

Anticorpos monoclonais contra HER2: uso no diagnóstico do carcinoma de mama em caninos

VASCONCELLOS, Flávia Aleixo¹; STONE, Simone Cardozo¹; RAPOSO, Josiane Bonel²; CONCEIÇÃO, Fabrício Rochedo¹; SILVA, Éverton Fagonde²; ALEIXO, José Antonio Guimarães¹

¹CDTec/Biotecnologia-Universidade Federal de Pelotas

²Faculdade de Veterinária- Universidade Federal de Pelotas

1 INTRODUÇÃO

Neoplasias mamárias são freqüentes nas fêmeas caninas e representam um problema de grande impacto em medicina veterinária, visto que resultam em um alto índice de mortalidade. Além disso, os tumores mamários espontâneos que acometem a cadela compartilham diversas similaridades com os tumores da mama humana (Geraldés et al., 2000; Lee et al., 2004), sendo por isso, considerados bons modelos para estudos comparativos (Paoloni & Khanna, 2008).

A desregulação de membros da família de receptores de fator de crescimento epidermal, como o EGFR (HER1) e o HER2, está entre os fatores que são relacionados com o desenvolvimento e progressão tumoral. A reação dos receptores com ligantes específicos provoca a formação de homo e heterodímeros (Reyes et al., 1998; Hynes et al., 2001). A dimerização dos receptores no domínio extracelular estimula diversas cascatas citoplasmáticas que fazem o controle da proliferação e sobrevivência das células.

O gene HER2 é localizado no cromossomo 1q13.1, na espécie canina (Murua et al., 2001), e a expressão de proteína HER2 também tem sido observada nos tumores mamários desta espécie. Ahern et al. (1996), avaliaram a expressão de HER2 no nível do RNA mensageiro e verificaram que 75% dos 23 carcinomas estudados apresentaram superexpressão. Posteriormente, diversos estudos utilizando a IHC com critérios similares para avaliação da coloração verificaram que 17% a 35,4% dos carcinomas apresentavam aumento da proteína (Rungsipipat et al., 1999; Martín De Las Mulas et al., 2003; Dutra et al., 2004; Hsu et al., 2009).

Muitos esforços estão sendo direcionados para adoção de critérios que permitam a padronização do diagnóstico, a determinação de fatores prognósticos e entendimento do comportamento e da biologia dos tumores mamários caninos (Bertagnolli, 2009). Em contribuição a isto, neste trabalho objetivamos demonstrar a aplicabilidade de anticorpos monoclonais anti-HER2 produzidos pelo nosso grupo de pesquisa da UFPel, como reagentes primários para o uso no diagnóstico imunohistoquímico de carcinomas de mama em cadelas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os anticorpos monoclonais usados neste trabalho foram produzidos no Laboratório de Imunologia Aplicada do Centro de Desenvolvimento Tecnológico -

Biotecnologia da UFPel contra um fragmento da porção extracelular do receptor HER2 humano (Vasconcellos, 2008; 2010). Eles foram utilizados como anticorpos primários em reações de imunohistoquímica (IHQ) em cortes de tecidos de mama de caninos cedidos pela Faculdade de Veterinária - Departamento de Patologia da UFPel.

A técnica de IHQ baseou-se na reação do anticorpo primário anti-HER2 reagindo em cortes de 3 mm de tecido de carcinoma ductal invasivo, oriundos de material emblocado em parafina, fixados em lâmina silanizadas. A desparafinização foi feita em estufa a 60°C por 30 min; após banho de xilol e álcool em concentrações decrescente (absoluto, 90%, 70% e 50%) as lâminas foram lavadas com água destilada. A seguir foi feita recuperação antigênica com solução de citrato de sódio pH 6,0 em banho maria a 92°C; após as lâminas foram deixadas a temperatura ambiente por 20 min e lavadas com água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com água oxigenada 30V diluída em metanol a 15% sob proteção da luz e, a seguir, os cortes foram lavados com água destilada. No bloqueio das ligações inespecíficas foi usada uma solução de leite desnatado 5% em PBS-T por 1h. Após, as lâminas foram incubadas com 0,5 mg.mL⁻¹ de anticorpo primário anti-HER2 por 30 min e depois *overnight* na geladeira. No dia seguinte as lâminas foram lavadas e deixadas por 40min a temperatura ambiente; o anticorpo secundário biotilado (LSAB-Dako) foi colocado em contato por 40min, as lâminas foram lavadas e, após, foi adicionado um complexo streptavidina-peroxidase (LSAB-Dako) por 40 min a temperatura ambiente. Após foi lavado com PBS-T e a revelação da reação foi feita com substrato cromógeno DAB (diaminobenedina), por 5 min. Após lavar em água corrente e destilada, as lâminas foram contracoloradas com hematoxilina e desidratadas com solução crescente de álcool, montadas com entellan e visualizadas em microscopia ótica. O controle negativo foi feito com soro negativo de camundongo e o positivo com anticorpo policlonal de coelho anti-HER2 (A0485 da Dako).

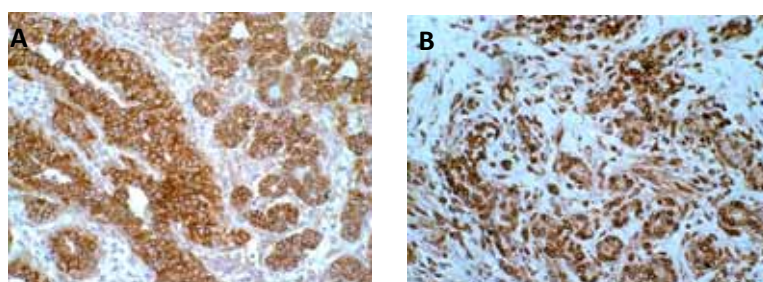


Figura 1. Imunohistoquímica de tumor de mama canino usando como anticorpos primários o soro policlonal A0485 DAKO[®] como controle positivo (A) e o MAb 33F anti-HER2 (B) (40x).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram testados cinco MAbs previamente produzidos (Vasconcellos, 2008 e usados na detecção de superexpressão de HER2 em tumor de mama humana por IHQ (Vasconcellos, 2010). Um exemplo dos resultados do emprego

destes MABs na detecção da proteína nativa HER2 sendo superexpressa na superfície celular de tecido de tumor de mama ductal invasivo de cadelas é mostrado na figura 1. A reação do MAb 33F vem de encontro aos ensaios realizados usando este anticorpo como primário na técnica de IHQ para o diagnóstico do câncer de mama em humanos (Vasconcellos, 2010).

As diferenças na conformação molecular e superexpressão do HER2 humano e canino, são questões que queremos investigar usando cortes de tecidos de outros tipos e locais de tumores neoplásicos em caninos.

Ensaio complementares de validação de concentrações do anticorpo serão realizados para melhor demonstrarmos o potencial de uso deste MAb em testes de IHQ.

4 CONCLUSÕES

Com a demonstração parcial da aplicabilidade do anticorpo monoclonal 33F anti-HER2 em teste imunohistoquímico de tecido tumoral de mama canino, contribuimos com a produção de insumos para uso em diagnóstico imunopatológico na medicina veterinária.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHERN, T.E.; BIRD, R.R.; WOLFE, L.G. Expression of the oncogene c-erbB-2 in canine mammary cancers and tumor-derived cell lines. **Am J Vet Res**, v. 57, n.5, p.693–696, 1996.

BERTAGNOLLI, A.C.; Cassali, G.D.; Genelhu, M.C.L.S.; Costa, F.A.; Oliveira, J.F.C.; Gonçalves, P. B. D. Immunohistochemical expression of p63 and _np63 in mixed tumors of canine mammary glands and its relation with p53 expression. **Vet Pathol**, v. 46, N.3: p. 407-415, 2009.

DUTRA A.P. GRANJA, N.V.M.; SCMITT, F.C.; CASSALI, G.D. cerbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, p.1673-1681, 2004.

GERALDES, M., GÄRTNER, F., SCHMITT, F. Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumors. **Vet Rec**, v.146, p.403- 406, 2000.

HYNES, N.E.; HORSCH, K.; OLAYIOYE, M.A.; BADACHE, A. The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators. **Endoc Relat Cancer**, v. 8, n.3, p.151 -159, 2001.

HSU, W.L.; HUANG, H.M.; LIAO, J.W.; WONG, M.L.; CHANG S.C. Increased survival in dogs with malignant mammary tumours overexpressing HER-2 protein and detection of a silent single nucleotide polymorphism in the canine HER-2 gene. **Vet J**, v. 180, n.1, p.116-123, 2009.

LEE, C.H., RUTTEMAN, G.R., KONG, J.M.C. Mutation and overexpression of p53 as prognostic factor in canine mammary tumors. **J. Vet. Sci**, v.5, n.1, p.63-69, 2004.

MARTÍN DE LAS MULAS, J; ORDÁS, J.; MILLAN, Y.; FRENANDEZ-SORIA, V.; RAMÓN y CAJAL, S. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. **Breast Cancer Res Treat.**, v. 80, p.363–367, 2003.

MURUA, E.; BECKER, H.; BULLERDIEK, J. The canine ERBB2 gene maps to a chromosome region frequently affected by aberrations in tumors of the dog (*Canis familiaris*). **Cytog Cell Genet**, v. 94, p.194–195, 2001.

PAOLONI, M.A.; KHANNA,C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. **Nat Rev Cancer**, v.8, p. 147-156, 2008.

REYES, A.; GISSI, C.; PESOLE, G.; SACCONI, C. Asymmetrical directional mutation pressure in the mitochondrial genome in mammals. **Mol Biol Evol**, v, 15, p.957-966,1998.

RUNGSIPAT, A. TATEYAMA, S.; YAMAGUCHI, R.; UCHIDA, K.; MIYOSHI, N.; HAYASH, T. Immunohistochemical analysis of c-yes and cerbB-2 oncogene products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors. **Vet Med Sci**, v.61, p. 27-32, 1999.

VASCONCELLOS, F.A.; STONE, S.C.; COUTINHO, M. L.; CRUZ, O.M., CONCEICAO, F.R.; Aleixo, J.A.G. Anticorpos monoclonais contra marcador HER2 de carcinoma de mama: produção e caracterização In: **XVII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA X ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO UFPel**, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas 2008.

VASCONCELLOS, F. A.; ALEIXO, P.B.; STONE, S.C.; CONCEIÇÃO, F.R.; DELLAGOSTIN, O.A.; ALEIXO, J.A.G. Generation and Characterization of New HER2 Monoclonal Antibodies. **Modern Pathology**, 2010. Submetido em Agosto-2010.