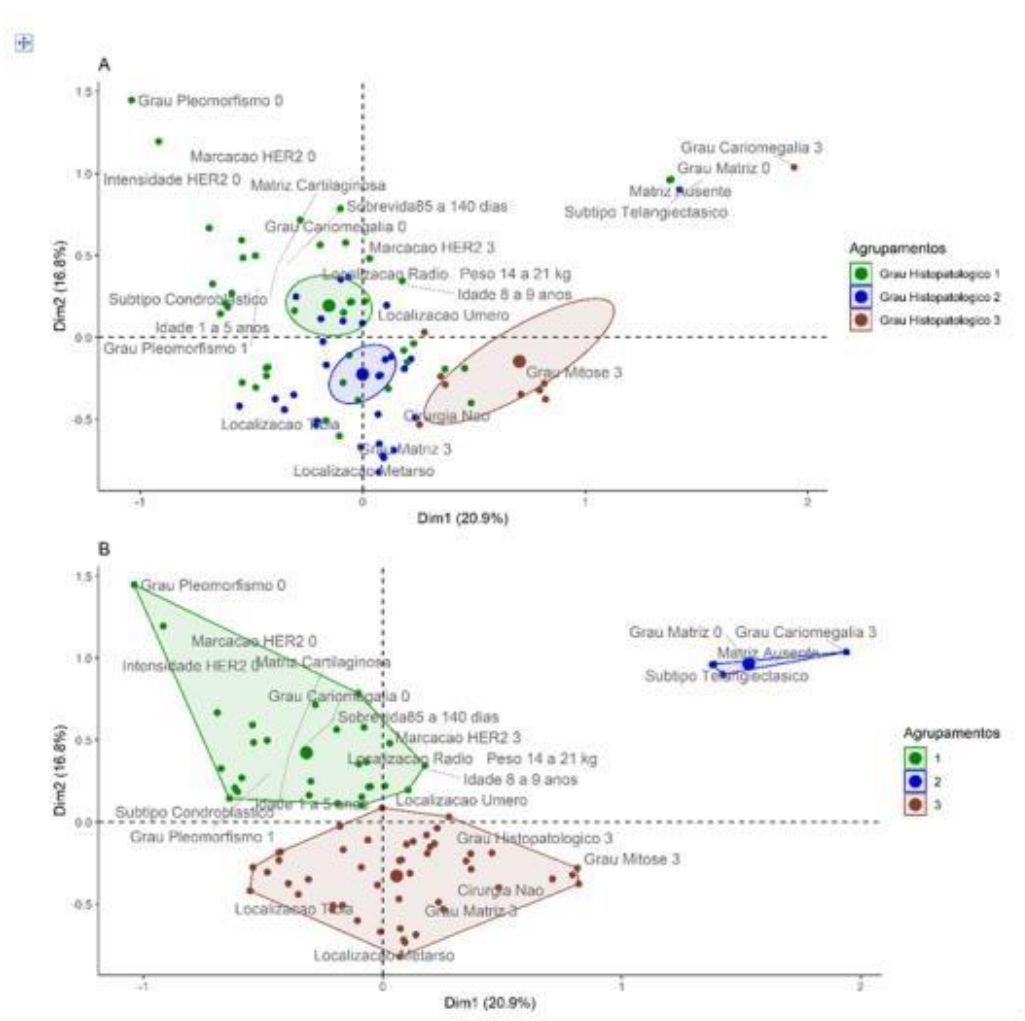


Figura 4: Mapa perceptual bidimensional da análise de correspondência múltipla com os achados qualitativos de HER-2, histopatológicos e perfil histórico do paciente. **A.** Elipseis confidentes baseadas no grau de histopatológico. **B.** Elipses convergentes com base na análise de agrupamento para três grupos feitos com os escores individuais da análise de correspondência múltipla.

A distribuição das categorias das variáveis qualitativas na tabela de Burt mostrou interdependências ($\chi^2 = 10912$; $p = 4,998^{-4}$). Pela análise dos resíduos padronizados e ajustados pela escala z-normal (Z) foi possível observar que o agrupamento 1 (verde em Figura 1B) mostrou interdependência com a localização tumoral no radio ($Z = 2,22$), subtipo condroblastoma ($Z = 4,22$), matriz cartilaginosa ($Z = 4,22$), grau zero de cariomegalia ($Z = 2,54$), grau um de histopatológico ($Z = 2,07$), escore zero ($Z = 2,22$) e três ($Z = 2,02$) para marcação de HER-2, escore zero para intensidade de HER-2 ($Z = 2,22$), a maior faixa de peso (de 36 a 65 kg;

$Z = 1,96$), uma sobrevida de 85 a 140 dias ($Z = 4,22$) e uma tendência de interdependência com grau um de necrose ($Z = 1,65$). O agrupamento 2 (azul em Figura 6B) guardou interdependência com neoplasia no úmero ($Z = 2,22$), subtipo telangiectásico ($Z = 8,51$), matriz ausente ($Z = 8,51$), grau zero de matriz ($Z = 8,51$), grau três de cariomegalia ($Z = 4,26$), idade de 8 a 9 anos ($Z = 3,02$), peso de 14 a 21 kg ($Z = 3,60$), sobrevida de 1 a 44 dias ($Z = 3,02$). Para o agrupamento

3 (vermelho em Figura 1B) observou-se interdependência com ausência de tratamento cirúrgico ($Z = 2,11$), subtipo osteoblástico ($Z = 2,22$), matriz óssea ($Z = 2,22$), idade de 5 a 8 anos ($Z = 2,05$) e peso de 21 a 28 kg ($Z = 2,58$). Esses resultados sugerem que a composição dos agrupamentos pode estar relacionada à gravidade da neoplasia, sendo o agrupamento 1 (verde) relacionado com maior sobrevida e menor cariomegalia, escore histopatológico, necrose e intensidade de HER-2.

Grau zero de intensidade de HER-2 guardou interdependência com grau zero para pleomorfismo ($Z = 4,26$), para cariomegalia ($Z = 4,13$), marcação de HER-2 ($Z = 8,51$) e sobrevida de 85 a 140 dias ($Z = 2,01$), bem como tendência para grau um de pleomorfismo ($Z = 1,80$) e localização no rádio ($Z = 1,80$). Intensidade de HER-2 grau um mostrou interdependência com tumor localizado no fêmur ($Z = 2,40$) e na tíbia ($Z = 3,29$) e idade de 1 a 5 anos ($Z = 3,15$), bem como tendência para sobrevida de 85 a 140 dias ($Z = 1,85$). Grau dois de intensidade de HER-2 mostrou interdependência com localização tumoral em tíbia ($Z = 4,40$), ausência de tratamento cirúrgico ($Z = 2,58$), grau dois de necrose ($Z = 3,08$), idade de 5 a 8 anos ($Z = 2,41$), peso de 36 a 65 kg ($Z = 2,41$) e sobrevida de 44 a 85 dias ($Z = 2,06$), enquanto a intensidade de HER-2 grau três mostrou nenhuma interdependência pela análise de Z . Em resumo, as interdependências supracitadas sugerem que intensidade baixa de HER-2 pode ter relação com pacientes mais jovens, localização em rádio, fêmur ou tíbia, menor pleomorfismo, cariomegalia e maior sobrevida, enquanto alta intensidade de HER-2 pode guardar relação com maior necrose, menor sobrevida, pacientes mais idosos e pesados.

A marcação de HER-2 grau zero mostrou interdependência com grau zero para pleomorfismo ($Z = 4,26$), cariomegalia ($Z = 4,13$) e com sobrevida de 85 a

140 dias ($Z = 2,01$), bem como tendência com localização em rádio ($Z = 1,80$) e grau um de pleomorfismo ($Z = 1,80$). Marcação de HER-2 grau um mostrou tendência de interdependência com grau dois para cariomegalia ($Z = 1,83$), necrose ($Z = 1,75$) e grau três de histopatológico ($Z = 1,71$). A marcação de HER-2 grau dois guardou interdependência com subtipo condroblástico ($Z = 2,06$), matriz cartilaginosa ($Z = 2,06$), bem como tendência com sobrevida de 44 a 85 dias ($Z = 1,67$). O grau três de marcação de HER-2 apresentou interdependência com idade de 8 a 9 anos ($Z = 2,06$) e tendência com a localização tumoral de rádio e ulna ($Z = 1,65$).

A lista de interdependências apresentadas acima aponta que marcação baixa de HER-2 pode ter relação com localização em rádio, menor pleomorfismo, cariomegalia e maior sobrevida, enquanto alta marcação de HER-2 pode estar relacionada com subtipo condroblástico, matriz cartilaginosa, localização radio e ulna, maior cariomegalia, necrose, escore histopatológico e menor sobrevida.

Não houve interdependência com os fragmentos 1, 2, 3 ou 4 de uma mesma amostra.

4. DISCUSSÃO

As doenças hereditárias são muito comuns nas espécies humana e canina, além de frequentemente apresentarem características semelhantes entre si, portanto os cães podem ser utilizados como modelos comparativos em estudos, inclusive aos relacionados à oncologia (STARKEY et al., 2005, ROWELL et al., 2011).

O aumento de investimentos veterinários, acrescido da maior expectativa de vida e valor afetivo desses animais, são alguns dos fatores que corroboram para o estudo em oncologia comparada e a participação de cães em ensaios clínicos, cenário que pode favorecer a compreensão e tratamento de doenças na espécie humana e canina (PINHO et al., 2012, KRAUS et al., 2013). O desenvolvimento dessa área representa extrema importância, uma vez que o câncer é a principal causa de mortalidade em cães, seguido de traumas, doenças locomotoras e, por fim, neurológicas (BONNETT et al., 2005).

O osteossarcoma é a neoplasia óssea primária mais comum em cães e representa cerca de 90% de todos os tumores ósseos que essa espécie pode desenvolver (BRODEY et al., 1969), e o esqueleto apendicular apresenta maior ocorrência (STARKEY et al., 2005), desse modo essa neoplasia com essa localização específica foi priorizada na pesquisa.

De acordo com a literatura (RU et al., 1998), observa-se maior incidência em raças de porte grande e gigante, e essa informação corrobora com os achados clínicos dos animais inclusos nesse projeto, uma vez que a maior parte dos animais são de porte grande. Em relação à faixa etária, a maioria dos cães acometidos, segundo a literatura, tem em média sete anos (BRODEY et al., 1969), e nesse estudo pode-se perceber que apesar da variação de idade, a média também foi de sete anos.

Houve variação racial entre os pacientes estudados, porém a raça Rottweiler, que é descrita com alta frequência diagnóstica dessa neoplasia, foi a segunda raça mais comum (SHAPIRO et al., 1988), esse resultado pode ser justificado pelo fato de no Brasil haver muitos cães sem raça definida, e proporcionalmente podem ser mais prevalentes em várias patologias. Além disso, os membros torácicos apresentaram maior acometimento do que os pélvicos totalizando mais de 50% dos casos desse estudo e corroborando com a literatura (MAULDIN et al., 1988). A sobrevida dos animais apresentou-se de acordo com a literatura em que casos associados tratamento cirúrgico à quimioterapia apresentaram sobrevida mais alta (CHUN & LORIMIER, 2003).

Histologicamente, o osteossarcoma é considerado uma neoplasia mesenquimal maligna e pode ser classificado em diferentes subtipos de acordo com as características morfológicas e diferenciação celular presentes no tecido, e no caso de formação de matriz, podem ser osteoblásticos, fibroblásticos, condroblásticos e telangiectásicos. Os subtipos são determinados de acordo com características morfológicas e diferenciação celular (THOMPSON & POOL, 2002). Nessa avaliação pode-se perceber que algumas amostras de osteossarcomas apresentaram mais de um tipo de matriz, mas foi considerada a de maior

prevalência para definição do subtipo, sendo o mais prevalente o osteoblástico, dado também comum com a literatura (FENGER et al., 2014).

Os achados condizem com a heterogeneidade da doença, inclusive a diferença das características histopatológicas dos fragmentos da mesma neoplasia foram extremamente notáveis, por isso um dos focos da pesquisa foi a avaliação intra e inter-tumoral. Entretanto, devido à heterogeneidade do escore final de HER-2 optou-se por realizar as correlações utilizando os escores de marcação e coloração separadamente.

Não há um consenso na literatura sobre o alto grau histológico estar relacionado a um pior curso clínico da doença ou pior prognóstico (KLEIN & SIEGAL, 2006), apesar de em humanos a graduação ser extremamente importante para o prognóstico (RIGHI et al., 2015). Porém, pelas associações encontradas entre as características clínico-patológicas e marcação de HER-2 nessa pesquisa, a graduação histopatológica mostrou-se um critério relevante.

Sobre a graduação histopatológica foi possível dividir os grupos de acordo com os escores totais. O grau histopatológico 1 apresentou interdependência com osteossarcoma em rádio e ulna, corroborando com a literatura, pois não está associado a localizações com pior prognóstico (HAMMER et al., 1995), subtipo condroblástico, que não tem relação com um pior prognóstico (HAMMER et al., 1995), grau 0 de cariomegalia, escore 0 e 3 de HER-2. Sugere-se que a discrepância do escore de HER-2, seja pela própria heterogeneidade apresentada pelos resultados das análises dos fragmentos em uma mesma amostra. Além disso, apresentou interdependência com maior tempo de sobrevida livre e grau 1 de necrose, característica mais evidente em neoplasias com crescimento rápido uma vez que nessa condição há deficiência na oxigenação e nutrição das células neoplásicas, com consequente necrose tecidual, que normalmente são associados a tumores com pior prognóstico (WIEMAN et al., 1988).

O grau histopatológico 2 apresentou interdependência com localização umeral, achado que corrobora com a literatura, pois esse tipo de neoplasia apresenta pior prognóstico (BERGMAN et al., 1992), além de subtipo telangiectásico, que é considerado o subtipo mais agressivo entre as

classificações (HAMMER et al., 1995), grau 0 de matriz, possivelmente pelo fato do subtipo telangiectásico ser pouco produtivo, além de grau 3 de cariomegalia, fato que explica graduação histopatológica mais alta. Além disso, animais idosos, com peso intermediário e sobrevida curta, foram encontrados nesse grupo também, considerando as características descritas anteriormente um prognóstico ruim é justificável nesse grupo.

Por fim, o agrupamento de escore histopatológico 3 obteve interdependência com subtipo osteoblástico, que apesar de não ser descrito como fator prognóstico para o osteossarcoma, a maior parte das amostras era desse subtipo, fato que pode justificar a correlação dele com o maior grau histopatológico. Além de pacientes com idade intermediária e maiores pesos também serem relacionados nesse grau histopatológico, concordando com a literatura em dados que animais mais jovens e mais pesados podem apresentar pior prognósticos (BERGMAN et al., 1992; SPODNICK et al., 1992).

Esses resultados sugerem que a composição dos agrupamentos pode estar relacionada à gravidade da neoplasia, sendo o agrupamento de grau histopatológico 1, relacionado com maior sobrevida, menor grau de cariomegalia, necrose e intensidade de HER-2.

Através das análises estatísticas, a baixa intensidade de coloração do HER-2 possui interdependência com pacientes mais jovens, localização em rádio e ulna, fêmur ou tibia, características histopatológicas menos agressivas (no caso, menor pleomorfismo e cariomegalia) e maior sobrevida. Esses achados corroboram com a literatura em relação à localização anatômica do osteossarcoma, uma vez que osteossarcoma localizados principalmente em úmero são considerados de pior prognóstico, não havendo correlação direta com rádio e ulna (BERGMAN et al., 1992). Além disso, neoplasias que apresentam menor cariomegalia e pleomorfismo, normalmente corroboraram com melhor prognóstico.

No entanto, normalmente pacientes jovens cursam com pior desfecho (SPODNICK et al., 1992), portanto essa informação foi um resultado diferente do que a literatura relata, pois os pacientes jovens apresentaram maior sobrevida, porém, nosso resultado pode estar relacionado a outros fatores, como ao

diagnóstico precoce da doença, que conseqüentemente, influencia em um melhor prognóstico.

A alta intensidade de HER-2 pode guardar relação com maior grau de necroses, menor sobrevida, pacientes mais idosos e pesados. Em relação a esses resultados, temos que a presença de necrose pode estar relacionada a neoplasias com crescimento mais rápido. O porte e peso do animal são considerados fatores prognósticos para o osteossarcoma, pois quanto mais pesado, normalmente pior o prognóstico (BERGMAN et al., 1992). Apesar de pacientes jovens ser um fator importante para o osteossarcoma, nesse caso é possível visualizar que pacientes mais idosos obtiveram maior intensidade de HER-2, mas não necessariamente o maior escore de marcação, o que pode ser uma interpretação para esse resultado.

Referente ao escore de marcação do HER-2, o grau 0 de marcação, ou seja, células negativas para esse receptor apresentou interdependência com grau 0 para pleomorfismo e cariomegalia, achados normalmente presentes em neoplasias de baixo grau histopatológico, além de localização em rádio e ulna e sobrevida de até 140 dias, ou seja, o HER-2 negativo pode estar relacionado a características clínicas e histopatológicas menos agressivas.

No escore de marcação 1 positivo para HER-2, houve tendência de interdependência para grau 2 de cariomegalia e graduação 3 de histopatológico, indicando presença em tipos histológicos mais agressivos. Ainda foi relacionado com o subtipo condroblástico e menor sobrevida, diferente do que constatamos na literatura, em que o subtipo que pode ser um fator prognóstico é o telangiectásico (HAMMER et al., 1995), porém como observado há apenas uma amostra desse subtipo, fato que pode fundamentar esse resultado.

Enquanto que a marcação de HER-2 grau 2 também mostrou interdependência com o subtipo condroblástico e tendência para uma menor sobrevida, evidenciando a relação de escore de HER-2 com sobrevida mais curta.

Já o comportamento da marcação HER-2 grau 3 apresentou um comportamento atípico do esperado em relação aos dados anteriores da literatura, pois animais idosos (SPODNICK et al., 1992) apresentaram maior marcação e a localização anatômica também não condiz com os dados já consolidados

(HAMMER et al., 1995), mas o osteossarcoma apresentou grande diversidade entre as características clínicas dos pacientes, além de heterogeneidade extrema entre os próprios fragmentos de uma mesma amostra, situação que pode corroborar para esses achados.

As interdependências descritas mostram que marcação baixa de HER-2 pode ter relação com localização em rádio, menor pleomorfismo e cariomegalia, e maior sobrevida, enquanto alta marcação de HER-2 pode estar relacionada com subtipo condroblástico, matriz cartilaginosa, localização rádio e ulna, maior grau de cariomegalia, necrose e escore histopatológico, além de menor sobrevida.

Atualmente o tratamento de eleição do osteossarcoma para espécie canina é a amputação do membro acometido, que é associado à quimioterapia (MORELLO et al., 2011, SELMIC et al., 2014). O protocolo de quimioterapia de eleição é o uso da doxorubicina e/ou carboplatina, mas esses fármacos utilizados sozinhos ou em associação, não apresentam diferença significativa entre intervalo livre de doença ou sobrevida em cães (SELMIC et al., 2014). Portanto, no atual cenário dessa doença, mesmo com a intervenção cirúrgica e quimioterápica, os animais vão a óbito em aproximadamente um ano (SELMIC et al., 2014), demonstrando a relevância de pesquisar e encontrar novas terapias para prolongar a sobrevida dos pacientes (KHANNA et al., 2014).

O lapatinibe inibe a via de sinalização e fosforilação do HER-2 (SPECTOR et al., 2005, RUSNAK et al., 2001), com consequente inibição da proliferação das células cancerígenas em humanos (KALOUS et al., 2012). Esse fármaco já foi avaliado no uso de culturas de carcinomas de células de transição de bexiga de cães, através da avaliação do efeito antitumoral e inibição da proteína HER-2 (SAKAI et al., 2018).

5. CONCLUSÃO

Os trabalhos que envolvem presença de HER-2 em osteossarcoma não avaliam a heterogeneidade intra-tumoral, e através dos nossos resultados foi possível perceber que existe grande variação entre os fragmentos de uma mesma amostra, e isso deve ser considerado para perspectivas futuras e definições de

novos protocolos quimioterápicos, pois principalmente a diferença de escore de HER-2 encontrado em uma mesma amostra, pode não contemplar o todo.

REFERÊNCIAS

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

BERGMAN, P.J.; MACEWEN, E.G.; KURZMAN, I.D.; et al. Amputation and carboplatin for treatment of dogs with osteosarcoma: 48 cases (1991 to 1993). *J Vet Intern Med.* v.10, n.2, pp.76–81, 1992.

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

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

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

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

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

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

FENGER, J.M.; LONDON C.A.; KISSEBERTH, W.C. Canine osteosarcoma: a naturally occurring disease to inform pediatric oncology. *ILAR J.* v.55, n.1, pp.69-85, 2014.

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

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

KHANNA; C., FAN, T.M.; GORLICK, R; HELMAN, L.J.; et al. Toward a drug development path that targets metastatic progression in osteosarcoma. *Clin Cancer Res.* v.20, n.16 pp.4200–4209. 2014.

KLEIN, M.J.; SIEGAL, G.P. Osteosarcoma: anatomic and histologic variants. *Am J Clin Pathol.* v.125, n.4, pp.555-81, 2006.

KRAUS, C.; PAVARD, S.; PROMISLOW, D.E.L. The size-life span trade-off decomposed: Why large dogs die young. *Am Nat.* v.181, n.4, pp.492–505, 2013

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RIGHI, A; GAMBAROTTI,M; LONGO, S; BENINI, S, et al. Small Cell Osteosarcoma Clinicopathologic, Immunohistochemical, and Molecular Analysis of 36 Cases. *Am J Surg Pathol*. V. 39, n.5, pp.691-699, 2015.

ROWELL, J.L.; MCCARTHY, D.O.; ALVAREZ, C.E. Dog models of naturally occurring cancer. *Trends Mol Med*. v.17, n.7, pp.380–388, 2011.

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

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

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

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

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

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

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

STARKEY, M.P.; SCASE T.J.; MELLERSH C.S.; et al. Dogs really are man's best friend - canine genomics has applications in veterinary and human medicine!. *Brief Funct Genomic Proteomic.* v.4, n.2, pp. 112–128, 2005.

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

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

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

WIEMAN, T.J.; MNAG, T.S.; FINGAR, V.H.; HILL; et al.. Effect of photodynamic therapy on blood flow in normal and tumor vessels. *Surgery*, v.104, n.9, p.512-7, 1988.

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

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

ARTIGO II*

Artigo a ser submetido para o periódico –*Pharmaceutics*II

As normas podem ser verificadas em:

<https://www.mdpi.com/journal/cancers/instructions>

**Establishment and characterization of a canine osteosarcoma cell line and
characterization of antitumor response against lapatinib**

M.S. Franzoni¹, P. F. Lainetti¹, A. F. Leis-Filho¹, R. Laufer-Amorim², T. O. Silva, C.
L. G. D. Benevenuto, C.E. Fonseca-Alves^{1,3*}

¹Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University – UNESP, Botucatu-SP, Brazil.

²Department of Veterinary Clinic, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University – UNESP, Botucatu-SP, Brazil.

³Institute of Health Sciences, Paulista University – UNIP, Bauru-SP, Brazil.

*Correspondece: Carlos E.Fonseca-Alves, e-mail: carlos.e.alves@unesp.br

RESUMO

O osteossarcoma é um tumor mesenquimal maligno mais diagnosticado em cães e mesmo com as terapêuticas propostas atualmente, que envolvem amputação do membro acometido associado à quimioterapia, o prognóstico é desfavorável, associado à baixa sobrevida. Estudos modernos demonstram a presença do HER-2, um receptor de tirosina quinase nessa neoplasia, e essa positividade está relacionada a um pior prognóstico, portanto novas terapias alvo no intuito de bloquear essa via de sinalização se fazem necessárias na tentativa de melhorar o curso clínico da doença. Para realização desse trabalho foram coletados seis osteossarcomas canino, sendo quatro fragmentos de cada tumor, com o objetivo de caracterizá-los, avaliar a diferença entre as respostas e marcações dos fragmentos de uma mesma neoplasia, e por fim observar a resposta de viabilidade celular entre a Doxorubicina e Lapatinibe, um inibidor da via HER-2. Foi possível caracterizar apenas uma linhagem tumoral, porém a dose do Lapatinibe foi inferior a Doxorubicina nas mesmas condições para o resultado do IC50.

Palavras chaves: heterogeneidade, osteossarcoma, tirosina quinase.

1. INTRODUÇÃO

Em humanos, o osteossarcoma acomete em torno de 800 pessoas por ano nos Estados Unidos, e devido a menor incidência de diagnóstico em relação a outras neoplasias mais comuns, proporcionalmente, o investimento para pesquisas apresenta-se de forma menos eficiente, e esse cenário é comum há mais de 30 anos (SIEGEL et al., 2013). É uma doença comum entre pessoas jovens, sendo considerada uma neoplasia pediátrica importante. Devido à importância dessa neoplasia em crianças, é um tema de pesquisa estudado Children's Oncology Group (HINGORANI et al., 2022).

É um tumor que tem indicação primária de cirurgia, no entanto, em diferentes casos, o paciente pode desenvolver metástases, fazendo necessária a realização de terapia adjuvante (HINGORANI et al., 2022, MISAGHI et al., 2018). Além da cirurgia, a quimioterapia neoadjuvante é indicada para esses pacientes.

Antes da associação da quimioterapia neoadjuvante, a taxa de mortalidade dos pacientes era 20% maior, com isso, a melhor opção terapêutica para os pacientes é a associação da quimioterapia e a cirurgia (MISAGHI et al., 2018). Neste contexto, o estudo de diferentes protocolos quimioterápicos em modelos animais é essencial para melhor abordagem dos pacientes humanos. E dentre esses modelos, pode-se destacar o osteossarcoma em cães (JARVIS et al., 2021).

Em cães o osteossarcoma pode ocorrer em uma incidência de 30 a 50 vezes maior que em humanos (ANFENSEN et al., 2011), e a apresentação clínica, característica biológica e protocolo terapêutico são semelhantes entre as duas espécies (FENGER et al., 2014, FAN & KHANNA, 2015), inclusive a similaridade em relação ao sítio metastático, em que o órgão de maior prevalência é pulmão, seguido de tecidos moles e por fim outros ossos (KENT et al., 2004, PHILLIPS et al., 2009).

As raças de grande porte e animais de meia idade são os mais acometidos pelo osteossarcoma (RU et al., 1998), e apresentação clínica mais prevalente é esqueleto apendicular, em que os membros torácicos são mais acometidos do que os membros pélvicos (STRAW et al., 1990). O diagnóstico inclui exame físico,

biópsia (BERG, 1996), e exames de imagem, que devem ser utilizados também para descarte de metástase pulmonar (ENDICOTT, 2003).

O tratamento preconizado para o osteossarcoma é a realização de excisão cirúrgica associada a protocolo quimioterápico, e os fármacos mais utilizados são Doxorubicina ou Carboplatina (STRAW et al., 1990). Quando utilizado apenas o procedimento cirúrgico isolado, a sobrevida média varia em torno de quatro meses (SPODNICK et al., 1992), mas quando associado protocolos quimioterápicos, a sobrevida dos animais aumenta para cerca de um ano (CHUN & LORIMIER, 2003), e não há diferença significativa entre o intervalo livre de doença ou sobrevida em cães que são submetidos aos protocolos com apenas doxorubicina ou carboplatina, ou a combinação delas (SELMIC et al., 2014).

Apesar de haver modelos de estudos em camundongos, essa espécie não é capaz de reproduzir a verdadeira heterogeneidade ou distúrbios imunológicos presentes em pacientes caninos e humanos diagnosticados com osteossarcoma, tal condição pode ser exemplificada pela própria progressão metastática da doença, pois em camundongos esse mecanismo é pouco compreendido e estudado (RANGARAJAN & WEINBERG, 2003, GUIJARRO et al., 2014). Dessa

forma, o cão pode ser considerado um ótimo modelo para a oncologia comparada, e possibilitar avanços em técnicas cirúrgicas, modelos terapêuticos, em que a espécie humana também se beneficiaria (MASON, 2020).

Neste contexto, é importante ressaltar o modelo canino como um modelo de doença espontânea, e não induzida laboratorialmente. Com isso, têm-se cães pertencentes a tutores, que são levados ao atendimento veterinário. Nesses animais, não seria ético realizar testes clínicos sem evidências pré-clínicas da eficácia de uma terapia específica (FONSECA-ALVES et al., 2021). E dentre os modelos pré-clínicos, o modelo de cultura celular é um dos mais utilizados. A cultura celular pode ser utilizada com o objetivo de elucidar o efeito de drogas, genes importantes em determinada população neoplásica, melhor compreensão do mecanismo tumoral, e conseqüentemente, auxiliar a evolução terapêutica tanto para animais quanto para os humanos (RUGGERI et al., 2014).

Atualmente há estudos de extrema importância sobre a superexpressão de HER-2 em osteossarcomas humanos e caninos (MASON et al., 2016, STROUD et al., 2016), ele faz parte da família de fator de crescimento epidérmico, além de ser um receptor de tirosina quinase (WARREN et al., 2006). Em osteossarcoma caninos esse receptor também pode ser associado à baixa resposta quimioterápica e menor sobrevida global (ZHOU et al., 2003, RAINUSSO et al., 2012). A ativação de HER-2 proporciona sinal para diferenciação celular, migração e angiogênese, portanto o bloqueio desta via pode ser promissora para o prognóstico dos pacientes (LOIBL e GIANNI, 2017).

O Lapatinibe inibe a via de sinalização e fosforilação do HER-2 (SPECTOR et al., 2005, RUSNAK et al., 2001), com consequente inibição da proliferação das células cancerígenas em humanos (KALOUS et al., 2012). Portanto, é um fármaco com potencial antineoplásico nos osteossarcomas caninos.

O objetivo desse estudo foi estabelecer e caracterizar uma nova linhagem de osteossarcoma canino e avaliar sua resposta antimetabólica *in vitro* à Doxorubicina e ao Lapatinibe.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coletas das amostras para cultura celular

Trata-se de um estudo prospectivo, não randomizado incluindo cães com diagnóstico prévio de osteossarcoma (por citologia ou biópsia óssea) apendicular, submetidos à cirurgia de amputação de membro. A realização desse estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética de Utilização de Animais — UNESP Botucatu (Protocolo CEUA 0035/2020).

Foram coletadas amostras de pacientes submetidos ao procedimento cirúrgico no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP — Campus Botucatu. Como os pré-requisitos, foram utilizados apenas cães com osteossarcoma em esqueleto apendicular, com diagnóstico citológico ou histopatológico prévio, associado ao exame radiográfico

sugerindo a presença do osteossarcoma. Foram excluídos pacientes que receberam alguma terapia quimioterápica prévia.

Com o objetivo de padronizar as coletas e garantir o banco de dados de cada amostra, primeiramente foi realizado registro fotográfico e anotações descritivas das características macroscópicas de cada tumor, sendo os critérios considerados: localização e presença de áreas necróticas ou hemorrágicas. Para a coleta dos fragmentos se preconizou áreas em que o tecido não apresentava sinais de necrose ou hematomas, para evitar material comprometido nas avaliações posteriores (Figura 01 A). Após a etapa descritiva, a coleta era iniciada com incisão cutânea utilizando bisturi número 04 e lâmina número 24, seguida de divulsão do tecido subcutâneo com tesoura Metzembau para visualização da massa tumoral completa (Figura 01 B).

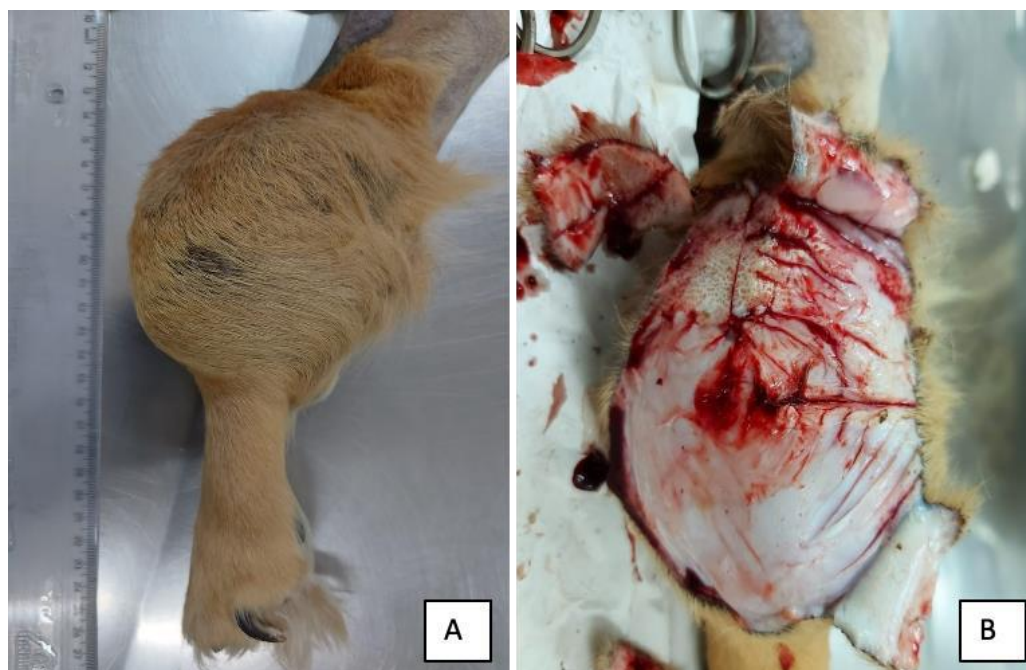


Figura 01. Osteossarcoma canino localizado em rádio e ulna distal do membro torácico esquerdo. **A.** Visualização de aumento de volume em região de rádio e ulna. **B.** Visualização do tumor após divulsão do tecido subcutâneo para coleta dos fragmentos tumorais.

Foram priorizados fragmentos com dois centímetros de extensão, que em seguida foram divididos, sendo uma parte designada para a cultura celular e a outra para exame histopatológico, com objetivo de obter-se confirmação definitiva do diagnóstico, subtipo histológico e avaliação do tecido de forma geral.

2.2 Exame histopatológico

Para a avaliação histopatológica as amostras de osteossarcomas coletadas, foram fixadas em formalina tamponada a 10% durante 48 horas, e em seguida, passadas para o álcool 70%. Não houve necessidade de utilizar descalcificador, pois todos os tecidos ósseos coletados apresentavam consistência macia, provavelmente devido ao infiltrado neoplásico e lise óssea que o osteossarcoma causa.

Optou-se por manter os fragmentos por 48 horas para adequada fixação, pois períodos inferiores não foram suficientes e períodos mais longos não agregaram melhora ao material.

Posteriormente, essas amostras foram processadas e incluídas em parafina. Em seguida, todas foram cortadas na espessura de 4µm em micrótomo, distendidas em lâminas próprias para microscopia, coradas por hematoxilina e eosina e montadas com resina, para visualização em microscópio óptico.

A avaliação histopatológica foi usada para confirmação do diagnóstico e definição do subtipo do osteossarcoma, além de avaliação das características histopatológicas de cada um dos quatro fragmentos de uma amostra.

Na avaliação histopatológica os quatro fragmentos de cada amostra foram avaliados da mesma forma, de modo que, além da determinação do subtipo do osteossarcoma, também foram consideradas as seguintes características: quantidade de matriz, quantidade de necrose, pleomorfismo nuclear, tamanho nuclear, número de núcleos e número de mitose em cada fragmento.

2.3 Imunohistoquímica

Para realização da imunohistoquímica, os blocos de parafina foram cortados em micrótomo com espessura de 3µm e distendidos em lâminas próprias

para imunohistoquímica (StarFrost, Knittel, Braunschweig, Alemanha). As lâminas foram transferidas para estufa com temperatura entre 55°C por 24 horas, e em seguida, para cubas de vidro vertical para realização da desparafinização. A recuperação antigênica foi realizada em panela de pressão (Pascal, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA) com solução de citrato pH 6.0, e o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado a partir de uma solução a 8% de peróxido de hidrogênio a 30 volumes (Dinâmica) em metanol absoluto (Dinâmica), durante 20 minutos. Após esta etapa, procedeu-se com o bloqueio de reação inespecífica com solução de leite desnatado em pó a 8% durante uma hora, em estufa com temperatura de 27°C. A incubação do anticorpo primária, foi feita com o mouse monoclonal anti-HER-2 (Dako cytomation, Carpinteria, CA, USA), na diluição de 1:100.

A identificação do anticorpo foi obtida pelo sistema de polímero (Horseradish Peroxidase — HRP) e o 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) como cromógeno (NUOVO et al., 2016), e os cortes foram contra corados com Hematoxilina de Harris, posteriormente, desidratados, montados com resina e observados em microscópio óptico.

Para o controle positivo considerou-se três amostra de um carcinoma mamário sabidamente positivo para os três tipos diferentes de marcações de HER-2, e para o controle negativo, foi substituído o anticorpo primário por solução tampão TRIS (pH: 7,4).

A avaliação da expressão do HER-2 foi realizada para cada fragmento das amostras e foi baseada no escore de marcação de membrana plasmática de células neoplásicas, que podia variar entre 1 (<10% de células marcadas), 2 (10 a 50% de marcação) e 3 (acima de 50% de marcação), concomitante ao escore de intensidade de marcação (1: fraca, 2: moderada, 3: forte). A pontuação final de marcação HER-2 foi obtida a partir da multiplicação do escore de marcação com o escore de intensidade (MASON et al, 2016). Além disso, foi preconizado visualização de 10 campos diferentes no corte histopatológico.

2.4 Cultura celular

2.4.1. 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). Além disso, foi utilizado meio para cultivo celular *Meio DMEM/HAMS F12 Com L-Glutamina E HEPES (3,5g/L)* (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), soro fetal bovino (SFB, LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), Tripsina 0,25% (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) e solução antibiótica/antimicótica (TermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA).

2.4.2 Cultivo celular

Após a coleta das amostras e identificação realizadas no Serviço de Patologia da UNESP Botucatu, os fragmentos tumorais foram seccionados dentro do fluxo laminar em fragmentos menores com lâmina de bisturi número 24 sobre uma placa de Petri estéril, em seguida lavados com meio de cultivo *DMEM/HAMS F12 Com L-Glutamina E HEPES (3,5g/L)* (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), acrescidos de 5% de soro fetal bovino (SFB) (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) e 1% de solução antibiótica/antimicótica (TermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA).

Em seguida foi adicionado aos fragmentos cortados collagenase do tipo IV (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), e o conjunto de fragmento, collagenase e meio foi colocado em uma garrafa de 25cm² na estufa a 37°C por três horas, sendo que cada fragmento do osteossarcoma foi dissociado e armazenado em garrafas distintas para evitar contaminação celular cruzada de um fragmento com outro. Após esse período, o conteúdo foi filtrado (colador celular 40µm Falcon® estéril), as porções sólidas retidas no filtro foram descartadas e o conteúdo líquido centrifugado (1800 RPM durante cinco minutos) e o sobrenadante descartado, esse processo foi realizado duas vezes para garantir maior limpeza da amostra.

Seguida a etapa de centrifugação, o *pellet* foi ressuspenso em meio de

cultivo *DMEM/HAMS F12 Com L-Glutamina E HEPES (3,5g/L)* (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), acrescido de 5% de soro fetal bovino (SFB) (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) e 1% de solução antibiótica/antimicótica (TermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA) e colocado em uma garrafa de 25cm², iniciando assim a passagem zero (P0). As garrafas foram mantidas em estufa úmida a 5% de CO₂ e 37°C, em uma concentração de 10⁴ células/mL.

Após a expansão inicial das células, permanecendo na garrafa por no mínimo 72 horas, parte das amostras foram criopreservadas 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.

2.4.3 Expansão das culturas primárias

Para iniciar os experimentos, as células de osteossarcoma foram expandidas até ao menos a quinta passagem. Para realizar a passagem, as células precisavam apresentar confluência de pelo menos 70% (Figura 02), essas foram avaliadas a cada 48 horas e o meio trocado completamente nessa frequência também. Após atingir a confluência esperada, foi realizada a passagem, sendo que células que inicialmente estavam em uma garrafa de 25cm² foram realocadas para uma garrafa de 75cm² e as que estavam em uma garrafa de 75cm² foram divididas para outras duas garrafas de 75cm².

Esse procedimento foi realizado da seguinte forma: o meio antigo era retirado da garrafa e as células eram lavadas com *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) duas vezes e, após descarte do DPBS, tripsina-EDTA 0.25% (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) foi adicionada e as células, que foram eram incubadas em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C durante cinco minutos, dessa forma as células soltavam-se da garrafa.

Por fim a tripsina foi inativada com meio de cultivo *DMEM/HAMS F12 Com L-Glutamina E HEPES (3,5g/L)* (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), acrescidos de 5% de soro fetal bovino (SFB) (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) e 1% de solução antibiótica/antimicótica (TermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA), o

material celular foi dividido para continuar a expansão das células até atingirem a passagem desejada.

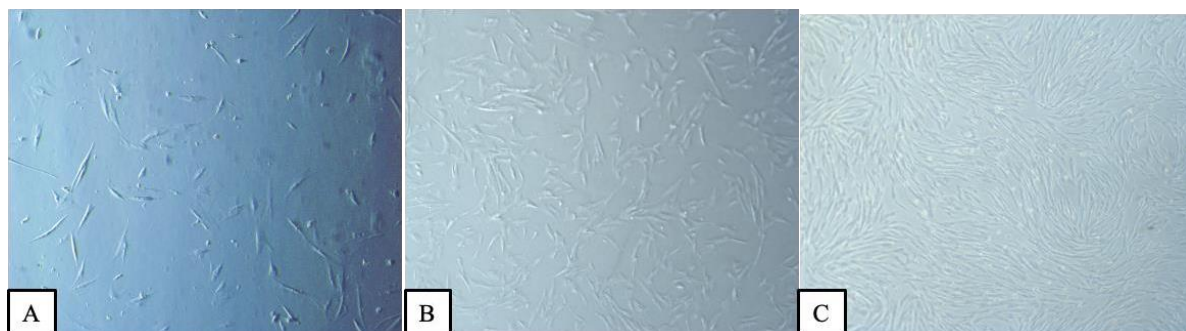


Figura 02. Diferentes porcentagens de confluência da célula OSA8 4. **A.** Confluência menor que 70%. **B.** Confluência 70%. **C.** Confluência Maior que 70%. (Aumento 50x).

2.4.4 Avaliação da tumorigenicidade

Para avaliação da tumorigenicidade das culturas, foi realizado experimentos de xenotransplantes destas em camundongo *nude* (BALB/c nude, linhagem C.Cg-Foxn1nu, Protocolo CEUA 0094/2021). Os camundongos foram adquiridos do biotério de matrizes da Universidade de São Paulo (USP) e mantidos no biotério da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina (FMB), UNESP. O xenotransplante heterotópico foi realizado de acordo com o previamente descrito por Duarte et al. Os animais foram avaliados três vezes por semana, por um período de 90 dias.

2.4.5 Análise morfológica das células por coloração de Hematoxilina

Primeiramente a placa de 12 poços foi preparada associada a uma lamínula circular ao fundo de cada poço, após esse processo foi adicionado 100 000 células e 500 μ L de meio de cultura completo por poço. Passado o período de 72 horas associado a uma confluência celular maior que 50%, o meio de cultura foi retirado de cada poço, as células lavadas três vezes com DPBS (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e fixadas por 30 minutos com metanol absoluto, em uma temperatura a 4°C. Seguido desse processo, foi novamente realizado três

lavagens com DPBS (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e as células foram imersas em solução Triton-X 0,1% durante 10 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas três vezes com DPBS (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e coradas com hematoxilina por 15 minutos, seguido de dois minutos em eosina. .

2.4.6 Análise matriz óssea

Para essa etapa, todo o processo de montagem da placa e fixação das células foi realizada como descrito no tópico 2.4.5, e após as últimas lavagens com DPBS (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) foi adicionado um mL da solução de Vermelho de Alizarina (Alizarin Red), que cora em vermelho áreas de mineralização ricas em cálcio. Após 30 minutos, os poços contendo a solução de Alizarina foram lavados novamente com DPBS (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), e após secagem dos mesmos em temperatura ambiente, foram obtidas imagens de cada poço com sistema de câmera digital acoplado ao microscópio de luz invertida.

2.4.7 Ensaio MTT

Para avaliar a toxicidade in vitro da Doxorrubicina e Lapatinibe foi realizado o ensaio MTT para determinar o melhor efeito antitumoral (IC50) sobre culturas de células. A doxorrubicina foi utilizada como controle de um fármaco citotóxico, amplamente utilizado para o tratamento do osteossarcoma. O ensaio foi baseado na clivagem do sal amarelo de tetrazólio {MTT [brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio]]} em cristais roxos por células metabolicamente ativas. As concentrações do inibidor lapatinibe variaram de 4 até 16 μ M, de acordo com os ensaios prévios realizados para identificação do intervalos das doses. As células tumorais foram semeadas em placa de 96 poços específica para cultura celular e foram mantidas durante 24 horas em estufa 37 °C antes de a droga ser adicionada ao meio. Após esse período inicial, as células foram cultivadas e incubadas em DMEN contendo 5% de SFB, tratadas com o lapatinibe e doxorrubicina, e mantidas em estufa de CO2 por 24 horas. Após o tratamento, 10ul de reagente de

marcação de MTT foram adicionados a cada poço e a placa será incubada a 37 °C durante 4 h. Após incubação com o MTT, as culturas foram solubilizadas e a absorbância espectrofotométrica das amostras detectadas através de um leitor de placas de microtitulação. O comprimento de onda para medir a absorção do produto foi de 570nm.

3. RESULTADOS

3.1 Cultura celular

De todos os osteossarcomas coletados no período, apenas o OSA8, fragmentos número 2 e 4, cresceram em cultura celular, de forma que com essas células que foram realizados os experimentos para caracterização. Na tabela 1 encontram-se as características histopatológicas de todas as células coletadas para cultivo celular, enquanto na tabela 2 há os resultados imunohistoquímicos de cada fragmento.

Tabela 1. Características histopatológicas das amostras coletadas para cultura celular.

Amostra	Fragmen to	Matriz	Pleomorfis mo	Cariomega lia	Binucleaç ão	Necros e	Mitose (10 CGA)	Grau histopatológi co
OSA7 (Osteo)	1	2	2	1	1	3	1	3
	2	2	2	1	1	3	1	3
	3	2	2	2	1	3	2	3
	4	1	1	1	0	3	1	2
OSA9 (Osteo)	1	2	3	0	1	3	3	3
	2	2	3	2	1	3	1	3
	3	1	3	2	1	3	1	3
	4	1	3	2	1	3	1	3
OSA10 (Condro)	1	1	2	1	0	0	1	1
	2	1	2	1	1	0	1	1
	3	2	2	1	1	1	1	2

	4	2	2	1	0	1	1	2
OSA11 (Osteo)	1	2	3	2	1	3	1	3
	2	2	3	2	1	1	1	3
	3	2	3	2	1	1	1	3
	4	2	3	2	1	3	0	3
OSA12 (Condro)	1	3	3	1	0	3	0	3
	2	2	3	1	0	3	0	2
	3	2	3	1	0	3	0	2
	4	2	3	2	0	3	0	3

***OSTEO:** osteoblástico, **CONDRO:** condroblástico.

Tabela 2. Características imunohistoquímicas das amostras coletadas para cultura celular.

Amostra	Fragmento	Marcação HER-2	Intensidade HER-2	Escore HER-2
OSA7	1	1	3	3
	2	1	3	3
	3	1	3	3
	4	1	3	3
OSA9	1	1	3	3
	2	2	3	6
	3	1	3	3
	4	2	3	6
OSA10	1	1	3	3
	2	1	3	3
	3	1	3	3
	4	1	3	3
OSA11	1	2	3	6
	2	1	3	3
	3	2	3	6
	4	3	3	9

OSA12	1	1	3	3
	2	2	3	6
	3	2	3	6
	4	1	3	3

Na tabela 3 há a descrição dos eventos das demais células coletadas e a consequência de cada uma ao decorrer do experimento.

Tabela 3. Evento envolvido no descarte das células coletadas.

Célula	Evento
OSA7	Contaminação <i>Mycoplasma spp.</i>
OSA8 (fragmento 1 e 3)	Contaminação <i>Mycoplasma spp.</i>
OSA9	Crescimento insuficiente <i>in vitro</i>
OSA10	Contaminação <i>Mycoplasma spp.</i>
OSA 11	Crescimento insuficiente <i>in vitro</i>
OSA 12	Crescimento insuficiente <i>in vitro</i>

3.2 Características clínicas, histopatológicas e imunohistoquímicas OSA8

A célula OSA8 foi coletada de uma cadela, com 10 anos de idade, 17 kg, sem raça definida e com diagnóstico de osteossarcoma do subtipo osteoblástico em rádio e ulna esquerda. Essa paciente realizou procedimento cirúrgico para a remoção do tumor primário, em que foi optado por escapulectomia, e no momento do diagnóstico não foi identificado sinais de metástase, porém a sobrevida da mesma foi de 45 dias. Essa paciente não realizou quimioterapia adjuvante pós operatória.

Na tabela 4 podem-se encontrar as características microscópicas e grau histopatológico avaliados separadamente em cada um dos fragmentos coletados, sendo a graduação de MOORE et al., 2007.

Tabela 4. Características microscópicas OSA8, fragmento 2 e fragmento 4.

Fragmento	Matriz	Pleo.	Cario.	Binucleação	Necrose	Mitose (10 CGA)	Grau
2	2	2	0	0	0	0	1
4	1	3	0	1	0	0	1

***Pleo.**: Pleomorfismo; **Cario.**: cariomegalia.

Em relação ao escore de marcação, escore de coloração e graduação final da marcação do HER-2 nessa célula, tivemos que no fragmento 2 o OSA8 houve grau 1 de marcação e grau 3 de intensidade de coloração, corroborando para o escore final de valor três. Enquanto no fragmento 4, o escore de marcação foi grau 2, enquanto o de coloração foi grau 3, totalizando um score final no valor de seis.

3.3 Avaliação da tumorigenicidade

Em um período de 90 dias não houve crescimento tumoral no camundongo inoculado. Foi realizado eutanásia do animal, necrópsia com avaliação macroscópica e microscópica e coleta dos seguintes órgãos: cérebro, pulmão, coração, fígado, baço, rins, adrenais, intestino, testículos e os fragmentos cutâneos respectivos à inoculação de cada célula. Todas as estruturas coletadas foram processadas e observou-se ausência de células neoplásicas provenientes dos osteossarcomas inoculados.

3.4 Análise morfológica das células por coloração de Hematoxilina e Alizarina

Com a análise por hematoxilina e eosina, foi possível identificar características celulares normalmente encontradas como comportamento típico de osteossarcoma (Figura 3 A e B). Já pela coloração de Alizarina foi possível observar a presença de matriz óssea marcada pela coloração vermelha (Figura 3 C e D).

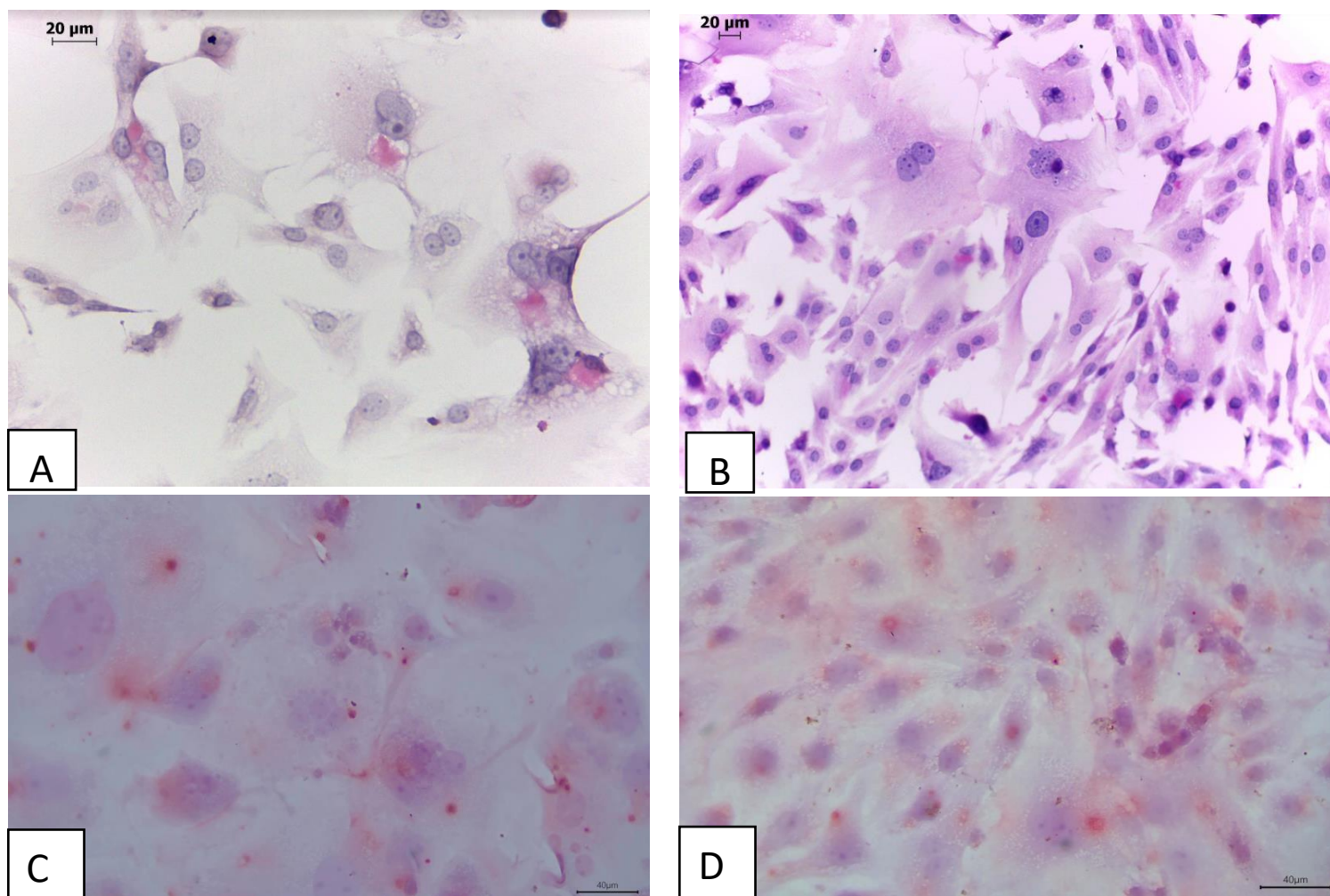


Figura 3. H.E. da célula OSA8 com características semelhantes *in vitro*: células multinucleadas, macrocitose, cromatina frouxa, nucléolos evidentes, binucleações, pleomofismo, anisocitose e presença de material eusínófilico amorfo citoplasmático (matriz óssea). Além da coloração avermelhada demonstrando a matriz óssea. **A.** H.E. OSA8 2. **B.** H.E. OSA8 4. **C.** Alizarina OSA8 2. **D.** Alizarina OSA8 4. Aumento 200x.

3.5 Ensaio MTT

Foram testadas as mesmas doses de Doxorrubicina (Figura 4) e Lapatinibe (Figura 5) em ambos os fragmentos do OSA8, e pode-se observar que a dose de IC50 foi semelhante entre os fragmentos, além de menor dose do Lapatinibe em relação à Doxorrubicina.

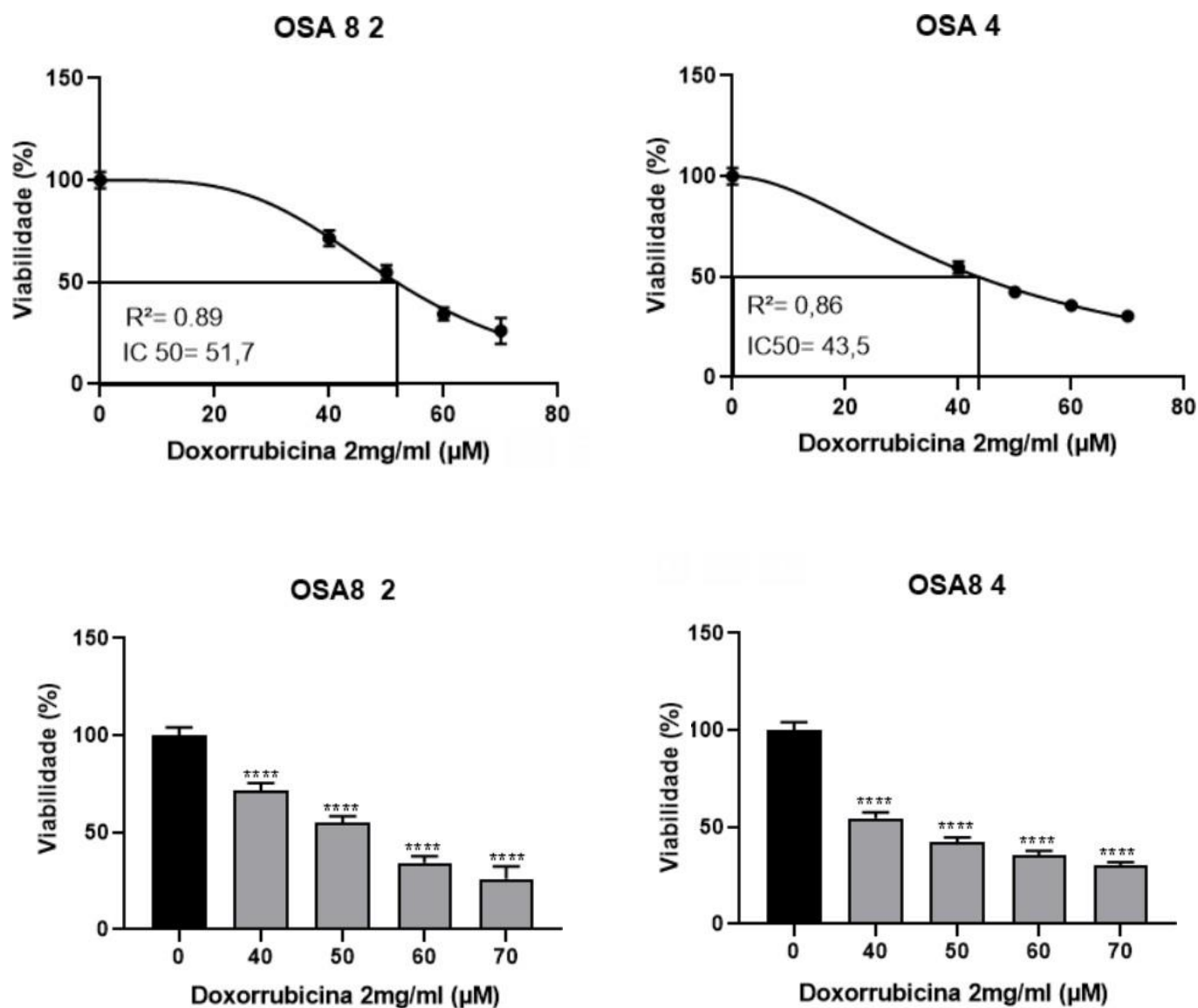


Figura 4. Viabilidade celular de ambos os fragmentos da OSA8 com o uso da Doxorrubicina. Pode-se observar que houve diferença estatística da viabilidade celular de acordo com as doses quando comparadas ao controle (****: $p < 0.05$).

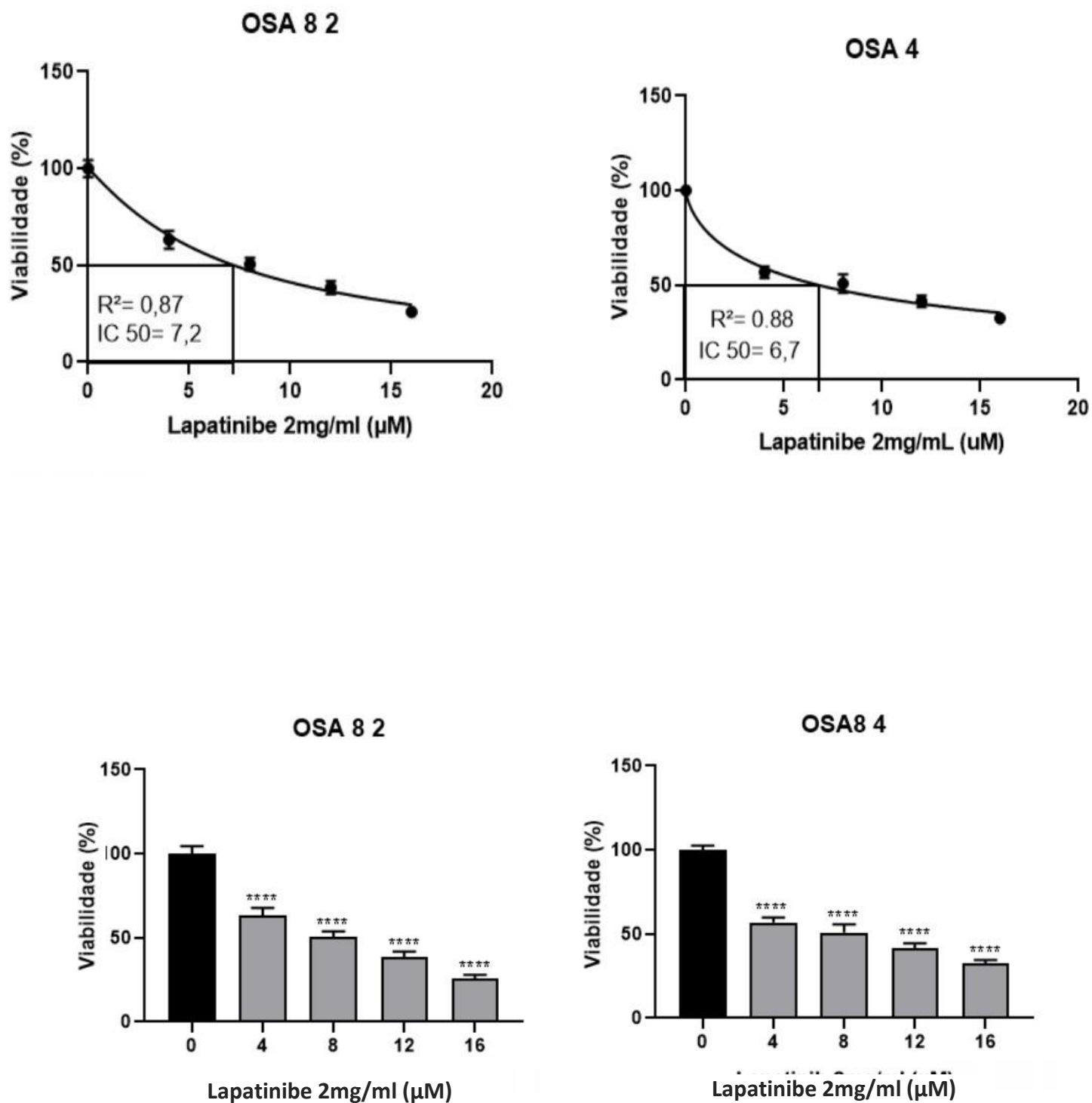


Figura 5. Viabilidade celular de ambos os fragmentos da OSA8 com o uso do Lapatinibe. Pode-se observar que houve diferença estatística da viabilidade celular de acordo com as doses quando comparadas ao controle (****: $p < 0.05$).

4. DISCUSSÃO

O osteossarcoma é uma neoplasia com grande relevância para a Oncologia Veterinária, pois mesmo com os tratamentos preconizados, excisão do tumor primário e quimioterapia, a sobrevida dos animais é em média de um ano (CHUN & LORIMIER, 2003), por isso a importância de estudos que corroborem com outras novas opções terapêuticas.

A cultura celular se mostra eficaz como um modelo biológico menos complexo quando comparada a outras técnicas (FRESHNEY, 2006), e os resultados obtidos são extremamente úteis para as análises e avanços farmacológicos (FRESHNEY, 2006). Porém, contaminação por microorganismos externos pode trazer prejuízos ao estudo, pois além de morte celular podem acarretar alterações celulares importantes (VAN STAVEREN et al., 2009), por isso nesse estudo foi decidido o descarte de células contaminadas por agentes externos, a fim de evitar resultados equivocados nos testes realizados.

Em relação ao *Mycoplasma spp* é um tipo de bactéria com cerca de 20% de prevalência em contaminações de culturas celulares (DREXLER & UPHOFF, 2002). Há grandes dificuldades para identificação desses microorganismos em culturas celulares, uma vez que essa infecção não causa morte imediata das células ou turbidez do meio, são invisíveis aos microscópios de rotina e resistentes aos antibióticos utilizados normalmente em protocolos de cultura celular (UPHOFF & DREXLER, 2010), no caso das culturas que foram positivas em nosso estudo mesmo com o tratamento preconizado com Ciprofloxacino, a cultura foi descartada, acarretando na diminuição das células totais utilizadas, e essa foi uma dificuldade encontrada no estudo.

Em relação ao OSA8 foi diagnosticado como subtipo osteoblástico, o mais comumente encontrado nesse tipo de neoplasia (CHUN & LORIMIER, 2003), além da localização em membro torácico, também de maior acometimento em cães (MAULDIN et al., 1988). Apesar da raça da paciente em questão não incluir as raças de maior incidência já descritas, acreditamos que essa característica racial seja devido à alta prevalência de cães sem raça definida em nosso país.

No teste de alizarina apesar da coloração relativamente discreta da matriz óssea produzida, tal cenário que corrobora com a caracterização de outras linhagens pré-estabelecidas de osteossarcomas caninos (MARTINS-NEVES et al., 2012). No entanto, há a possibilidade de uma marcação mais evidente, em culturas celulares esferoides, possivelmente pelo fato de que a cultura 2D possa interferir na produção e manutenção dessa matriz.

Enquanto aos achados de H.E. da cultura celular, condizem com as características microscópicas esperadas no diagnóstico de osteossarcoma, uma vez que foi evidenciado produção de matriz, além de critérios de malignidade como pleomorfismo e binucleações.

No presente estudo as células inoculadas em camundongos não apresentaram crescimento *in vivo*, essa condição pode estar relacionada à seleção de clones durante a expansão celular, que favoreçam o crescimento *in vitro*, e consequentemente, perda da tumorigenicidade. Mas, é importante ressaltar que a via de administração pode ser um fator relevante para essa fase da caracterização, uma vez que células inoculadas de forma intramuscular em vez de subcutânea podem apresentar o dobro da velocidade de crescimento tumoral, mas não necessariamente quando esses tumores são avaliados apresentem características típicas de osteossarcoma (MOHSENY et al., 2011).

Sobre a superexpressão do HER-2 na cultura celular corrobora para a caracterização do presente estudo e a caracterização de uma nova linhagem de osteossarcoma, pois esse receptor já é estudado em osteossarcomas, inclusive como fator prognóstico e resposta terapêutica, e diretamente relacionada à sobrevida dos pacientes (ZHOU et al., 2003, RAINUSSO et al., 2012).

A importância do uso do Lapatinibe na viabilidade celular do estudo condiz com a expressão do HER-2 na OSA8, pois houve morte celular em doses menores do que quando comparado ao uso da Doxorrubicina, portanto o alvo celular foi efetivo, sendo evidente a diferença estatística da viabilidade celular em relação ao controle, em todas as doses dos dois fármacos utilizados.

5. CONCLUSÃO

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

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

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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